

原 著

SPF鶏におけるブロイラー盲腸由来およびヒト食中毒事例由来 *Campylobacter jejuni*の実験的感染

佐々木 淳 御領政信 岡田幸助

要 約

野外例のブロイラー盲腸由来および岩手県内で発生したヒト食中毒事例由来 *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) を SPF鶏に接種し、特異的な病変形成の有無および盲腸内における菌の動態について病理学的および細菌学的に検索した。両菌株の初生ヒナ接種群では、特異的な臨床症状および病変の形成は認められなかった。2週齢時および15週齢時接種群でも病変の形成は認められず、サイクロフォスファミドの投与により免疫抑制状態を作出した実験群でも *C. jejuni* による病変はみられなかった。初生ヒナ接種群では、接種後1日日以降の剖検例すべての盲腸内容物より *C. jejuni* が再分離されたが、2週齢時および15週齢時接種群では接種後1日目の盲腸内容物から *C. jejuni* が再分離されなかった。すべての実験群の盲腸内容物より、接種後数週間にわたって *C. jejuni* が再分離された。

キーワード：*Campylobacter jejuni*, 盲腸内容物, 食中毒, SPF鶏

Campylobacter jejuni/coli (*C. jejuni*) を原因とするヒトのカンピロバクター食中毒は、厚生労働省によると1997年頃より発生例の増加がみられ、平成20年度の原因種別発生状況では細菌性食中毒の中で事件数、患者数ともに一番多く、早急な対策が切望されている。カンピロバクター食中毒の原因食材としては、本菌に汚染された生乳や食肉などの食品が挙げられるが、特に鶏肉および鶏レバーが強く疑われており [1, 2], ヒトでは少量の菌数でも感染・発症することが実験的に証明されているため [3], 他の食品への二次汚染源としても重要視されている。一方、ヒト以外の動物における *C. jejuni* 感染症は、犬のカンピロバクター腸炎や鳥ビブリ

オ肝炎などが知られているが、いずれもその病理発生については不明な点が多い [4, 5]。今回、野外のブロイラー盲腸由来ならびに岩手県で発生したヒト食中毒事例由来 *C. jejuni* を用い、P2系SPF鶏に対する病原性の有無を病理学的に検索し、さらに感染後の *C. jejuni* の動態を明らかにする目的で接種鶏の盲腸内における *C. jejuni* の消長を検討した。

材料および方法

接種菌株：野外ブロイラーの盲腸内容物より分離した *C. jejuni* と、岩手県内で発生したヒト食中毒事例由来 *C. jejuni* の2株を接種菌株として用いた。

実験1（ブロイラー盲腸由来*C. jejuni*の病原性の検討）：初生のP2系白色レグホン種ヒナを用いた。ブロイラー盲腸由来*C. jejuni*をBHI平板培地にて40℃、微好気性条件下で48時間培養を行い、滅菌PBSにて $10^8 \sim 10^9$ cfu/mlの菌液を調製した。実験群は、0.1ml経口投与群（A群、20羽）と0.1ml右側大腿部筋肉内接種群（B群、22羽）の2群をそれぞれ設定した。観察期間は5週までとし、各群ともに接種後1日目、3日目、1週目、2週目、3週目、4週目および5週目にそれぞれ剖検し、主要臓器を採材した。剖検時、盲腸の片側を無菌的に採材して*C. jejuni*の定量的な再分離を試みた。

実験2（ヒト食中毒事例由来*C. jejuni*の病原性の検討）：P2系白色レグホン種を用い、1日齢時接種群（C群、32羽）、2週齢時接種群（D群、17羽）、15週齢時接種群（E群、7羽）、1週齢時cyclophosphamide（CY）投与・2週齢時接種群（F群、12羽）の4群をそれぞれ設定した。CYは右側大腿部内側皮下（20mg/羽）に投与した。実験1と同様に*C. jejuni*の菌液を準備し、0.1ml（C、D、F群）あるいは1.0ml（E群）を経口投与した。観察期間はC群が9週まで、D群が4週まで、EおよびF群が2週までとし、各群ともに接種後1日目、3日目および1週目以降はそれぞれの観察期間終了までの毎週にそれぞれ剖検し、主要臓器を採材した。剖検時、盲腸の片側を無菌的に採材して*C. jejuni*の定量的な再分離を試みた。

細菌検査：実験鶏の盲腸内容物を滅菌PBSにて段階希釈し、カンピロバクター選択剤バツラー（ニッスイ）と10%に馬脱線維血液を加えたブレインハートインフュージョン（BHI）寒天培地（栄研）に塗抹し、40℃にて市販のガス発生袋を用いた微好気性条件下で48時間培養を行った。再分離した菌株については、グラム染色を行い鏡検後に生化学的検査として、オキシダーゼ試験（ポアメディア®オキシダーゼテスト、栄研）、カタラーゼ試験、馬尿酸分解試験をそれぞれ行っ

