

肉用鶏農場における *Campylobacter jejuni* の伝播並びに
鶏の日齢が *C. jejuni* の定着に及ぼす影響に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

矢野 小夜子

2015 年 3 月

目次

| | |
|---|----|
| 緒言 | 1 |
| 1. カンピロバクターの細菌学的性状 | 1 |
| 2. カンピロバクターの分布 | 1 |
| 3. 食中毒とカンピロバクター | 2 |
| 4. カンピロバクター食中毒の原因食品 | 3 |
| 5. 肉用鶏農場におけるカンピロバクター | 4 |
| 6. 本研究の目的 | 6 |
| 第1章 疫学的に関連のある複数のブロイラー農場における <i>Campylobacter jejuni</i> のモニタリングと分離株の遺伝学的解析 | 7 |
| 1-1 目的 | 7 |
| 1-2 材料及び方法 | 8 |
| 1-2-1 肉用鶏農場 | 8 |
| 1-2-2 糞便の採取 | 9 |
| 1-2-3 糞便サンプルからの <i>C. jejuni</i> の分離 | 10 |
| 1-2-4 分離菌株の型別 | 11 |
| 1-2-5 農場内環境サンプルからの <i>C. jejuni</i> の分離 | 11 |
| 1-2-6 2012年における農場1敷地内及び周辺の野生動物行動調査 と野生動物糞便からの <i>C. jejuni</i> の分離 | 12 |
| 1-2-7 鶏糞便由来 <i>C. jejuni</i> のマウスに対する経口接種試験 | 14 |
| 1-3 結果 | 14 |

| | | |
|---|----|----|
| 1-4 考察 | …… | 28 |
| 第2章 異なる日齢で <i>Campylobacter jejuni</i> に暴露された鶏における保菌 と糞便への排菌 | …… | 32 |
| 2-1 目的 | …… | 32 |
| 2-2 材料及び方法 | …… | 33 |
| 2-2-1 供試鶏 | …… | 33 |
| 2-2-2 接種菌株 | …… | 33 |
| 2-2-3 接種実験 | …… | 34 |
| 2-2-4 <i>C. jejuni</i> 分離株の型別 | …… | 36 |
| 2-2-5 ブロイラー農場における <i>C. jejuni</i> のモニタリング | …… | 36 |
| 2-2-6 統計学的解析 | …… | 36 |
| 2-3 結果 | …… | 36 |
| 2-3-1 実験感染群における <i>C. jejuni</i> の分離 | …… | 36 |
| 2-3-2 コマーシャル農場における <i>C. jejuni</i> の分離 | …… | 40 |
| 2-4 考察 | …… | 40 |
| 総括 | …… | 43 |
| 謝辞 | …… | 47 |
| 引用文献 | …… | 49 |

緒 言

1. カンピロバクターの細菌学的性状

Campylobacter 属は、極べん毛を有するグラム陰性の、幅 0.2~0.9 μm 、長さ 0.5~5.0 μm でS字状あるいはらせん状を呈する細菌である。

Campylobacter 属菌（以下、カンピロバクター）は、2009年現在、21菌種に分類されている。血清型別法は、耐熱性抗原を用いた Penner 法 [Penner *et al.*, 1980] と、易熱性抗原を用いた Lior 法 [Lior, 1984] の2法が国際カンピロバクター血清委員会（International Committee for serotyping of *Campylobacter*）により承認され [大橋ら、1987；斉藤ら、1991]、標準的な疫学マーカーとして利用されている [Boonmar *et al.*, 2005; Woodward and Rodgers, 2002]。

カンピロバクターは酸素 5%、二酸化炭素 10%及び窒素 85%から成る微好気的環境において、菌種により 25~46°Cで増殖し、培地上で直径約1~3mmのコロニーを形成するまで、48~96時間程度の培養時間を要する。コロニーは灰色、スムーズで円形であるが、寒天培地表面の水分が高い場合は紡錘形を呈する場合もある。好気的環境下で発育しないこと、グラム陰性、オキシダーゼ反応陽性のほか、直接鏡検での回転運動などで本菌をスクリーニングできる。空気中では長期間生存できず、乾燥に弱い。

2. カンピロバクターの分布

カンピロバクターは牛、豚、羊、鶏などの家畜や[Duffell *et al.*, 1978；Nielsen *et al.*, 1997; Skirrow and Benjamin, 1980; Weijtens *et al.*, 1999; Wesley *et al.*, 2000]、犬、猫などの愛玩動物 [Skirrow and Benjamin, 1980]、さらにはタヌキ、シカ、イノシシなどの野生動物 [Lillehaug *et al.*,

2005; 松崎ら, 1983; Navarro-Gonzalez *et al.*, 2014]、カラス、ドバトやカモメなどの野鳥 [Hughes *et al.*, 2009; Kinjo *et al.*, 1983; Maruyama *et al.*, 1990; Skirrow *et al.*, 1980]、衛生動物であるネズミの腸管内容から分離されている [Skirrow and Benjamin, 1980; 津越ら, 1993]。また、河川や下水などの環境材料 [Pearson *et al.*, 1993; Rodriguez and Araujo, 2010; Skirrow and Benjamin, 1980] からも本菌が分離されている。

3. 食中毒とカンピロバクター

近年、*Campylobacter jejuni* と *C. coli* は、人の細菌性食中毒の原因菌として増加傾向にある [三澤, 2012 ; Noormohamed and Fakhr, 2013]。日本においても、カンピロバクターを原因菌とする食中毒の発生数は年々増加しており、厚生労働省食中毒統計資料、平成 25 年（2013 年）食中毒発生状況 (<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenu/H25jokyo.xls>) によれば、細菌性食中毒に占める発生件数は第一位を占め、公衆衛生上大きな問題となっている。人のカンピロバクターによる食中毒の症状の特徴は、潜伏期間が食品摂食後 1~7 日（平均 3 日）と比較的長く、100 個程度の少量の菌量で感染し、発症すると考えられている [Black *et al.*, 1988 ; Robinson, 1981]。主要症状は下痢、腹痛、発熱、頭痛、全身倦怠感などで、ときに嘔吐もみられる [久高ら, 2005]。下痢は 1 日に 4~12 回にもおよび、便性は水様性、泥状で、血液を混ざるとの報告もある [Blaser *et al.*, 2008; 伊藤, 2000]。また、*C. jejuni* による食中毒の続発症として、ギランバレー症候群 (Guillan-Barre Syndrome) や、フィッシャー症候群 (Miller-Fischer Syndrome) などを起こすことがあるとの報告もなされている [Allos *et al.*, 1998; Altekruse *et al.*, 1999 ; Yuki *et al.*, 1993]。

4. カンピロバクター食中毒の原因食品

カンピロバクター食中毒は、本菌に汚染された畜産製品を生、あるいは不十分な加熱により調理された状態で人が摂食することにより感染し、発症する機会が多い。厚生労働省がまとめた「平成25年度食品の食中毒菌汚染実態調査の結果(2014年3月27日 食安監発0327第1号 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知)」によると、加熱加工用牛レバーでは平成23年に15.1%、平成24年に16.1%からカンピロバクターが分離された。鶏肉ミンチでは平成23年に37.7%、平成24年に36.2%、平成25年に15.6%、また、鶏たたきでは平成23年に12.1%、平成24年に12.0%、平成25年に13.0%から本菌が分離されたと報告されている。一方、日本国内の牛から採取した胆汁から本菌が分離される割合は、23.1%から54.3%と報告されており [Matsumoto *et al.*, 2008 ; 小野, 2013 ; 品川, 2007]、腸管内の本菌が胆管を通じて胆嚢内に侵入・増殖後、胆汁を介して肝臓を汚染すると考えられている [小野, 2006]。このため、牛レバーの生食は本菌による食中毒を引き起こす大きな要因のひとつと考えられる [Noormohamed *et al.*, 2013]。

一方、先進諸国におけるカンピロバクターの感染源として最も重要視されているのが鶏肉 [Beery *et al.*, 1988 ; Cogan *et al.*, 1999] である。すなわち、カンピロバクターに汚染されている市販鶏肉の割合は、英国で約80% [Corry and Atabay, 2001]、ヨーロッパ各国で数%から70% [鈴木、山本, 2011] とされ、また、食品安全委員会が2009年にまとめた微生物・ウイルス評価書「鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ／コリ」によると、我が国の小売店で採材した国産鶏肉では32~96% (平均65.8%) と報告されている。鶏肉のカンピロバクターによる汚染は、もともと鶏の腸管内や羽毛、皮膚などに存在していた本菌が、食鳥処理場で鶏肉に加工される際に鶏肉表面に付着することに起因す

る [Atabay and Corry, 1997; Berndtson *et al.*, 1996; Hiett *et al.*, 2007; Ono and Yamamoto, 1999]。処理場に搬入された鶏が、と殺・放血、湯漬け、脱羽、冷却、内臓摘出、解体などの各処理工程を経る間、本菌が存在する腸管内容物や羽毛などが洗浄水、冷却水、処理機器、スタッフの手指やまな板、包丁などを汚染し、最終的に鶏肉に付着する [Corry and Atabay, 2001; Genigeorgis *et al.*, 1986; Son *et al.*, 2007]。さらに、カンピロバクターに汚染されていない鶏群も、処理場で同様の処理を経る間に、洗浄水を汚染したあるいは、脱羽器、解体機器・器具やスタッフの手指などに付着した本菌によって二次的に汚染する可能性がある [Ono and Yamamoto, 1999]。このような処理場でのカンピロバクター低減対策として、前述の微生物・ウイルス評価書「鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ／コリ」では、食鳥処理場での汚染・非汚染鶏群の区分処理、塩素濃度管理の徹底などが提唱されており、処理場での取り組みが重要視されているところである。

5. 肉用鶏農場におけるカンピロバクター

既に述べたように、カンピロバクターは鶏の腸管内容から分離されることが広く知られている [Hermans *et al.*, 2012]。2007年11月から2008年2月までの間、国内124か所の肉用鶏農場について鶏の盲腸内容又はクロアカスワブのカンピロバクター陽性率を調査した結果では、検体数に占める陽性検体の割合は43.5%と報告している [Sasaki *et al.*, 2011]。また、前述の微生物・ウイルス評価書によると、カンピロバクターが分離された農場における鶏の保菌は、農場によりばらつきはあるものの、33.3%～97.6%と高い陽性率を示している。

一般にコマーシャル農場に導入されたブロイラーの初生ヒナからは、カンピロバクターは分離されない [Gregory *et al.*, 1997; Herman *et al.*, 2003]。種

鶏場の鶏の糞便からは本菌が分離されなかったが、その種卵から孵化したコマールシャル鶏では出荷前の糞便検体から分離されたことや [Lindblom *et al.*, 1986]、種鶏由来株とコマールシャル鶏由来株の遺伝子型あるいは血清型が一致しない場合があることなどから、介卵感染がヒナの汚染に果たす役割はきわめて少ないと考えられている [Chuma *et al.*, 1997; Petersen and Wedderkopp, 2001]。

ヒナを農場に導入した後、2~3週齢以降に達すると、一部の鶏の糞便からカンピロバクターが検出され始めることが広く知られている [Berndtson *et al.*, 1996; Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995; Saleha, 2004]。糞便中に排出された本菌は、敷き料や水樋、給餌器内の飼料などを汚染し、それを同居鶏が経口的に摂取すると、腸管粘膜に定着し [Beery *et al.*, 1988]、鶏には臨床症状を示さないうまま腸管内で増殖する [Van Gerwe *et al.*, 2009]。その結果、糞便からは1gあたり $10^6 \sim 10^8$ 個にも及ぶ本菌が排泄され、水平感染によって短期間に鶏群全体に拡がる [Beery *et al.*, 1988; Evans and Sayers, 2000; Meade *et al.*, 2009]。若齢の鶏からは本菌が検出されず、2~3週齢に達して初めて検出される理由として、移行抗体の関与が挙げられている [Sahin *et al.*, 2003]。したがって、鶏が2~3週齢以前に本菌に曝露されている可能性は否定できない。

一方、鶏へのカンピロバクターの伝播経路として、飲水 [Pearson *et al.*, 1993; Sasaki *et al.*, 2011]、野生動物 [Gregory *et al.*, 1997] や昆虫 [Ekdahl *et al.*, 2005]、野鳥 [Craven *et al.*, 2000] などの生物の関与 [Newell and Fearnley, 2003]、作業員 [Berndtson *et al.*, 1996; Herman *et al.*, 2003; Humphrey *et al.*, 1993]、鶏輸送カゴ [Patriarchi *et al.*, 2011]、ヒナ輸送箱 [Byrd *et al.*, 2007]、鶏舎周りの環境 [Bull *et al.*, 2006] などが挙

げられるものの、実証されている事例は少ない。

6. 本研究の目的

鶏肉を介したカンピロバクターによるヒトの感染リスクを低減するためには、鶏群への本菌の伝播を防止する方策を講じることがもっとも有効である。しかし、これまで述べたとおり、肉用鶏農場においてどのような経路でカンピロバクターが鶏群に伝播しているのか、また、その時期がいつであるのかについては十分明らかにされていない。加えて、本菌に曝露された鶏の日齢、その後の定着や排菌数に与える影響も明らかでない。著者は、この伝播経路と曝露日齢が鶏に与える影響の2点について明らかにし、その要因を排除することが、農場の鶏群へのカンピロバクター侵入防止のために重要であると考えた。

そこで、カンピロバクターの鶏への伝播のメカニズムを解明するため、同一の企業養鶏会社に所属し地理的に離れた地域に設置された複数の農場、及び互いに異なる会社に所属するが近隣に位置する2つの農場におけるカンピロバクターのモニタリングと分離株の遺伝学的解析を、複数の鶏群及び複数の鶏舎について行い、環境材料や野生動物など伝播に関与すると考えられる要因についても調査した。また、糞便へのカンピロバクターの排菌が曝露の日齢に依存している可能性を明らかにするため、コマーシャル農場から提供された初生ブロイラーヒナを隔離して飼育し、さまざまな日齢で実験的に *C. jejuni* を接種した。

第1章 疫学的に関連のある複数のブロイラー農場における
Campylobacter jejuni のモニタリングと分離株の遺伝学的解析

1-1 目的

C. jejuni は、多くの国において食品媒介性急性消化器疾患の原因菌として知られている。本症に関するこれまでの調査研究において、ブロイラーの肉が感染源のひとつであることが示されている [Cogan *et al.*, 1999]。したがって、本菌のヒトへの曝露を防ぐためには、鶏の汚染を減少させることがきわめて重要と考えられる [van de Giessen *et al.*, 1998]。しかし、*C. jejuni* はしばしば共生菌として鶏の腸管に定着し、鶏が臨床症状を示すことはない [Beery *et al.*, 1988]。ブロイラーでは一般に、水平伝播により本菌が腸管内に定着すると考えられ、環境要因も鶏舎内の鶏における本菌の定着に役割を果たしている [Bull *et al.*, 2006; Jacob-Reitsma *et al.*, 1995; Workman *et al.*, 2008]。一方、種鶏からの垂直感染の可能性はあまり高くないと考えられている [Ring *et al.*, 2005]。

C. jejuni の分子遺伝学的解析は、他の細菌と同様に、本菌の伝播経路を調査する上で有用である。例えば、*C. jejuni* の *flaA* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、食鳥処理施設において採取したと体の汚染は、その鶏群の腸管内に存在していた菌によるものであることが明らかにされている [Hiett *et al.*, 2007]。また、ハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づく Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析の結果、鶏の輸送に用いるかごが、異なる鶏群間における本菌の伝播 [Patriarchi *et al.*, 2011]、あるいは食鳥処理施設を介しての伝播 [Hastings *et al.*, 2011] に関与している可能性を示唆する成績が得られている。

このたび *C. jejuni* の鶏への伝播のメカニズムを解明するため、4つの肉用鶏

農場において本菌を分離し、その性状を解析した。4つの農場のうち、近接している2つの農場（農場1及び農場4）は、互いに異なる孵卵場からヒナを導入し、それぞれ異なる飼料会社の飼料を給与して肥育しているが、ともに鶏の糞便から *C. jejuni* が分離されている。そこで、これら2農場間における本菌の伝播の可能性を検討するため、*flaA* 遺伝子の PCR 産物の制限酵素切断断片多型（RFLP）及び MLST により分離菌株を解析した。農場1は、14 km 以上離れたところに位置する他の2農場（農場2及び農場3）とともに、同一の企業養鶏会社に所属している。これらの2農場でも *C. jejuni* が分離されたので、農場間の伝播の可能性も含め、合わせて分離株を解析した。加えて、農場周辺に生息する野生動物が農場への *C. jejuni* の伝播に関与している可能性を検討するため、農場1において、鶏舎周辺の野生動物の行動調査と糞便からの菌分離を行った。さらに、ネズミが伝播要因になる可能性を確かめるため、鶏由来 *C. jejuni* をマウスに実験的に経口接種し、糞便からの排菌の有無を調査した。

1-2 材料及び方法

1-2-1 肉用鶏農場

2003年7月から2012年3月にかけて、日本国内の4つの肉用鶏農場において *C. jejuni* のモニタリングを行った。3つのブロイラー農場（農場1、2及び3）は、同じ企業養鶏会社に所属し、この会社と取引する6つの孵卵場（孵卵場 F, I, K, M, S 及び Y）からヒナを導入していた。これらの3農場では、各生産サイクルにおいて、複数の孵卵場から初生ヒナが導入され、47日から58日間飼養された。飼料も当該企業養鶏会社が取引する飼料会社から供給されていた。3農場のブロイラーはいずれも同養鶏会社が経営する食鳥処理場に出荷され、出荷の際の集鳥作業は会社の契約した複数の作業者が担っていた。この会社の

従業員が、雛の導入準備、鶏の発育状況の確認、農場の衛生管理の支援のために、これら3農場を相互に訪問していた。農場1では、13棟の平屋の開放鶏舎及び2棟の2階建てウィンドウレス鶏舎において鶏を飼養していた。通常、ウィンドウレス鶏舎は1人が管理し、開放鶏舎はウィンドウレス鶏舎とは異なる3人が管理していたが、開放鶏舎の担当者が休日の場合や、鶏舎設備を補修する場合は、月に2、3回程度ウィンドウレス鶏舎の担当者が開放鶏舎を管理又は立入っていた。農場2では鶏が12棟のウィンドウレス鶏舎で飼養され、このうち2棟の鶏の糞便を採取した。農場3では鶏が5棟の開放鶏舎で飼養され、このうち2棟の鶏の糞便を採取した。農場4では、鶏が12棟の開放鶏舎において82日から85日間飼養された。この農場で飼養される鶏は、日本農林規格に定められた日本の在来種をヒナの生産の片親に用い、飼育期間80日以上等の基準を満たしたいわゆる地鶏に分類される。以上4農場では、鶏群を出荷した後、鶏舎及び鶏舎内設備を清掃・水洗し、乾燥後消毒した。消毒剤は、農場1ではヨード剤、複合次亜塩素酸系製剤及びオルソ剤を、農場2では複合製剤、農場3ではオルソ剤、複合次亜塩素酸系製剤、農場4ではオルソ剤、逆性石けん製剤又はアルデヒド製剤を使用していた。

農場1及び農場4は直線で270mの距離にあり、農場間に林、畑及び水田と細い谷川を挟んだ藪が存在する。それぞれ、堆肥場及び鶏糞焼却施設を保有していた。農場2及び農場3は、農場1から東南に14km及び30kmのところに、それぞれ位置していた。

1-2-2 糞便の採取

農場全体の汚染状況を把握するため、農場1の生産サイクル1では2か所の鶏舎で、生産サイクル2では15か所の鶏舎で週に一度、13日齢から58日齢に

かけて採取した。その結果、*C. jejuni*は34日齢から39日齢に達した後に分離されることが判明したので（結果参照）、それ以降の農場1における生産サイクル3から10、農場2における生産サイクル11及び農場3における生産サイクル12においては、31日齢に達した後に採材を行った。また、農場2及び3については1回のみ、農場4においては4回採材し、いずれも各生産サイクルにつき1回のみ採材が許された。5羽の新鮮盲腸便を、滅菌綿棒を用いて表面から床面に触れること無く採取し、Cary-Blair培地（シードスワブ1号；栄研化学（株））に保存し、4℃に冷却した状態で2～4時間以内に実験室に輸送した。なお、生産サイクル2における1か所の鶏舎の分離成績は、Ishiharaら[2006]が既に報告している（結果参照）。

1-2-3 糞便サンプルからの *C. jejuni* の分離

各サンプルを、mCCDA (modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar; CM0739 及び SR0155 (Oxoid Ltd., Cambridge, UK)) に塗布し、48～72時間、37℃で AnaeroPak Campyro（三菱ガス化学）を用いて微好気培養した。*C. jejuni* を疑うコロニー2つを釣菌し、5%馬脱線維血液加ミューラヒントン寒天培地（Oxoid Ltd., Cambridge, UK）に単離増菌し、グラム陰性コマ状又はらせん状桿菌の形態、オキシダーゼ陽性で、好気条件下での発育を認めないことを確認した後、馬尿酸分解酵素遺伝子を標的とするPCR[Linton *et al.*, 1997]により同定した。PCRのテンプレートは、500 μ lの滅菌蒸留水に1 μ l用白金耳を用いて1白金耳の菌を懸濁し、100℃で10分間加熱後、12,000 rpmで10分遠心分離した上清を用い、使用時まで-20℃で保存した。

1-2-4 分離菌株の型別

flaA 遺伝子の PCR 増幅産物の制限酵素 *DdeI* 切断による RFLP は Chumara の方法により行った [Chuma *et al.*, 1997]。RFLP に基づく *flaA* の型別は既報に基づき実施した [Ishihara *et al.*, 2006]。互いに異なる RFLP 型を示す代表株について MLST を行った [Dingle *et al.*, 2001]。ST (sequence type) 及び CC (clonal complex) は、PubMLST data bank (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) によって割り当てられた。解析した遺伝子のうち 4 つの遺伝子の塩基配列が同一であった場合、それらの菌株は同一の CC に割り当てた [Dingle *et al.*, 2001]。互いに異なる RFLP 型を示す代表株について、Penner と Hennessy [1980] の方法に準拠し、市販血清 (デンカ生研) を用いて京都府保健環境研究所において血清型別を行った。

同時に、以前に農場 1 において分離された 3 株の *C. jejuni* (Cj15-58, Cj15-46 及び Cj15-166) [Ishihara *et al.*, 2006] 並びに農場 1 から北東 47 km に位置する採卵鶏農場で分離された Cj17-53 株を参照株として用いた。

1-2-5 農場内環境サンプルからの *C. jejuni* の分離

農場 1 において、2003 年 4 月から 2010 年 12 月までの期間に、9 鶏舎で捕獲した 28 匹のクマネズミ (*Rattus rattus*) 腸管内容、2 鶏舎で捕獲した 3 匹の昆虫、及び 1 鶏舎で捕獲したトカゲ上目に属すると考えられる爬虫類 1 匹の腸管内容、9 鶏舎で採取したげっ歯類の糞便 (19 検体)、2 鶏舎の周辺で採取した管理者の飼養犬及び農場内で頻繁に目撃されていた野良猫のものと考えられる糞便 (各 1 検体)、4 鶏舎の周辺で採取した野鳥の糞便 (25 検体)、飼料 (30 検体)、敷料 (6 検体)、3 鶏舎の給水器内の水 (63 検体)、2 鶏舎で採取した塵埃 (6 検体)、6 鶏舎の周辺で採取した土壌 (15 検体)、従業員の長靴の拭き

取り（14 検体）、並びに孵卵場 I からヒナの輸送時に使用した敷料（3 検体）を供試した。動物の糞便サンプルは、mCCDA に塗布した。拭き取りサンプルはニュートリエントブイヨン No. 2 にプレストンカンピロバクター選択サプリメント(SR117)（Oxoid Ltd., Cambridge, UK）、10%馬脱線維血液を添加した増菌培地を用いて 42°C で 24 時間培養し、mCCDA に塗布した。*C. jejuni* の同定は上記のとおり実施した。

1-2-6 2012 年における農場 1 敷地内及び周辺の野生動物行動調査と野生動物糞便からの *C. jejuni* の分離

農場 1 に 2012 年 12 月 6 日から 20 日まで赤外線センサーカメラ（トレイルカメラ 5210；LTL Acorn）を設置した（図 1）。2012 年 11 月 26 日に農場 1 の飼養者がイタチを目撃した 7 号鶏舎近くのポイント①に、2012 年 12 月 6 日午後から 12 日午前までの 6 日間カメラを設置した。12 月 10 日の積雪後に野生動物の足跡が多数確認されたポイント②に 12 月 12 日午前から 14 日午後にかけて設置した。さらに、雪上の野生動物の足跡の動線から、野生動物の農場への侵入経路と考えられたポイント③にカメラを移動し、12 月 14 日午後から 20 日午後にかけて撮影した。続いて、農場 1 と農場 4 の間の野生動物の移動を確認するため、農場 4 のポイント④に、農場 1 の方向を撮影範囲として 2012 年 12 月 20 日午後から 25 日午後にかけて設置した。使用したカメラは、昼間は可視光カメラ、夜間は赤外線カメラとして撮影することができ、15 分間隔で赤外線熱の変化を感知するセンサーを作動させ、作動時に撮影範囲内で物体が動いた場合のみ撮影する設定とした。また、雪上の足跡の形状を京都府中丹広域振興局の野生鳥獣担当者とともに確認し、動物種を推定した。さらに、野生動物の糞便の内容物を観察した。

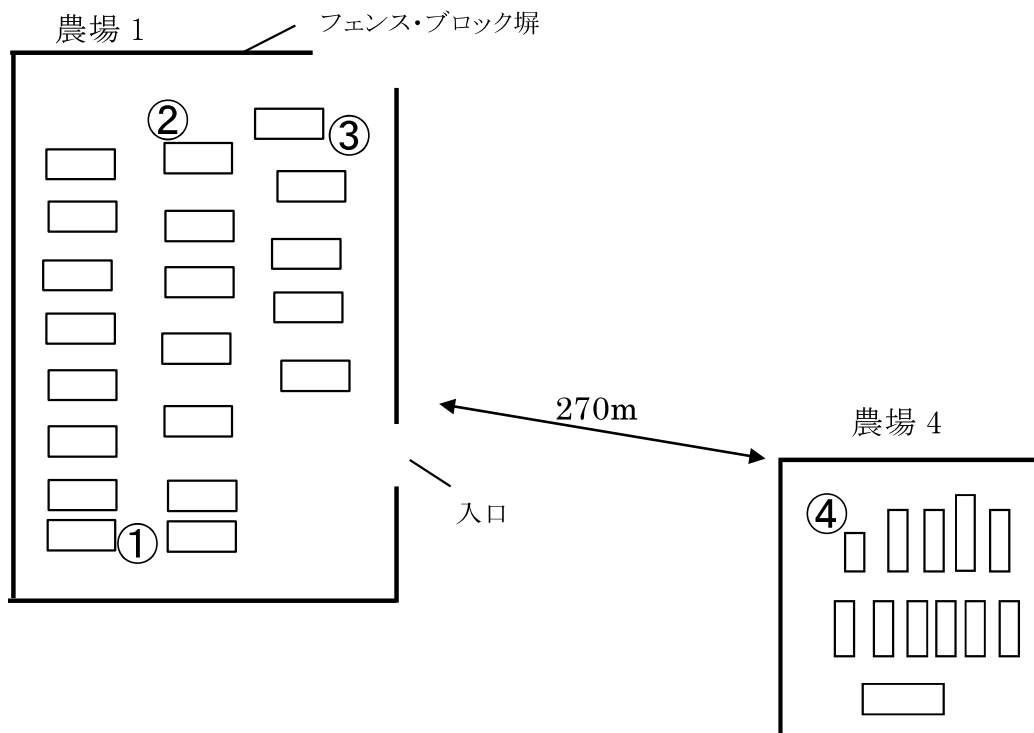


図1. 農場 1 及び4の位置関係並びに鶏舎配置図

長方形は鶏舎の配置を示す. 丸数字は、赤外線センサーカメラ設置地点を示す. ①には 2012 年 12 月 6 日から 12 日まで、②には 12 月 12 日から 14 日まで、③には 12 月 14 日から 20 日まで、④には 12 月 20 日から 25 日まで、それぞれ設置し撮影した.

野生動物の糞便からの菌分離は、2012年3月に7号鶏舎前の飼料タンク周辺にカラス (*Corvus sp.*) が群れていたため、形状からカラスが排出したと考えられる新鮮な1検体、2012年11月21日から12月14日までの間に農場1の敷地内で採取し、京都府職員の野生鳥獣担当者がニホンジカ (*Cervus nippon*) と判断した6検体、捕獲用の檻に侵入したイタチ (*Mustela sp.*) から、解放前に採取した1検体、並びに動物種が不明で形状から哺乳動物と考えられる5検体及び野鳥3検体について実施した。検体を mCCDA に直接塗抹したほか、上述の増菌培養を行った。

1-2-7 鶏糞便由来 *C. jejuni* のマウスに対する経口接種試験

3週齢の ddY 系の SPF マウス 5 頭 (体重 18.8~20.3 g) を実験室の動物飼育用安全キャビネット内で飼育した (図 2)。23 日齢時に採取した糞便からカンピロバクターが分離されないことを増菌培養により確認した。2006 年 11 月 21 日に農場 1 の 31 日齢の鶏盲腸便から分離した *C. jejuni* Cj18-5 株を、滅菌生理食塩水で 10^5 cfu/ml に調製した後、1 頭あたり 0.1 ml をマウス用ゾンデを用いて経口接種した。1、3、5、7、14、21 及び 28 日後の糞便をそれぞれ滅菌チューブに回収、秤量し、滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈し、mCCDA 寒天培地に 0.025 ml ずつ塗抹して 48 時間微好気培養後、菌数を測定した。同時に、糞便 0.08~0.23 グラムを増菌培養し、*C. jejuni* の分離を試みた。

1-3 結果

4 つの肉用鶏農場の鶏糞便 (565 検体) から 258 株の *C. jejuni* が分離された (表 1)。生産サイクル 1 及び 2 のモニタリングの結果、*C. jejuni* は鶏が 34 日齢から 39 日齢に達した後に初めて分離され、出荷まで断続的に分離された。生



図2. 安全キャビネット内で接種試験中のマウス

表1. 鶏糞便からの*C. jejuni*分離成績と*flaA*遺伝子型別

| 農場No. | 生産サイクル | ふ化場 | <i>C. jejuni</i> が分離された鶏舎 | <i>C. jejuni</i> が分離された糞便 | 飼養期間 | 採材月日と分離成績 ^c | <i>C. jejuni</i> が分離された鶏の日齢 | <i>flaA</i> タイプ (分離株数) |
|-------|--------|-----|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
| #1 | 1 | I | 2/2 ^a | 57/140 ^b | 2003年7月4日 - 9月4日 | 7月17日 7月24日 7月31日 8月7日 8月14日 8月21日 8月28日 | 34-55 | A3 (78), A5 (33) |
| 2 | 1 | I | 12/14 | 106/275 ^d | 2003年11月28日 - 2004年2月3日 | 12月22日 1月7日 1月16日 1月23日 1月30日 | 39-57 | A4 (18), A6 (8) ^d |
| 3 | F | 1/1 | 1/1 | 8/15 | 2004年9月2日 - 11月2日 | 10月7日 10月21日 | 34-39 | A8 (12) |
| | K | 2/2 | 23/30 | | | 10月7日 10月21日 | 35-49 | A8 (9), A9 (1) |
| 4 | F | 1/4 | 1/20 | 1/20 | 2004年11月24日 - 2005年1月21日 | 1月18日 | 52 | A3 (2) |
| 5 | F | 2/2 | 10/10 | 10/10 | 2005年2月26日 - 4月20日 | 4月18日 | 51 | A8 (2) |
| 6 | F | 1/1 | 1/1 | 5/5 | 2005年7月12日 - 9月12日 | 8月26日 | 45 | A10 (2) |
| | K | 1/1 | 1/1 | 5/5 | | 8月26日 | 38 | A11 (2) |
| 7 | M | 1/1 | 2/5 | 2/5 | 2005年10月12日 - 12月5日 | 11月18日 | 48 | A10 (2) |
| 8 | Y | 1/1 | 3/5 | 3/5 | 2005年12月10日 - 2006年1月25日 | 1月17日 | 39 | A10 (2) |
| 9 | K | 1/1 | 2/5 | 2/5 | 2006年10月20日 - 12月15日 | 11月21日 | 31 | A12 (2) |
| 10 | F | 2/2 | 8/10 | 8/10 | 2012年1月13日 - 3月2日 | 3月2日 | 48 | A3(5),A11(1) |
| #2 | 11 | I | 2/2 | 10/10 | 2003年10月23日 - 12月17日 | 12月5日 | 42, 43 | A6 (19) |
| #3 | 12 | F | 2/2 | 9/10 | 2005年1月25日 - 3月19日 | 3月9日 | 43 | A13 (9) |
| #4 | 13 | B | 1/1 | 1/5 | 2004年10月5日 - 12月28日 | 10月21日 | 16 | A8 (3) |
| | 14 | B | 1/1 | 1/5 | 2005年6月6日 - 8月28日 | 8月8日 | 63 | A10 (1) |
| | 15 | B | 1/1 | 2/5 | 2006年9月22日 - 12月12日 | 12月4日 | 73 | A11 (2) |
| | 16 | B | 1/1 | 5/5 | 2012年1月25日 - 4月15日 | 3月14日 | 48 | A3(2) |

^a *C. jejuni* が分離された鶏舎の数 / 調査鶏舎数

^b *C. jejuni* が分離された糞便の数 / 調査糞便数

^c 下線は、*C. jejuni* の分離を示す。

^d 既報 (Ishihara et al., 2006) の成績を含む。

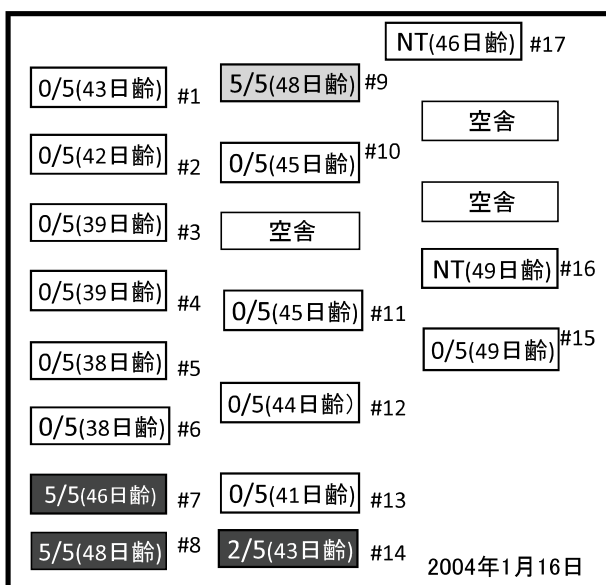
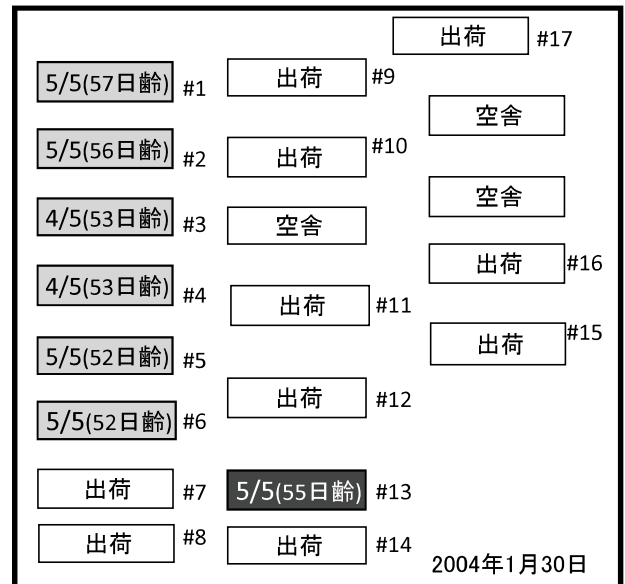
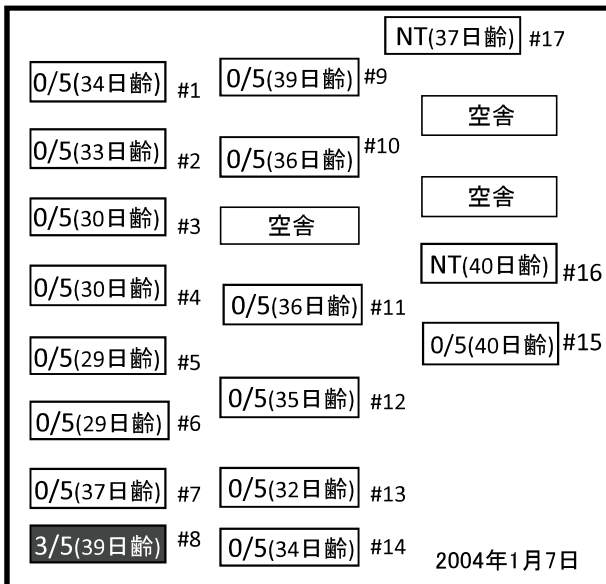
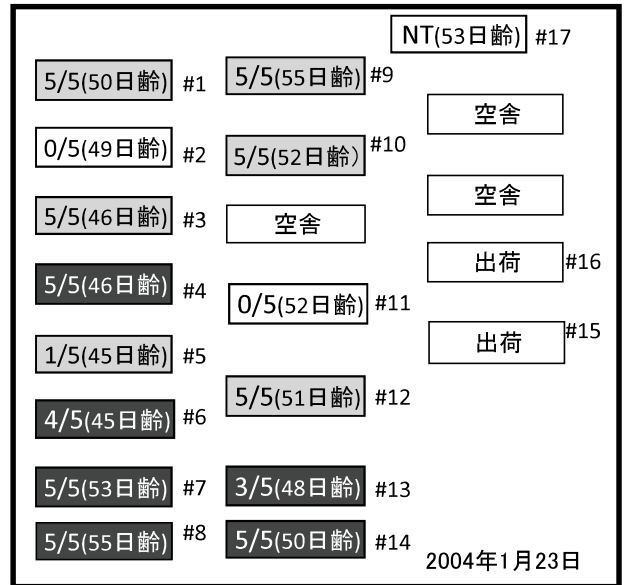
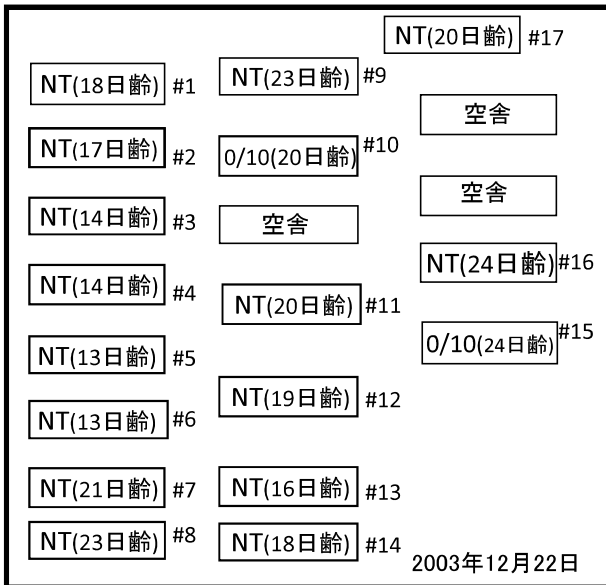


図3. 生産サイクル2における各採材日の *C. jejuni* 分離状況

□ は鶏舎、□ の右の番号は鶏舎番号を示す。
 □ 及び □ は、それぞれ、*flaA*タイプA4及びA6の *C. jejuni* の分離を示す。
 □ は調査したすべての鶏から *C. jejuni* が分離されなかった鶏舎を示す。
 □ の中の数値は、*C. jejuni* が分離された鶏糞便数 / 調査糞便数、括弧内は日齢を示す。
 NT、調査せず (Not tested).
 * 2004年1月7日の#8 鶏舎における *C. jejuni* 分離状況及び *flaA*タイプは既報 (Ishihara *et al.*, 2006) の成績による。

産サイクル 2 の各採材日及び各鶏舎における *C. jejuni* 分離成績を図 3 に示した。鶏が 39 日齢に達した 2004 年 1 月 7 日に 8 号のウィンドウレス鶏舎で初めて *C. jejuni* が分離され、次いで 2004 年 1 月 16 日に、ウィンドウレス鶏舎の 7、8 号及び 14 号鶏舎並びに開放の 9 号鶏舎の各鶏群から分離された。1 月 23 日には 1、3-10 号、12、13 及び 14 号鶏舎の各鶏群から分離された。さらに 1 月 30 日には、出荷済みの鶏舎を除き、これら全ての鶏舎の各鶏群から分離された。しかし、11 及び 15 号鶏舎の各鶏群からは、調査期間中 *C. jejuni* が分離されなかった。農場 1 におけるサイクル 3 から 10 の期間（サイクル 4 を除く）に採取した検体、並びに農場 2 及び農場 3 で採取した糞便検体のほとんどすべてから *C. jejuni* が分離された。農場 4 の各生産サイクルにおいて採取した糞便検体のうち、1 ないし 5 検体から *C. jejuni* が分離された。

糞便由来の 215 株を RFLP 解析した結果、分離菌株は異なる 10 の制限酵素切断パターンを示した（図 4）。このうち 4 つ（タイプ A3, A4, A5 及び A6）は、以前分離された菌株 [Ishihara *et al.*, 2006] のパターンと同一であった。その他のパターンを、A8 から A13 と呼称することとした。

農場 1 の生産サイクル 1 のうち、2003 年 8 月 7 日及び 8 月 14 日に 2 鶏舎の鶏から分離された菌株は RFLP 解析によりタイプ A3 に属していた。その後、両鶏舎からタイプ A3 と A5 の菌が分離された。そこで、生産サイクル 2 から 10 において分離された菌株のうち代表株について *flaA* に基づく RFLP 型別を行った。生産サイクル 2 では、13 鶏舎のうち開放鶏舎の 7 鶏舎から分離された菌はタイプ A4、ウィンドウレス鶏舎の 2 鶏舎（4 床）から分離された菌はタイプ A6 に属した。残る 2 つの開放鶏舎の鶏からは初めタイプ A6 が分離され、翌週には A4 が分離された（図 3）。生産サイクル 3 の鶏から分離された菌は 1 株（タイプ A9）を除き、すべて A8 であった。このように、生産

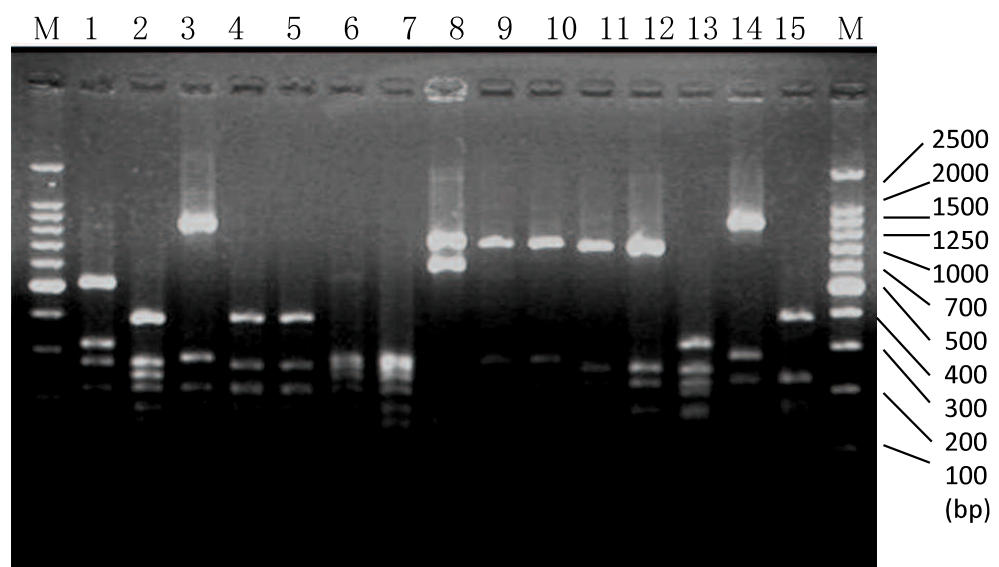


図4. *C. jejuni* 代表株における *flaA* 遺伝子PCR産物のRFLP型
 レーン1, Cj15-58 (タイプA3) ; 2, Cj15-46 (A4); 3, Cj15-166 (A5); 4, Cj15-
 269 (A6); 5, Cj16-133 (A6); 6, Cj16-235 (A8); 7, Cj16-231 (A8); 8, Cj16-
 244 (A9); 9, Cj17-54 (A10); 10, Cj17-49 (A10); 11, Cj17-42 (A11); 12,
 Cj18-19 (A11); 13, Cj18-5 (A12); 14, Cj17-5 (A13); 15, Cj17-53 (A14); M,
 分子量マーカー. マーカーの各分子量はパネル右側に記載.

サイクル 1 から 5 においては、異なるタイプの菌株がサイクルごとに分離された。一方、生産サイクル 6 から 8 においては、異なる 3 つの孵卵場 (F, M 及び Y) から導入された鶏より分離された菌株すべてがタイプ A10 に属した。タイプ A6 に属する菌が農場 2 の鶏から 2003 年 12 月に分離され、この A6 に属する菌が 2004 年 1 月に農場 1 から分離された。タイプ A13 に属する菌は、農場 3 のみから分離された。2004 年 10 月から 2012 年 3 月にかけて農場 4 から分離された菌はタイプ A3、A8、A10 及び A11 に属していた。これらのタイプの菌は、同時期に農場 1 でも分離されていた。

RFLP タイプ A3, A4, A5, A6, A8, A9, A10, A11, A12 及び A13 の代表株 (計 14 株) に加え、RFLP タイプ A14 の採卵鶏農場由来 Cj17-53 株を MLST 解析に供した。同一の RFLP タイプ (A6, A8, A10 及び A11) に属する各 2 株は、それぞれ同じ塩基配列のハウスキーピング遺伝子を保有した (表 2)。また、異なる RFLP タイプに属する菌株は、それぞれ異なる塩基配列のハウスキーピング遺伝子を保有していた。RFLP タイプ A11, A12 及び A13 に属する株は、きわめて類似する塩基配列のハウスキーピング遺伝子の組み合わせを保有し、これらの株は、それぞれ、農場 1、農場 1 及び農場 3 から分離された。

RFLP タイプが異なる代表株 (計 15 株) のうち、タイプ A4 及びタイプ A10 はいずれも血清型 O:2 に型別された。代表株の半数は型別不能であった。

農場 1 において 2003 年 6 月に 5 検体の飲水から、また、同 8 月に 6 検体の飲水及び 2 検体の長靴の拭き取りから *C. jejuni* が分離された。これ以外の環境由来検体からは本菌は分離されなかった。これらのうち 2003 年 8 月に分離された飲水及び長靴拭き取り由来の計 9 株を RFLP 解析に供したところ、飲水由来 5 株はタイプ A3、他の飲水由来 2 株及び長靴拭き取り由来 2 株はともにタイプ A5 に属していた。これらのタイプの菌は同じ農場 (農場 1) の鶏からも

表2. *flaA*タイプが異なる*C. jejuni*代表株のMultilocus sequence typing (MLST) 及び血清型

| 菌株番号 | 分離日 | 農場 | <i>flaA</i> タイプ | MLST解析に用いた遺伝子のプロファイル | | | | | | | | | | Sequence Type no. | Clonal complex | 血清型 |
|-----------------------|----------|----------------|-----------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|------|-----------------|-------------------|-----------------|-----|
| | | | | <i>aspA</i> | <i>glnA</i> | <i>gltA</i> | <i>glyA</i> | <i>pgm</i> | <i>tkt</i> | <i>uncA</i> | | | | | | |
| Cj15-58 ^a | 2003年6月 | #1 | A3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 2 | 1 | 5 | 21 | 21 | 21 | 21 | UT ^d | |
| Cj15-46 ^a | 2003年6月 | #1 | A4 | 266 | 2 | 2 | 72 | 22 | 405 | 6 | 4385 | 4385 | UA ^c | O:2 | | |
| Cj15-166 ^a | 2003年8月 | #1 | A5 | 24 | 17 | 2 | 10 | 23 | 3 | 12 | 440 | 440 | 443 | O:37 | | |
| Cj15-269 | 2003年12月 | #2 | A6 | 4 | 7 | 10 | 4 | 1 | 7 | 1 | 45 | 45 | 45 | O:12 | | |
| Cj16-133 | 2004年1月 | #1 | A6 | 4 | 7 | 10 | 4 | 1 | 7 | 1 | 45 | 45 | 45 | O:12 | | |
| Cj16-235 | 2004年10月 | #1 | A8 | 18 | 70 | 77 | 97 | 205 | 86 | 47 | 3941 | 3941 | UA | UT | | |
| Cj16-231 | 2004年10月 | #4 | A8 | 18 | 70 | 77 | 97 | 205 | 86 | 47 | 3941 | 3941 | UA | UT | | |
| Cj16-244 | 2004年10月 | #1 | A9 | 27 | 33 | 22 | 390 | 43 | 350 | 31 | 4386 | 4386 | 1275 | UT | | |
| Cj17-54 | 2005年11月 | #1 | A10 | 7 | 2 | 5 | 10 | 10 | 37 | 1 | 1035 | 1035 | UA | O:2 | | |
| Cj17-49 | 2005年8月 | #4 | A10 | 7 | 2 | 5 | 10 | 10 | 37 | 1 | 1035 | 1035 | UA | O:2 | | |
| Cj17-42 | 2005年8月 | #1 | A11 | 24 | 17 | 12 | 2 | 2 | 3 | 1 | 4389 | 4389 | UA | UT | | |
| Cj18-19 | 2006年12月 | #4 | A11 | 24 | 17 | 12 | 2 | 2 | 3 | 1 | 4389 | 4389 | UA | UT | | |
| Cj18-5 | 2006年11月 | #1 | A12 | 24 | 17 | 297 | 2 | 2 | 3 | 1 | 4388 | 4388 | UA | UT | | |
| Cj17-5 | 2005年3月 | #3 | A13 | 24 | 17 | 12 | 3 | 2 | 1 | 1 | 4390 | 4390 | UA | O:5 | | |
| Cj17-53 ^b | 2005年8月 | E ^b | A14 | 4 | 338 | 70 | 10 | 1 | 7 | 1 | 4391 | 4391 | 45 | UT | | |

^a 既報 (Ishihara ら、2006) の成績.

^b 採卵鶏農場 (農場E) の糞便サンプルから分離された株 (Cj 17-53).

^c これまで報告されたCCに割り当てられない (unassigned).

^d 型別不能 (untypeable).

2003年8月に分離された。

農場1に設置したカメラにより観察された野生動物種と出現時間帯を図5に示した。撮影ポイント①で夜間に、耳の大きさ及び尾長からクマネズミと判断された動物を確認した(図6a)。ポイント②で昼間にホンドギツネ (*Vulpes vulpes japonica*) を、夜間に複数のニホンジカを認めた。ポイント③では、昼間にキジ (*Phasianus versicolor*) を(図6b)、夜間に複数で行動するニホンジカを観察し(図6c)、農場敷地内の雑草を食べている様子が見られた。また、雪上で採取した野鳥の糞便中に未消化の植物の実が多数認められ、農場内に生育するヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) の実と同一のものであった。足跡はニホンジカ及びキジのものであり(図7)、足跡を辿った結果、農場1へのニホンジカの主な侵入路は、農場境界のフェンスやブロック塀が途切れている箇所であった(図1)。農場4に設置したカメラでは、夜間に両農場の境界側から農場4に侵入するニホンジカを認めた(図6d)。

2012年3月に7号鶏舎前で採取したカラスの糞から *C. jejuni* が分離され、その RFLP タイプは2003年から2012年の調査で農場1~4の鶏から分離された菌株のタイプ (A3~A13) とは異なっていたため A15 と呼称した(図8)。また、農場1の敷地内で2012年11月21日から12月14日までに採取した野生動物の糞からは、*C. jejuni* は検出されなかった。

C. jejuni を経口接種した5頭のマウスのうち、1頭の糞便から、接種24時間後に *C. jejuni* の排菌を確認し、28日後まで持続的な排菌を認め、その生菌数は、 $1.2 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5$ cfu/g で推移した(表3)。

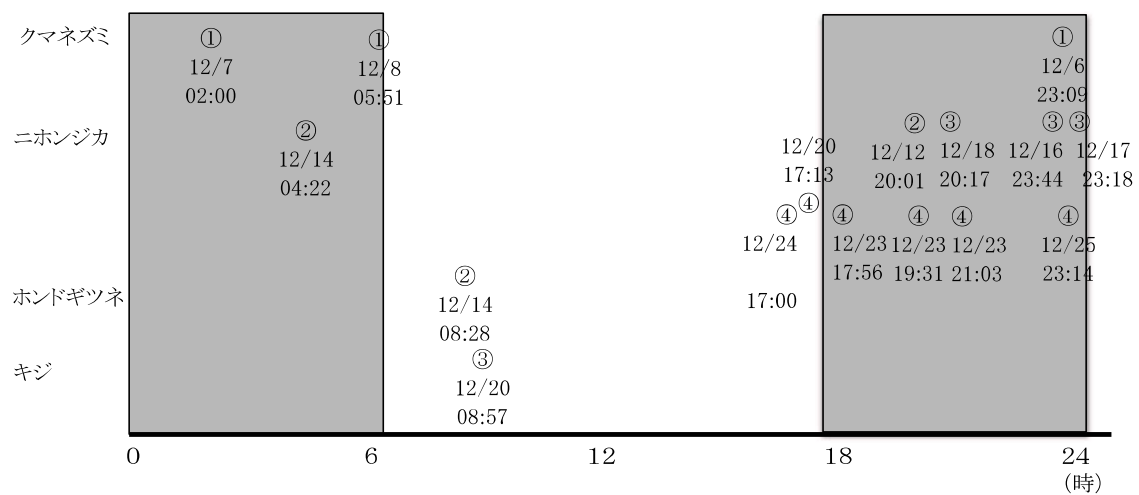


図5. 赤外線センサーカメラで確認した農場1及び4における野生動物の出現日及び時刻. 丸数字は撮影地点を示す(図1参照). 丸数字に各種動物の出現日及び時刻を付記した.

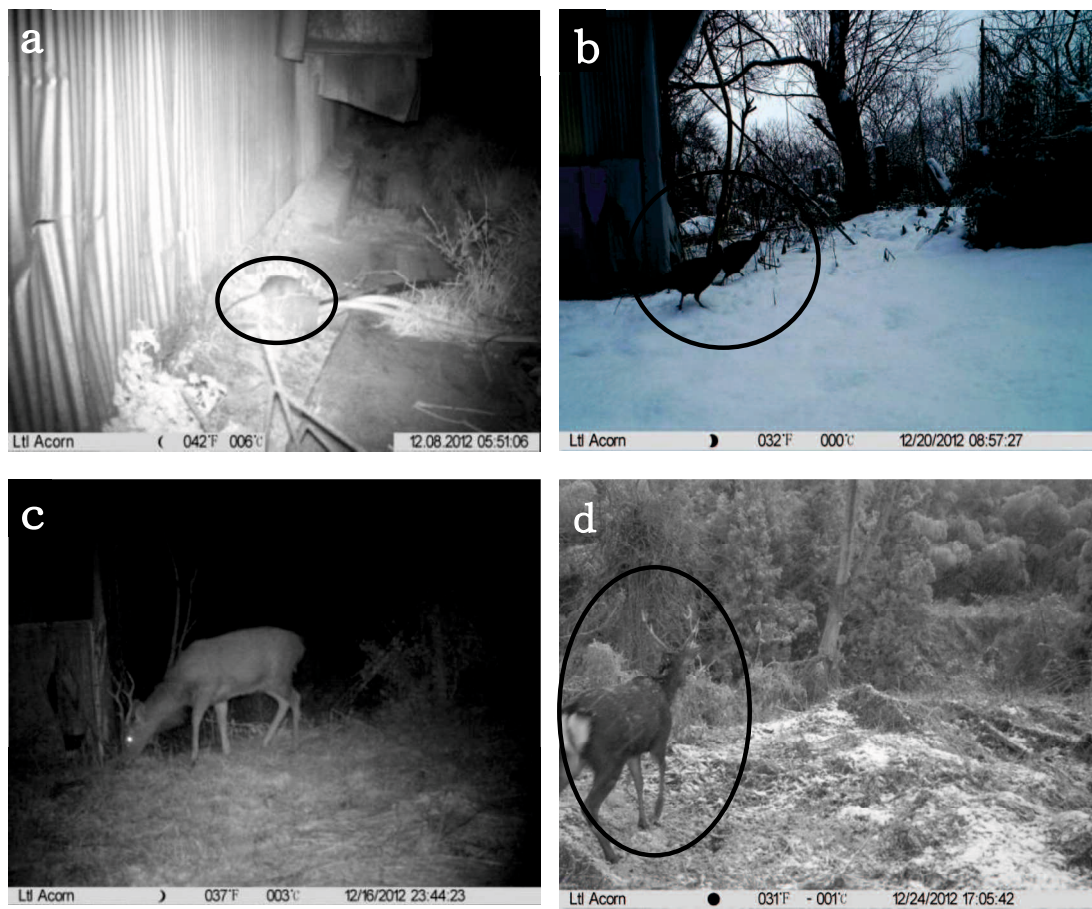


図6. 農場1及び4に設置した赤外線センサーカメラの撮影画像

- a 農場1の①地点で撮影したクマネズミ
- b 農場1の③地点で撮影したキジ
- c 農場1の③地点で撮影したニホンジカ
- d 農場4の④地点で撮影したニホンジカ



図7. 農場1敷地の雪上で確認した野生動物の足跡と糞

- a ニホンジカの足跡
- b ニホンジカの糞
- c キジの足跡

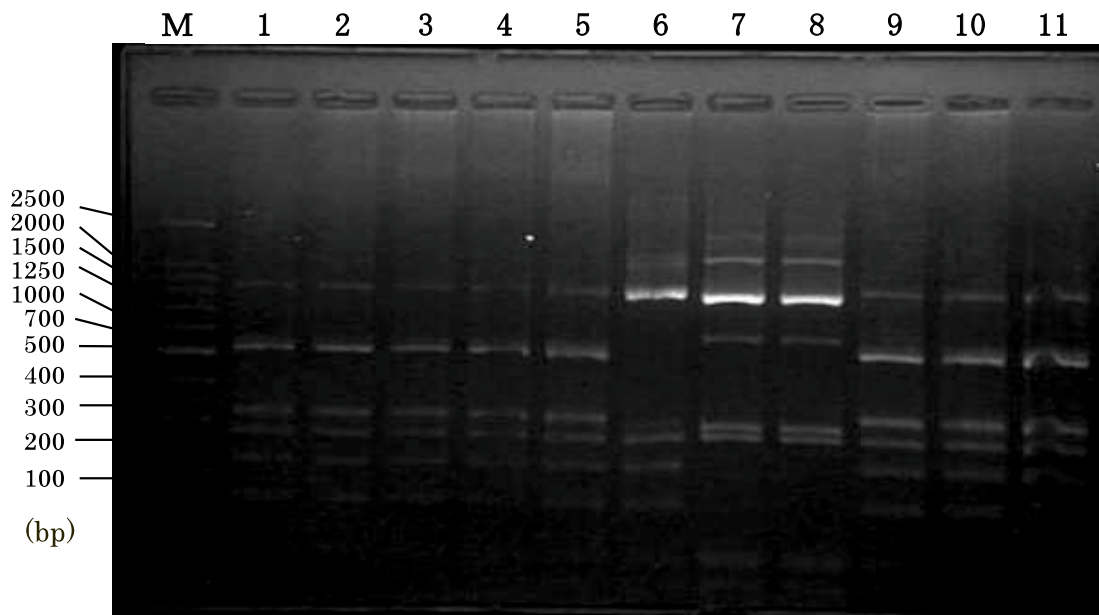


図 8. 2012 年の調査で分離された農場 1 及び 4 の鶏、並びにカラス糞便由来 *C. jejuni* の *flaA* 遺伝子 PCR 産物の RFLP 型別

レーン M, 分子量マーカー; 1-6, 農場 1 で飼養された鶏の盲腸便由来株 (レーン 1-5 はタイプ A3、レーン 6 は A11); 7 及び 8, 農場 1 敷地内で採取したカラス糞便由来株 (A15); 9 及び 10, 農場 4 で飼養された鶏の盲腸便由来株 (A3); 11, 2003 年に農場 1 の鶏より分離された Cj15-58 株 (A3). マーカーの各分子量はパネル左側に記載.

表3. *C. jejuni* 経口接種マウスにおける糞便への排菌^a

| 接種後日数 | マウス# | | | | |
|-------|-----------------|------|------|-----------------------|------|
| | No.1 | No.2 | No.3 | No.4 | No.5 |
| 1 | — ^b | — | — | 1.2 x 10 ³ | — |
| 3 | — | — | — | + ^c | — |
| 5 | — | — | — | + | — |
| 7 | — | — | — | 2.1 x 10 ⁴ | — |
| 10 | NT ^d | NT | NT | 4.4 x 10 ⁴ | NT |
| 14 | — | — | — | 3.0 x 10 ⁴ | — |
| 21 | NT | NT | NT | 9.4 x 10 ⁴ | NT |
| 28 | — | — | — | 1.1 x 10 ⁵ | — |

^a 糞便1グラムあたり生菌数

^b —、分離されず

^c +、菌検出、生菌数未計測

^d NT、検査せず (Not tested.)

1-4 考察

農場1の鶏が34日齢から39日齢に達した時に糞便から初めて *C. jejuni* が分離された。この成績は、商業農場の2~3週齢以前のブロイラー鶏からは、まれにしか本菌が分離されず [Berndtson *et al.*, 1996; Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995]、日齢依存性に *C. jejuni* が鶏群から分離される [Evans and Sayers, 2000] という従前の報告に一致する。

このたびの成績から、鶏群に *C. jejuni* が定着するのは、ヒナがブロイラー鶏舎に導入された後であることが示唆された。すなわち、農場1の連続する生産サイクル6、7及び8（2005年7月から2006年1月）で、複数の孵卵場から導入された鶏から同じRFLPタイプ（A10）の菌が分離されたことから、直前に飼養していた鶏群に定着していた菌が農場に残存していたと思われる。一方、生産サイクル1では、RFLPタイプA5の菌は異なる2鶏舎の鶏から分離された。同じRFLPタイプ（A5）の *C. jejuni* が、同一鶏舎の鶏の糞便から分離された後に飲水及び長靴から分離されたことから、糞便中の *C. jejuni* が給水器内の飲水に混入あるいは長靴に付着して鶏舎内における菌の伝播に関与したほか、従業員が両鶏舎を行き来することにより鶏舎間に伝播した可能性が考えられる。生産サイクル2では、ウィンドウレス鶏舎は全てRFLPタイプA6であり、開放鶏舎は9鶏舎中7鶏舎が全てA4タイプ、残り2鶏舎がA6タイプとA4タイプあった。このことから、農場には複数の汚染源が存在すると考えられた。また、開放鶏舎とウィンドウレス鶏舎で分離菌株のRFLPタイプが概ね二分されていたのは鶏舎の担当者が異なっていたことに関連があると思われる。しかし、月に2~3回程度ウィンドウレス鶏舎の担当者が、開放鶏舎の担当者に代わり管理作業あるいは鶏舎の補修作業のため開放鶏舎に立ち入ることがあったため、同一タイプの菌が開放及びウィンドウレスの両鶏舎に伝播した可能性がある。Wilsonら

[2009] は開放鶏舎において飼養される鶏から分離された *C. jejuni* の遺伝子型は多様性に富んでいたことを報告しており、複数の伝播経路が存在することも考えられる。

MLST において CC21 及び CC45 に属する菌が本研究において分離された。これらの CC は人及び家禽由来株においてこれまでも報告されている [Dingle *et al.*, 2001; Korczak *et al.*, 2009; Griekspoor *et al.*, 2010; Hastings *et al.*, 2010]。しかし、本研究の半数以上の株で認められたハウスキーピング遺伝子の塩基配列の組み合わせは、これまで報告されていないものであった。MLST と RFLP による型別は 1 対 1 の相関を示した (表 2)。MLST における CC は、RFLP 解析から予測可能と報告されている [Djordjevic *et al.*, 2007]。したがって、養鶏産業における *C. jejuni* の疫学解析を行う上で両解析は有用であることが示唆された。

農場 1 及び 4 の鶏から、2004 年 10 月と 2005 年 8 月に再度分離された *C. jejuni* の MLST タイプ及び RFLP タイプは同一であった。これらの農場は 270 m の距離に位置しており、異なる孵卵場からひなを導入し、それぞれ異なる飼料を用いて飼養している。したがって、農場外の共通する起源の菌がこれらの農場に侵入した可能性が示唆された。

農場 1 敷地と農場 4 敷地とのあいだをニホンジカが夜間に移動した可能性が示された。すなわち、農場 1 における雪上の足跡より、フェンスの切れ目から侵入したと考えられるニホンジカが農場敷地内の雑草を採食し、また農場 4 では、農場 1 の方向から侵入する姿を確認した。しかし、このたびの調査で採取したニホンジカの糞便から *C. jejuni* は分離されなかったため、本菌の伝播に関与した直接的な証拠は得られなかった。

本研究においてカラスの糞便から *C. jejuni* が分離された。分離株の RFLP タ

イブは、同時期に農場1及び4の鶏群から分離した株とは異なり、また、2003年から2006年に4つの農場から分離された株のタイプとも異なっていたものの、農場の鶏群から分離される *C. jejuni* のRFLPタイプは経年的に変化する傾向にあるため（表1）、カラス分離株が今後鶏群に伝播する可能性は否定できない。したがって、飼養衛生管理基準に記載されている防鳥ネットの設置や、野生動物侵入防止及び飼養者の靴底消毒を怠るべきではない。一方、ネズミが本菌を媒介する可能性を示唆した報告 [津越ら, 1993] がなされている。鶏舎内で捕獲したクマネズミの腸内容や鶏舎内で採取したネズミの糞便からは *C. jejuni* は分離されなかった。しかし、鶏由来 *C. jejuni* をマウス5頭に経口接種したところ、1頭において4週間にわたり持続的な排菌が確認された。したがって、鶏舎内で本菌に汚染された鶏飼料等をげっ歯類が摂食することにより腸管内にカンピロバクターが定着し排菌する可能性があり、げっ歯類の駆除は防除対策の一つとして重要と考えられた。

MLST 解析に用いたハウスキーピング遺伝子の塩基配列がきわめて類似している菌が農場1、2及び3から分離された。これらの農場は同一の企業養鶏会社に所属し、同じ会社に所属する複数の孵卵場のヒナを導入していたことから、初生ヒナが *C. jejuni* を保菌していた可能性を完全に否定することはできない。Byrdら [2007] はブロイラーのヒナの輸送箱から *C. jejuni* を分離している。一方で、これらの農場（農場1、2、及び3）に当該会社の従業員が訪問し、共通の出荷カゴが利用され、飼料運送車、出荷用トラック等が乗り入れていたため、*C. jejuni* が持ち込まれた可能性もある。

本研究において、異なる孵卵場のヒナが導入されたブロイラー農場において、鶏の糞便から同一のRFLPタイプの菌が分離されたことから、農場に導入された後に *C. jejuni* を保菌した可能性、また、分離菌株の型別の成績から、直前の

鶏群に定着していた *C. jejuni* が農場に残存した可能性が示唆された。加えて、たとえ異なる養鶏会社に所属し、異なる孵卵場から導入されたヒナを飼養する農場であっても、地理的に近接する場合は、共通する起源に由来する *C. jejuni* が定着しうると考えられた。

第2章 異なる日齢で *Campylobacter jejuni* に暴露された鶏 における保菌と糞便への排菌

2-1 目的

C. jejuni は、ヒトの消化器感染症の重要な原因微生物の1つである。ブロイラー鶏は、しばしば本菌を消化管内に保菌しているため [Hermans *et al.*, 2012]、鶏肉が本菌ヒトへの伝播に重要な役割を果たしているものと考えられている。保菌鶏においては、*C. jejuni* が盲腸中に、その内容 1 グラムあたり 10^6 から 10^8 の生菌数で検出されている [Beery *et al.*, 1988; Meade *et al.*, 2009]。

コマーシャル農場のブロイラー鶏において、初めて *C. jejuni* が検出されるのは、鶏が 2~3 週齢に達した後と考えられている [Shreeve *et al.*, 2000; Stern, *et al.*, 2001b]。一方、これらの鶏が何日齢において本菌に暴露されているのかは明らかではない。加えて、2 週齢以前の鶏に本菌が定着している可能性を否定するものでもない。Ringoir ら [2007] は、2 日齢及び 14 日齢の鶏を用いた実験感染モデルにおいて、これらの鶏に本菌が定着することを報告している。しかし依然として、コマーシャル農場において、2 週齢以上のある日齢に達した鶏において初めて *C. jejuni* の定着が検出される理由は明らかではない。そこで、コマーシャル農場のブロイラー鶏における糞便への *C. jejuni* の排菌が本菌への暴露の日齢に依存している可能性を明らかにするため、本研究において、さまざまな日齢のブロイラー鶏に *C. jejuni* を接種し、糞便への排菌を調査した。同時に、感染実験に供した鶏が提供された同じ鶏群のヒナを、以前より *C. jejuni* の定着が認められていたコマーシャル農場において飼養し、その糞便中の *C. jejuni* のモニタリングを行った。

2-2 材料及び方法

2-2-1 供試鶏

2009年8月にふ化場からコマーシャル農場1に運ばれ農場敷地内に搬入された初生ヒナ9,000羽のうち50羽を、輸送トラック荷台から入手した。入手したヒナはコンクリート床面上に400×900mmのコンパネ4枚で囲った保育箱内で、敷き料に農場1から分与されたオガクズを用い、暖房は40W電球とエアコンを用いて飼育した。分与されたヒナの中から28羽を7つの群に分け、菌株接種数時間前に感染実験用アイソレーションボックスに移動した。これらの鶏には20日齢まで、硫酸コリスチン（10g力価/トン）及びノシヘプタイド（5g力価/トン）を添加した前期用配合飼料を、次いで40日齢まではノシヘプタイド（5g力価/トン）を添加した後期飼料を、引き続き飼料添加物を含まない仕上げ用飼料を給与した。これらの配合飼料は、全て農場1（7号鶏舎）の給餌ラインから入手した。飼料及び飲水は不断給与とした。孵化直後の糞便の検査により *Campylobacter* 属菌に感染していないことを細菌学的検査により確認した。

実験感染に供しない残りのヒナは農場1の7号鶏舎に導入された。これらの鶏は、上述と同じ飼料を与えられ、1週間毎に盲腸便検体により *C. jejuni* のモニタリングを行った（下記参照）。

2-2-2 接種菌株

第1章に記した、採卵鶏農場において分離された *C. jejuni* Cj17-53 株を供試した。保存菌株を5%馬脱線維血液添加ミューラヒントン培地において42°C、48時間微好気培養し、滅菌生理食塩水に 5.5×10^7 から 5.5×10^8 CFU/ml に調製し、その0.25 ml をマウス用ゾンデにより経口接種した。感染実験における

接種菌数は接種直後に菌液の生菌数を計測することにより算出した（表 4）。

2-2-3 接種実験

実験群 A から F の鶏に、それぞれ、0, 7, 14, 21, 28 及び 35 日齢に *C. jejuni* を接種した。加えて、対照群として 0 日齢の鶏に滅菌生理食塩水を与えた。接種後、鶏は接種前の隔離室に戻して飼養した。接種後 1, 2, 3, 5 及び 7 日目、並びに、その後、排出された糞便を、実験群 A, B 及び C では接種後 35 日まで、また、実験群 D, E 及び F、並びに対照群では接種後 49 日まで 7 日ごとに採取した。

14 日齢までは糞便量が少ないため回収した糞便全てを、21 日齢以降は糞便検体の一部を mCCDA に塗布し、42°C で 48 時間混合ガス(85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂)により微好気培養した。*Campylobacter* を疑うコロニーを 2 個釣菌し、グラム陰性桿菌で、オキシダーゼ陽性、好氣的条件で発育しないことを確認し、PCR 法 [Linton *et al.*, 1997] により菌種同定した。21 日齢以降は残りの糞便検体を秤量し、滅菌生理食塩水により 10 倍段階希釈して mCCDA 培地に塗抹培養し、生菌数を計測した。35 日齢から 49 日齢に達した鶏はエーテル深麻酔により安楽殺し、盲腸内容の *C. jejuni* の検出を試みた。

7 日齢の鶏（実験群 C）における感染実験の再現性を確認するため、新たに 8 羽の鶏を 4 羽ずつ実験群と対照群に分けた。実験群には 6.3×10^7 CFU の菌を接種した。糞便検体からの *C. jejuni* 分離は上述のとおり実施された。2 羽を 63 日間、他の 2 羽は 84 日間飼養し、糞便への排菌を調査した。安楽殺後、肝臓、胆汁並びに空腸、盲腸及び回腸内容物を回収し、直接 mCCDA に塗抹するとともに、10%馬脱線維血液を添加したプレストン増菌培地（ニュートリエントブイヨン No.2 にプレストンカンピロバクター選択サプリメント(SR117)を添加)

表4. 実験的に *C. jejuni* を接種した鶏の糞便及び剖検時の盲腸内容からの本菌の分離

| 試験群 | 接種時日齢 | 接種後日数 | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-------|-------------------|---------|-----------------|-----|-----|-----|--------------------|------------------|------|------|------|------|------|--------------------------------------|
| | | 接種菌数 (CFU) | | 1 | 2 | 3 | 5 | 7 | 14 | 21 | 28 | 35 | | | |
| A | 0 | 6.3×10^7 | $2/4^a$ | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 ^e | 0/4 ^e | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| B | 7 | 4.0×10^8 | 0/4 | ND ^c | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 ^e | 0/4 ^e | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 ^b 1/4 ^b |
| C | 14 | 5.5×10^7 | 0/4 | ND | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 ^e | 0/4 ^e | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 ^d 2/4 |
| D | 21 | 2.9×10^8 | 0/4 | ND | 4/4 | 4/4 | 1/4 | 0/4 ^e | 4/4 ^f | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | n.a. |
| E | 28 | 5.0×10^8 | ND | 4/4 | ND | 4/4 | 4/4 | 3/4 ^f | 4/4 ^f | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | n.a. |
| F | 35 | 5.4×10^8 | 4/4 | ND | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 ^{f,g} | 4/4 ^f | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |

a) *C. jejuni* が分離された鶏の羽数 / 供試羽数

b) イタリアック表示は盲腸内容から *C. jejuni* が分離された鶏の羽数

c) 菌分離を行っていない (Not done)

d) 該当しない (Not applicable)

e-g) 異なる文字間で、*C. jejuni* が分離された鶏の羽数に有意差あり ($p < 0.05$)

を用いて 42°C で 24 時間増菌培養後、mCCDA に塗抹し 42°C で 48 時間微好気培養した。

2-2-4 *C. jejuni* 分離株の型別

flaA 遺伝子の PCR 増副産物の *DdeI* 切断断片長多形解析 (RFLP) を行った [Chuma *et al.*, 1997]。

2-2-5 ブロイラー農場における *C. jejuni* のモニタリング

鶏群を導入後、ブロイラー農場 1 の鶏盲腸便について、2009 年 8 月から 10 月にかけて *C. jejuni* のモニタリングを行った。5 羽の新鮮排泄盲腸便を Cary-Blaier 培地に採取し 4°C で実験室に輸送した。*C. jejuni* 分離及び型別は前述のとおり実施した。また、農場 1 において当該鶏群を導入する直前に鶏を飼養していた期間である 2009 年 6 月から 8 月にも同様のモニタリングを実施した。

2-2-6 統計学的解析

Fishier の正規分布解析により、実験群 A から F の接種 7 日及び 14 日後における *C. jejuni* 分離頻度を有意水準 1 % において評価した。採取した糞便における *C. jejuni* 生菌数を検討した実験群 D から F について、接種後日数と糞便中生菌数の対数値との相関を検討し、回帰直線を求めた。

2-3 結果

2-3-1 実験感染群における *C. jejuni* の分離

0 日齢で *C. jejuni* を接種した 4 羽 (実験群 A) において、接種 1 日後に 2 羽から本菌が分離されたが、その後、接種 28 日後まで接種菌株は分離されなかつ

た。接種 35 日後に、剖検時の盲腸内容から *C. jejuni* が分離されたが、糞便からは分離されなかった。7 日齢及び 14 日齢で *C. jejuni* を接種した各 4 羽（実験群 B 及び C）においては、35 日齢まですべての糞便から *C. jejuni* は分離されなかったが、それぞれ 2 羽の鶏の盲腸内容から本菌が分離された。これに対し、21 日齢、28 日齢及び 35 日齢で *C. jejuni* を接種した各 4 羽（実験群 D, E 及び F）においては、糞便から *C. jejuni* が断続的に分離され、42 日齢及び 49 日齢ではすべての鶏で排菌が認められた。実験的に接種した鶏から分離された *C. jejuni* の RFLP パターンは、接種した菌株と同じであった（図 9）。滅菌生理食塩水を投与した対照群からは *C. jejuni* は分離されなかった。

接種後 7 日において *C. jejuni* が分離された鶏の割合は、実験群 F が実験群 A から D よりも有意に高かった ($p < 0.05$) が、実験群 E と実験群 A から D の間には有意な差を認めなかった ($p = 0.14$)（表 4）。接種後 14 日において *C. jejuni* が分離された鶏の割合は、実験群 D 及び E が実験群 A から C よりも有意に高かった。

接種後 2 日及び 3 日目における、実験群 D, E 及び F の糞便中の *C. jejuni* の生菌数は 4.0×10^5 (CFU/g) から 1.7×10^8 に達し、最大値は接種後 3 日から 21 日目に 1.7×10^8 から 1.0×10^{10} であった（図 10）。盲腸内容の生菌数は実験群 D で 8.4×10^6 から 1.9×10^9 、実験群 E で 2.0×10^8 から 1.0×10^{10} 、実験群 F においては 1.3×10^7 から 2.0×10^9 であった。

採取した糞便における *C. jejuni* 生菌数を検討した実験群 D から F について、接種後日数と糞便中生菌数の対数値との回帰直線を求めたところ（図 10）、剖検時の生菌数が接種後 7 日における生菌数より多い傾向にあった。

7 日齢の鶏を用いた追加の接種実験において、接種 77 日後に 1 羽の盲腸便か

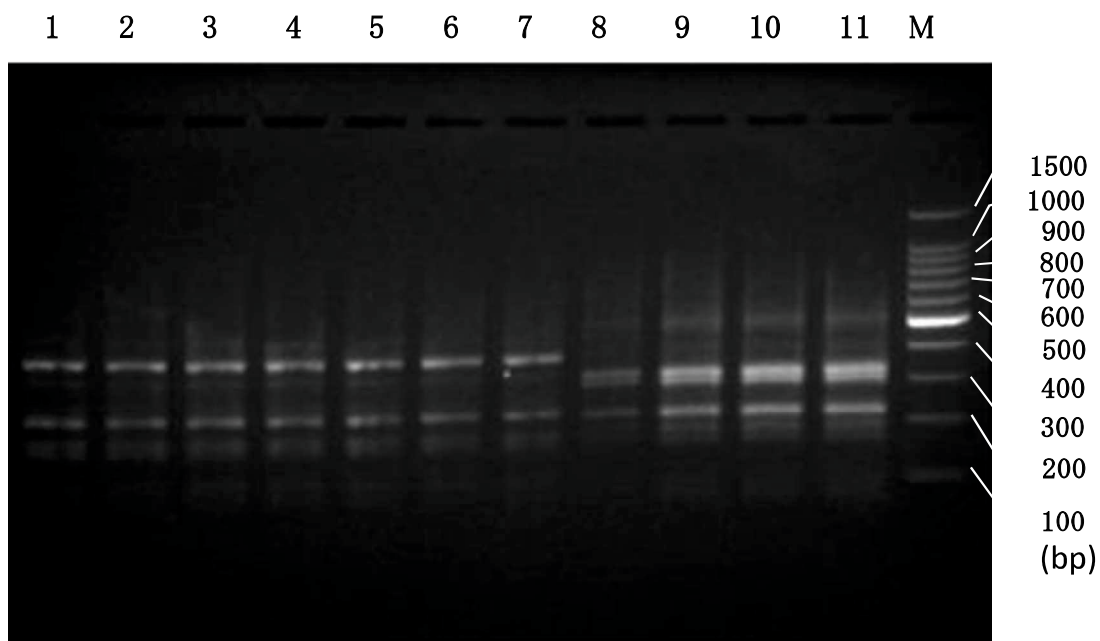


図9. 実験的接種鶏及びコマーシャル農場鶏から分離された *C. jejuni* 代表株の *flaA* タイプ

レーン1, 接種菌株; 2-4, A, B及びC群それぞれの鶏盲腸内容分離株; 5, 接種14日後のD群鶏の糞便分離株; 6, 接種7日後のE群鶏の糞便分離株; 7, 接種5日後のF群鶏の糞便分離株; 8-10, 28, 35, 43日齢のコマーシャル農場ブロイラー糞便分離株; 11, 調査対象鶏群の直前にコマーシャル農場で飼育されていたブロイラーの糞便分離株; M, 分子量マーカー. マーカーの各分子量はパネル右に示す.

(Log cfu/g)

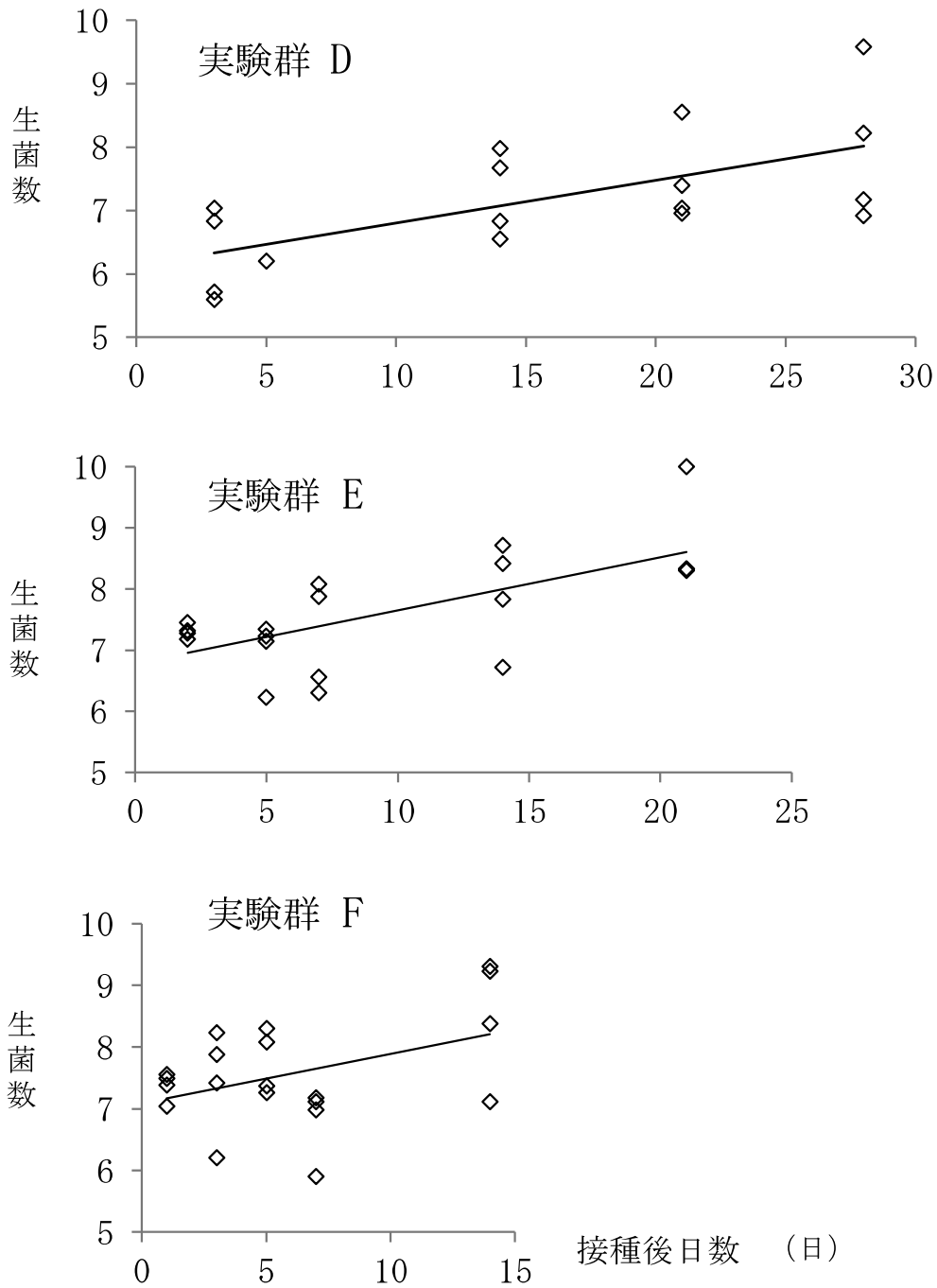


図10. *C. jejuni* 接種後の糞便中の生菌数の経日変化 (log cfu/g).

直線は、接種後日数と生菌数の回帰直線を示す。

ら *C. jejuni* が分離された。また、接種後 63 日目に剖検した 1 羽の胆汁から、別の 1 羽の盲腸及び回腸内容から本菌が分離された。接種後 84 日目に剖検に供した 2 羽の臓器及び腸管内容からは *C. jejuni* は分離されなかった。

2-3-2 コマーシャル農場における *C. jejuni* の分離

28 日齢に糞便中の *C. jejuni* の分離を試みた 5 羽のうち 2 羽の鶏から本菌が分離された。翌週に調査した 5 羽のうち 4 羽から、また、43 日齢では調査した 5 羽すべてから *C. jejuni* が分離された。当該鶏群の直前に飼養されていた鶏群においては、47 日齢に調査した 5 羽のうち 4 羽から本菌が分離されていた。コマーシャル農場の鶏から分離された菌株の RFLP パターンは全て同一で、接種実験に用いた菌株とは異なっていた (図 9)。

2-4 考察

C. jejuni の接種実験の結果から、若齢の鶏が本菌に暴露された場合、出荷日齢まで盲腸内に本菌を保菌することが示された。本研究において 0 日齢から 14 日齢の鶏に *C. jejuni* を経口的に接種したところ、これらの鶏が 42 日齢に達した時点で盲腸内容から本菌が分離された。しかしこれらの鶏の糞便からは、0 日齢で接種した 4 羽のうち 2 羽から接種後 1 日で分離された以外に、排菌を認めなかった。同様の成績は 7 日齢の鶏に接種した追加実験においても観察された。加えて、これらの鶏の盲腸内容から分離された *C. jejuni* の RFLP パターンは接種に用いた菌株と同じであった。これまでに、初生ヒナに *C. jejuni* を接種したところ、その 1 時間後、1 日後及び 1 週間後に盲腸、肝臓及びリンパ組織に菌が存在したことが報告されている [Cox *et al.*, 2005]。 *C. jejuni* を接種した鶏では、本菌が盲腸内に存在するものの、盲腸粘膜には炎症を認めないことが知

られている [Van Deun *et al.*, 2008]。この菌に対する不十分な炎症反応のため、腸管から *C. jejuni* を除去できないと考えられている [Hermans *et al.*, 2012]。本研究において、0 日齢から 14 日齢に接種した鶏の糞便から *C. jejuni* を分離できなかったのは、分離法に原因があった可能性は否定できない。すなわち増菌培養を行っていないため、これらの鶏の糞便中のきわめて少数の菌の存在を検出できていない可能性がある。

21 日齢から 35 日齢の鶏に接種した場合、*C. jejuni* は腸管内で増殖した可能性が示唆された。これらの鶏においては接種後 1 から 3 日目に糞便中への排菌が認められ、49 日齢まで排菌は継続し、糞便中の生菌数は経時的に増加した。

接種実験及びコマーシャル農場に導入した鶏の孵化直後には、本研究で用いた方法では、*C. jejuni* の保菌を認めなかった。また、滅菌生理食塩水を投与した対照群からは観察期間中の糞便及び剖検時の盲腸内容からも *C. jejuni* を分離できなかった。以上の成績は、コマーシャル農場の鶏に *C. jejuni* が定着したのは、農場に導入された後であることを示す。農場に導入した後に鶏群に本菌が定着するのを防ぐためには、農場内における敷料等の環境材料を含む日常的なモニタリングと消毒管理を行うことが重要であると考えられる。当該農場で分離された菌株は、直前に飼養された鶏から分離された菌株も含め、同じ RFLP タイプに型別された。従前の報告においても連続する生産サイクルの鶏群から分離された *C. jejuni* が同一の RFLP タイプに属していたという成績が得られており [Ishihara *et al.*, 2006; Shreeve *et al.*, 2000]、環境中に *C. jejuni* の感染源が存在し、鶏舎で飼養される鶏に定着する結果となっている [Bull *et al.*, 2006; Workman *et al.*, 2008]。

このたび調査したコマーシャル農場では、鶏が 28 日齢に達した後に糞便から *C. jejuni* が分離された。この成績は、接種実験において 21 日齢から 35 日齢の

鶏に *C. jejuni* を接種した場合に糞便中への排菌が認められたことと共通する。しかし、コマーシャル農場の 28 日齢未満の鶏の糞便から *C. jejuni* が分離されなかったことは、これらの鶏においては盲腸内に本菌を保菌していた可能性を否定するものではない。*C. jejuni* を保菌する鶏と 1 週齢の非保菌鶏を同居させたところ伝播し盲腸内容から本菌が分離されたとの報告がなされている [Stern *et al.*, 2001a]。したがって、*C. jejuni* を保菌していない鶏を農場に導入した後に本菌に暴露されると、盲腸内に保菌する可能性がある。

総 括

日本国内の肉用鶏農場において飼養される多くの鶏の腸管内には *Campylobacter jejuni* が存在している。本菌は、食鳥処理の過程において鶏肉を汚染し、それを介してヒトが本菌に感染しうる。事実、*C. jejuni* による食中毒事例の多くは原因食品が鶏肉であると報告されている。したがって、肉用鶏農場における鶏群への *C. jejuni* の伝播を防止することが、鶏肉を介した本菌によるヒトの感染リスクの低減のためにもっとも重要である。しかし、鶏群への本菌の伝播のメカニズムは明らかとなっていないことから、未だ有効な防除対策が確立されていない。

本研究では第1章において、鶏農場への、あるいは農場内における *C. jejuni* の伝播のメカニズムを明らかにするため、3つのブロイラー農場（農場1、2及び3）及び1つの地鶏飼育農場（農場4）において2003年から2012年の期間、本菌のモニタリングを行った。農場1、2及び3は企業養鶏会社に属し、農場2及び農場3はそれぞれ農場1から14 km 及び30 km の位置にあり、共通する6つの孵卵場から初生ひなを導入するとともに、同じ飼料会社の飼料を用いて飼養し、同一食鳥処理場に出荷している。農場4は、上記と異なる企業に属し、農場1から270 m の距離に位置している。4つの農場で採取された565の糞便試料から258株の *C. jejuni* が分離され、べん毛遺伝子 *flaA* のPCR産物の制限酵素切断断片長多型解析（RFLP）により10のRFLP型に区別された。農場1では、複数の孵卵場から複数の鶏舎に導入された鶏個体から分離された *C. jejuni* が同一のRFLP型を示した。鶏群の飼養期間に少なくとも1ないし2つのRFLP型の菌が定着しており、オールイン・オールアウトによる鶏群の更新とともに、直前の鶏群より分離された菌株とは別のRFLP型を示す菌

が分離される場合もあった。鶏舎内の環境サンプルの一部から分離された菌の RFLP 型は鶏糞便由来菌株と同一であったが、鶏舎内環境が鶏糞中に排泄された *C. jejuni* に汚染されたためと考えられた。ハウスキーピング遺伝子の塩基配列解析に基づく Multilocus Sequence Typing (MLST) の結果、異なる RFLP 型の菌はそれぞれ別の MLST 型に区別された。農場 1、2 及び 3 から MLST 型が類似している菌が分離された。これらの農場は同一の企業養鶏会社に所属し、同じ孵卵場のヒナを導入していたことから、初生ヒナが *C. jejuni* を保菌していた可能性を排除するものではないが、当該会社の従業員が相互に訪問し、共通の集鳥作業者の出入りや出荷カゴの持ち込みがあり、飼料運送車や出荷用トラック等が乗り入っていたため、*C. jejuni* が持ち込まれた可能性もある。また、農場 1 及び 4 から分離された菌株において、それぞれ RFLP 及び MLST 型が同一の菌株が認められたことから、異なる企業に属し異なる孵卵場からヒナを導入している農場において分離された *C. jejuni* は、農場の外部に存在する共通する起源に由来する可能性が示唆された。野生動物の行動調査により、農場 1 敷地と農場 4 敷地の間には夜間ニホンジカが行き来している可能性が示唆され、また、農場 1 の敷地内で採材したカラスの糞便から *C. jejuni* が分離されたことから、このような野生動物が伝播に関与している可能性も否定できない。加えて、これら 4 農場における経時的なモニタリングの結果から、1 つの農場に一度 *C. jejuni* が侵入すると、ある特定の菌株が比較的長期間農場に存在し続け、生産サイクルを超えて次の鶏群にも定着することが明らかとなった。したがって、野鳥や野生動物の侵入防止、出荷後の鶏舎の十分な洗浄・消毒、従業員の衣服や履物の交換・消毒、侵入車両や輸送カゴの十分な消毒など一般的な衛生管理の重要性があらためて強調された。一方、第 1 章でモニタリングをおこなった農場では、3 ないし 4 週齢以降に鶏の糞便から *C. jejuni* が分離された。しか

しこの成績は、これらの鶏群がその時点で *C. jejuni* に曝露されたことを明らかにしたものではない。

C. jejuni は、多くの場合、ブロイラー農場において 2~3 週齢以降の鶏の糞便から分離される。そこで、第 2 章では、糞便への排菌が、本菌に曝露される日齢と関連があるかどうかを明らかにするために、異なる日齢のブロイラー鶏に *C. jejuni* を経口接種し、経時的に糞便への排菌を調査し、出荷日齢に到達した際の盲腸内容からの菌分離も合わせて試みた。コマーシャル養鶏農場に導入されるブロイラーのヒナの一部を譲り受け、隔離された環境で飼養し、 5.5×10^7 から 5.4×10^8 CFU の菌を、0、7、14、21、28 及び 35 日齢に接種した。感染実験に用いた以外のヒナは、上記コマーシャル農場において飼養され、糞便中の *C. jejuni* をモニタリングした。0~14 日齢に接種した鶏では、42 日齢まで糞便中への排菌を認めなかったが、盲腸内容から本菌が分離され、分離菌株の *flaA* 遺伝子の制限酵素切断断片長多型解析 (RFLP) の結果、接種菌株の RFLP 型と一致した。21~35 日齢の鶏に接種した場合は、接種の 2~3 日後に糞便中への排菌を認め、49 日齢に至るまで継続的に排菌が認められ、糞便 1 グラムあたりの生菌数は最大で 1.7×10^8 から 1.0×10^{10} CFU に達した。感染実験に供した鶏から分離された *C. jejuni* の RFLP 型は接種に用いた菌とすべて一致した。コマーシャル農場においては、調査した 28 日齢の鶏 5 羽のうち 2 羽の糞便から *C. jejuni* が分離され、43 日齢では調査した鶏 5 羽すべてにおいて本菌が分離された。これらの菌の RFLP 型は、感染実験に用いた菌株のものと異なっており、直前に飼育されていた鶏群からも同一タイプの菌株が分離されていたため、ヒナが導入された後に農場において定着したことが強く示唆された。以上の成績から、2~3 週齢以下の鶏が *C. jejuni* に曝露された場合、盲腸内に保菌すること、また、3~4 週齢に本菌を糞便中に排菌している鶏の多くは、この日齢に達

したときに曝露されていることが示唆された。くわえて、3～4週齢に本菌に曝露された場合、直ちに糞便中に排菌し、その後の糞便中の排菌数が増加するため、汚染の拡大を最小限に留めるためには、この週齢における衛生管理が重要と思われた。一方、初生ヒナが曝露された場合においては、本菌を盲腸内に保菌し続ける可能性があるため、いずれの日齢においても *C. jejuni* の農場内への侵入を防止する必要がある。

本研究において、ヒナの導入元、給与飼料、出荷先及び従業員がすべて異なる、近隣の2つの肉用鶏農場から、遺伝学的に近縁な *C. jejuni* が分離された。したがって、共通の起源に由来する *C. jejuni* が、野生動物を含め何らかの経路により両農場に伝播した可能性が示唆された。また、コマーシャル肉用鶏が3～4週齢に達した時点で初めて *C. jejuni* の排菌が顕著に認められるようになるが、その要因の1つとして、この週齢に達した鶏では本菌に暴露後2、3日のうちに糞便中に多数排菌することが明らかとなった。しかし、2～3週齢以前に暴露された鶏の一部も盲腸などの消化管内に保菌し続けることが明らかとなり、このような保菌鶏が汚染源となる可能性も考えられた。以上の知見にもとづき、肉用鶏農場への *C. jejuni* の侵入及び農場内における伝播を防止するためには、従業員の衛生管理に対する意識の向上を図り、鶏舎消毒の徹底、外部から本菌を持ち込む可能性のある作業員、輸送カゴ、飼料運搬車などへの消毒の励行、野生動物の侵入防止対策など、いっそうの飼養衛生管理基準の点検と遵守が重要であると考えられる。さらに、今後は、鶏の免疫機能を活性化することにより本菌を消化管から除去あるいは定着を抑制する機能を付与した飼料の開発や、早期日齢で出荷する生産工程の構築等が必要と考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行及び論文の執筆に終始多大なるご指導及びご助言を賜りました鳥取大学農学部獣医微生物学教室の村瀬敏之教授に心より感謝いたします。また、研究を進める上で貴重なご助言をいただいた鹿児島大学共同獣医学部獣医公衆衛生学教室の中馬猛久教授、論文をご精読いただきました鳥取大学農学部獣医衛生学教室の山口剛士教授、獣医公衆衛生学教室の伊藤啓史准教授、獣医微生物学教室の尾崎弘一准教授に心よりお礼申し上げます。

Campylobacter の研究に携わるきっかけを与えていただいた日本獣医生命科学大学獣医学部の故高橋敏雄教授、多くのご助言、ご支援や激励をいただいた岐阜大学大学院連合獣医学研究科動物感染症制御学教室の浅井鉄夫教授、*Campylobacter* の分離と同定、べん毛遺伝子 *flaA* の RFLP 解析、菌株保存等に多大なるご指導ご支援をいただいた東京農工大学農学研究科獣医公衆衛生学教室の石原加奈子講師に深く感謝いたします。

Campylobacter の MLST 解析にあたり多大なるご助言とご協力をいただきました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域の秋庭正人主任研究員、岩田剛敏主任研究員に心より感謝申し上げます。

検査結果の統計学的解析にあたり多大なるご助言をいただいた独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域の筒井俊之研究領域長に深く感謝いたします。

社会人大学院生として本研究に取り組むにあたりご理解とご支援をいただいた京都産業大学鳥インフルエンザ研究センター長の大槻公一教授（鳥取大学農

学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター特任教授兼務)、前京都府農林水産技術センター畜産センター所長の安達善則氏、京都府農林水産技術センター畜産センターの西野洋所長、京都府農林水産部畜産課の上村浩一課長に心より感謝申し上げます。

Campylobacter の血清型別にご協力いただいた京都府保健環境研究所環境衛生課の中嶋智子主任研究員に心よりお礼申し上げます。

野生動物の行動調査にあたり、赤外線センサーカメラの設置や動物種の特定にご助言、ご協力をいただいた京都府中丹広域振興局農林商工部森づくり推進室の廣末絹男副室長及び稲元哲朗主任に感謝申し上げます。

本調査にあたり糞便材料のサンプリングやひな及び飼料の提供に多大なるご協力をいただいた肉用鶏農場及び関連企業の皆様に、心より感謝申し上げます。

施設での検査にあたりご理解いただいた京都府中丹家畜保健衛生所の中西所長、細菌検査や遺伝子検査、感染実験の実施にあたり多大なるご協力をいただいた中丹家畜保健衛生所高度病性鑑定課の種子田功課長はじめ課の皆様、農場での採材や調査などにご協力いただいた業務課及び防疫課の皆様に深く感謝いたします。

最後に、本学での研究活動、論文執筆に際し、応援してくれた友人とささえてくれた家族に心より感謝いたします。

引用文献

- Allos, B. M. 1998. *Campylobacter jejuni* infection as a cause of the Guillain-Barré syndrome. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 12: 173-184.
- Altekruse, S. F., Stern, N. J., Fields, P. I. and Swerdlow, D. L. 1999. *Campylobacter jejuni*-- an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 28-35.
- Atabay, H. I. and Corry, J. E. L. 1997. The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 83: 619-626.
- Berndtson, E., Danielsson-Tham, M.-L. and Engvall, A. 1996. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 35-47.
- Beery, J. T., Hugdahl, M. B. and Doyle, M. P. 1988. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2365-2370.
- Black, R. E., Levine M. M., Clements, M. P., Hughs, T. P. and Blaser, M. J. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infections in humans. *J. Infect. Dis.* 157: 472-480.
- Blaser, M. J. and Engberg, J. 2008. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. pp. 99-121. *In: Campylobacter*, 3rd ed. (Nachamkin, I., Szymanski, C. M. and Blaser, M. J. eds.), ASM Press, Washington DC.
- Boonmar, S., Sangsuk, L., Suthivarakom, K., Padungtod, P. and Morita, Y. 2005. Serotypes and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and animals in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 36: 130-134.
- Bull. S. A., Allen, V. M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J. A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D. Corry, J. E. L., Gillard-King, J. and Humphrey, T. J. 2006. Sources of

Campylobacter spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 645–652.

Byrd, J., Bailey, R. H., Wills, R. and Nisbet, D. 2007. Recovery of *Campylobacter* from commercial broiler hatchery trayliners. *Poult. Sci.* 86: 26–29.

Chuma, T., Makino, K., Okamoto, K. and Yugi, H. Analysis of distribution of *Campylobacter jejuni* in broilers by using restriction fragment length polymorphism of flagellin gene. 1997. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 1011–1015.

Cogan, T. A., Bloomfield, S. F. and Humphrey, T. J. 1999. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 354–358.

Corry, J. E. and Atabay, H. I. 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *J. Appl. Microbiol.* 90: 96–114.

Cox, N. A., Hofacre, C. L., Bailey, J. S., Buhr, R. J., Wilson, J. L., Hiett, K. L., Richardson, L. J., Musgrove, M. T., Cosby, D. E., Tankson, J. D., Vizzier, Y. L., Cray, P. F., Vaughn, L. E., Holt, P. S. and Bourassaa, D. V. 2005. Presence of *Campylobacter jejuni* in various organs one hour, one day, and one week following oral or intracloacal inoculations of broiler chicks. *Avian Dis.* 49: 155–158.

Craven, S. E., Stern, N. J., Line, E., Bailey, J. S., Cox, N. A. and Fedorka-Cray, P. 2000. Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian Dis.* 44: 715–720.

Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., Bootsma, H. J., Willems, R. J., Urwin, R. and Maiden, M. C. 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 14–23.

Djordjevic, S. P., Unicomb, L. E., Adamson, P. J., Mickan, L., Rios, R. and Australian

- Campylobacter* Subtyping Study Group. 2007. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing are reliably predicted by restriction fragment length polymorphism analyses of the *flaA* gene. *J. Clin. Microbiol.* 45: 102–108.
- Duffell, S. J. and Skirrow, M. B. 1978. Shepherd's scours and ovine *Campylobacter* abortion: a "new" zoonosis? *Vet. Rec.* 103: 144.
- Ekdahl, K., Normann, B. and Andersson, Y. 2005. Could flies explain the elusive epidemiology of campylobacteriosis? *BMC Infect. Dis.* 5: 11.
- Evans, S. J. and Sayers, A. R. 2000. A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 46: 209-223.
- Genigeorgis, C. A., Hassuneh, M. and Collins, P. 1986. *Campylobacter jejuni* infection on poultry farms and its effect on poultry meat contamination during slaughtering, *J. Food Prot.* 49: 895-903.
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D. W., Stern, N. J. and Corn, J. L. 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time, colonization, and prevalence. *Avian Dis.* 41: 890-898.
- Griekspoor, P., Engvall, E. O., Olsen, B. and Waldenstrom, J. 2010. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* from broilers. *Vet. Microbiol.* 140: 180–185.
- Hastings, R., Colles, F. M., McCarthy, N. D., Maiden, M. C. J. and Sheppard, S. K. 2011. *Campylobacter* genotypes from poultry transportation crates indicate a source of contamination and transmission. *J. Appl. Microbiol.* 110: 266–276.
- Herman, L. Heyndrickx, K. Grijspeerdt, K., Vandekerchove, D., Roller, I. and De Zutter, L. 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol. Infect.* 131: 1169–1180.

- Hermans, D., Pasmans, F., Heyndrickx, M., Van Immerseel, F., Martel, A., Van Deun, K. and Haesebrouck, F. 2012. A tolerogenic mucosal immune response leads to persistent *Campylobacter jejuni* colonization in the chicken gut. *Crit. Rev. Microbiol.* 38: 17–29.
- Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Van Deun, K. and Haesebrouck, F. 2012. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12: 89-99.
- Hiett, K. L., Stern, N. J., Fedorka-Cray, P., Cox, N. A., and Seal, B. S. 2007. Molecular phylogeny of the *flaA* short variable region among *Campylobacter jejuni* isolates collected during an annual evaluation of poultry flocks in the Southeastern United States. *Foodborne Pathog. Dis.* 4: 339-347.
- Hughes, L. A., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, J., Jones, T. R., Jones, R. C., Lahuerta-Marin, A., Jeatherbarrow, A. H., McNiffe, K., Norman, D., Williams, N. J. and Chantrey, J. 2009. Molecular epidemiology and characterization of *Campylobacter* spp. isolated from wild bird populations in northern England. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3007–3015.
- Humphrey, T. J., Henley, A., and Lanning, D. G. 1993. The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni* : some epidemiological investigations. *Epidemiol. Infect.* 110: 601–607.
- Ishihara, K., Yano, S., Nishimura, M., Asai, T., Kojima, A., Takahashi, T. and Tamura, Y. 2006. The dynamics of antimicrobial-resistant *Campylobacter jejuni* on Japanese broiler farms. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 515–518.
- 伊藤 武. 2000. *Campylobacter jejuni*. pp. 336-362. 食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編. 中央法規出版, 東京.
- Jacobs-Reitsma, W. F., Van de Giessen, A. W., Bolder, N. M. and Mulder, R. W. A. W. 1995. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol.*

Infect. 114: 413–421.

Kinjo, T. Morishige, M. Miyamoto, N. and Fukushi, H. 1983. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in feral pigeons. *Jpn. J. Vet. Sci.* 45: 833-835.

Korczak, B. M., Zurfluh, M., Emler, S., Kuhn-Oertli, J. and Kuhnert, P. 2009. Multiplex strategy for multilocus sequence typing, *fla* typing, and genetic determination of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates collected in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 47: 1996–2007.

久高 潤, 堀川 和美, 瓜生 佳世, 松雪 星子, 緒方 喜久代, 河野 喜美子, 山口 仁孝, 山崎 省吾, 渡辺 治雄, 岩永 正明. 2005. 食中毒及び感染性胃腸炎の病原体と臨床症状. 感染症学雑誌, 79: 864-870.

Lillehaug, A. Bergsjø, B., Schau, J., Bruheim, T. Vikøren, T. and Handeland, K. 2005. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., verocytotoxic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta Vet. Scand.* 46: 23-32.

Lindblom, G. B., Sjorgren E. and Kaijser, B. 1986. Natural campylobacter colonization in chickens raised under different environmental conditions. *J. Hyg. (Lond)* 96: 385-391.

Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J. and Stanley, J. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2568–2572.

Lior, H. 1984. New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter laridis*. *J. Clin. Microbiol.* 20: 636-640.

Maruyama, S. Tanaka, T. Katsube, Y. Nakanishi, H. and Nukina, M. 1990. Prevalence of thermophilic *Campylobacters* in crows (*Corvus leuillantii*, *Corvus corone*) and serogroups of the isolates. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52: 1237-1244.

- Matsumoto, N., Taniwaki, T., Kinuta, M. and Murase T. 2008. Isolation of *Campylobacter jejuni* and coliform bacilli from bile and liver obtained from slaughter cattle in Western Japan. *J. Food Prot.* 71: 1228-31.
- 松崎 静枝, 片山 淳, 板垣 国昭, 川口 信行, 田中 一成. 1983. 山口県内の野生動物における *Campylobacter jejuni/ coli* 保有状況について. 感染症学雑誌, 56: 845-850.
- Meade, K. G., Narciandi, F., Cahalane, S., Reiman, C., Allan, B. and O'Farrelly, C. 2009. Comparative in vivo infection models yield insights on early host immune response to *Campylobacter* in chickens. *Immunogenetics* 61: 101-110.
- 三澤 尚明. 2012. 食鳥処理場におけるカンピロバクター制御法の現状と課題. 日獣会誌. 65: 617-623.
- Navarro-Gonzalez, N., Ugarte-Ruiz, M., Porrero, M. C., Zamora, L., Mentaberre, G., Serrano, E., Mateos, A., Lavi'n, S. and Domínguez, L. 2014. *Campylobacter* shared between free-ranging cattle and sympatric wild ungulates in a natural environment (NE Spain). *Ecohealth.* 11: 333-342.
- Newell, D. G. and Fearnley, C. 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4343-4351.
- Nielsen, E. M., Engberg, J. and Madsen, M. 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19: 47-56 .
- Noormohamed, A. and Fakhr, M. K. 2013. A higher prevalence rate of *Campylobacter* in retail beef livers compared to other beef and pork meat cuts. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10: 2058-2068.
- Ono, K. and Yamamoto, K. 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 47: 211-219.

- 小野 一晃. 2006. 牛レバーや鶏レバーのカンピロバクター汚染状況 (特集 カンピロバクター食中毒について). 食品衛生研究. 56, 17-24.
- 小野 一晃. 2013. 牛胆嚢内胆汁のカンピロバクター汚染状況と分離菌株の性状. 日獣会誌. 66: 713-717.
- 大橋 誠、伊藤 武、斎藤 香彦ら. 1987. *Campylobacter jejuni/coli*の血清型別に関する研究: 全国レファレンス・システム設立の試行. 感染症学雑誌, 62: 818-825.
- Patriarchi, A., Fox, A., Maunsell, B., Fanning, S. and Bolton, D. 2011. Molecular characterization and environmental mapping of *Campylobacter* isolates in a subset of intensive poultry flocks in Ireland. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 99-108.
- Pearson, A. D., Greenwood, M., Healing, T. D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J. and Colwell, R. R. 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 987-996.
- Penner, J. L. and Hennessy, J. N. 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* 12: 732-737.
- Petersen, L. and Wedderkopp, A. 2001. Evidence that certain clones of *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flock rotations. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2739-2745.
- Ring, M., Zychowska, M. A. and Stephan, R. 2005. Dynamics of *Campylobacter* spp. spread investigated in 14 broiler flocks in Switzerland. *Avian Dis.* 49: 390-396.
- Ringoir, D. D., Szylo, D. and Korolik, V. 2007. Comparison of 2-day-old and 14-day-old chicken colonization models for *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49: 155-158.
- Robinson, D. A. 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br. Med. J.*, 282:

1584.

Rodriguez, S. and Araujo, R. 2010. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* in waters of a Mediterranean area and in its prevailing pollution sources. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1027-1034.

Sahin, O., Luo, N., Huang, S. and Zhang, Q. 2003. Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5372-5379.

斉藤 香彦ら. 1991. *Campylobacter jejuni/ coli* の血清型別に関する研究: Liorの血清型別システムの導入. 感染症学雑誌, 66(3): 340- 348

Saleha, A. A. 2004. Epidemiological study on the colonization of chickens with *Campylobacter* in broiler farms in Malaysia: possible risk and management factors. *Int. J. Poult. Sci.* 3: 129-134.

Sasaki, Y., Tsujiyama, Y., Yanaka, H., Yoshida, S., Goshima, T., Oshima, K., Katayama, S. and Yamada, Y. 2011. Risk factors for *Campylobacter* colonization in broiler flocks in Japan. *Zoonoses Public Health.* 58: 350-356.

品川 邦汎. 2007. カンピロバクターをめぐる最近の話題—牛の内臓肉（肝臓）の汚染とその防止. *JVM.* 60: 895-899.

Shreeve, J. E., Toszeghy, M., Pattison, M. and Newell, D. G. 2000. Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multipen broiler house. *Avian Dis.* 44: 983–988.

Skirrow, M. B. and Benjamin, J. 1980. '1001' *Campylobacters* : cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals. *J. Hyg. (Lond)* 85: 427-442.

Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J. and Harrison, M. A. 2007. Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 16-22.

- Stern, N. J., Cox, N. A., Musgrove, M. T. and Park, C. M. 2001a. Incidence and levels of *Campylobacter* in broilers after exposure to an inoculated seeder birds. *J. Appl. Poult. Res.* 10: 315–318.
- Stern, N. J., Fedorka-Cray, P., Bailey, J. S., Cox, N. A., Craven, S. E., Hiatt, K. L., Musgrove, M. T., Ladely, S., Cosby, D. and Mead, G. C. 2001b. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations. *J. Food Prot.* 64: 1705–1710.
- 鈴木 穂高, 山本 茂貴. 2011. 日本とヨーロッパ各国の食品中の食中毒菌汚染実態の比較 — 「食品の食中毒菌汚染実態調査」の結果の有効活用—. 国立医薬品食品衛生研究所報告. 129: 118-128.
- 津越 充子, 柴田 勝弘, 小林 治, 巽 俊彰. 1993. ブロイラー農場での飼育環境改善によるカンピロバクター清浄化. 鶏病研報. 29: 93-96.
- van de Giessen, A. W., Tilburg, J. J., Ritmeester, W. S. and van der Plas, J. 1998. Reduction of campylobacter infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiol. Infect.* 121: 57–66.
- Van Deun, K., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., Van den Broeck, W., Van Immerseel, F. and Haesebrouck, F. 2008. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Vet. Microbiol.* 130: 285–297.
- van Gerwe, T., Mifflin, J. K., Templeton, J. M., Bouma, A., Wagenaar, J. A., Jacobs-Reitsma, W. F., Stegeman, A. and Klinkenberg, D. 2009. Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 625–628.
- Weijtens, M. J. B. M., Reinders, R. D., Urlings, H. A. P. and Van der Plas, J. 1999. *Campylobacter* infections in fattening pigs: excretion pattern and genetic diversity.

J. Appl. Microbiol. 86: 63–70.

Wesley, I. V., Wells, S. J., Harmon, K. M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M. and Siddique, I. 2000. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1994–2000.

Wilson, M. K., Lane, A. B., Law, B. F., Miller, W. G., Joens, L. A., Konkel, M. E. and White, B. A. 2009. Analysis of the pan genome of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from poultry by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing (MLST), and repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) reveals different discriminatory capabilities. *Microbiol. Ecol.* 58: 843–855.

Woodward, D. L. and Rodgers, F. G. 2002. Identification of *Campylobacter* heat-stable and heat-labile antigens by combining the Penner and Lior serotyping schemes. *J. Clin. Microbiol.* 40: 741-745.

Workman, S. N., Mathison, G. E. and Lavoie, M. C. 2008. An investigation of sources of *Campylobacter* in a poultry production and packing operation in Barbados. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 106-111.

Yuki, N., Taki, T., Inagaki, F., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Handa, S. and Miyatake, T. 1993. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J. Exp. Med.* 178: 1771-1775.