た。

病理組織学的検査：採材した全身諸臓器は、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン包埋ブロックを作製した。これを4 μ mに薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色の他、カルボールチオニン染色、グラム染色ならびに抗*C. jejuni*マウスモノクローナル抗体（Biogenesis, UK）を用いた免疫組織化学的染色（IHC）を施し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検索した。なお、本実験は「岩手大学動物実験に関する指針」に基づいて行った。

成 績

実験1（ブロイラー盲腸由来*C. jejuni*の病原性の検討）

病理学的所見：両接種群において特異的な臨床症状は認められなかった。肉眼所見として、両接種群ともに接種後1週目までの盲腸内容物は重度に水様、泡沫状であったが（図1）、2週目以降は褐色泥状を呈していた。病理組織学的には、両接種群のほぼ全例の盲腸において、グラム陽性、陰性菌が多数認められた。両接種群ともに一部のヒナでは卵黄嚢の遺残がみられ、組織学的には中心部が壊死に陥っており、壊死領域には多数のグラム陽性、陰性菌が認められた。B群の接種部位では、接種後1日目と3日

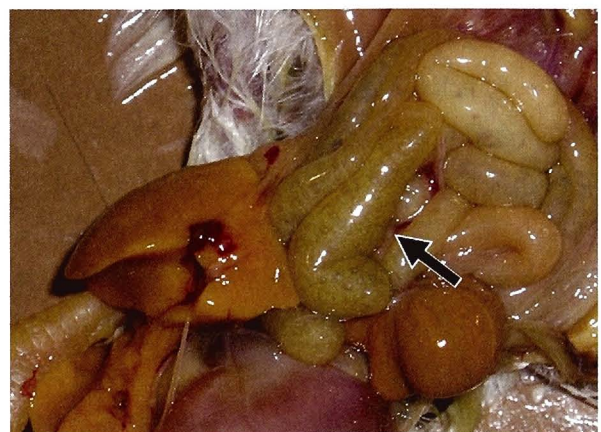


図1 実験1，A群，No.4
盲腸（矢印）の内容物は高度に泡沫状を呈している。

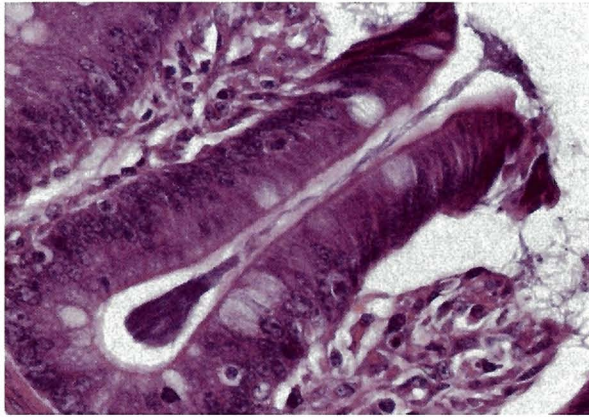


図2 実験2, F群, No.5, 盲腸, HE染色
盲腸粘膜上部および陰窩領域において, 多数のフィラメント状桿菌が認められる。

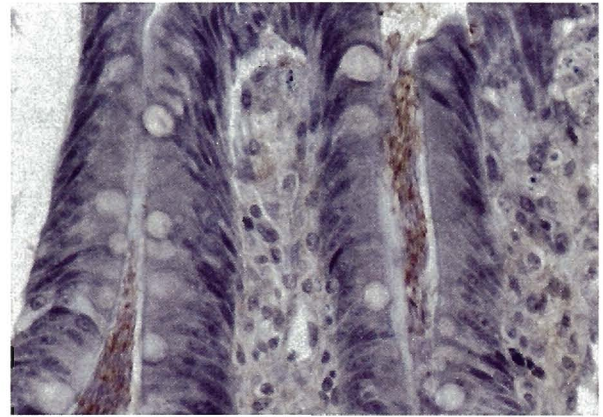


図3 実験2, F群, No.5, 盲腸, 抗*C. jejuni*
モノクローナル抗体を用いたIHC
図4でみられた多数の桿菌が抗*C. jejuni*モノクローナル抗体に陽性を示している。

目の剖検例において, 接種反応と思われる巨大異物肉芽腫の形成および間質における炎症性細胞浸潤が認められた。

細菌検査結果: 両接種群ともに接種後1日目から5週目までのすべての観察期間における盲腸

表1 ブロイラー盲腸由来*C. jejuni*接種群における盲腸内容物からの再分離成績 (実験1)

接種後 日数	No.	A群 (経口接種群)	B群 (大腿部筋肉内接種群)
1日目	1	$10^{8 \text{ a)}}$	10^4
	2	10^8	10^8
	3	10^8	10^8
3日目	4	10^7	$10^8 <$
	5	10^8	$10^8 <$
	6	10^8	$10^8 <$
1週目	7	10^6	10^8
	8	$10^8 <$	$10^8 <$
	9	$10^8 <$	10^7
2週目	10	0	0
	11	0	10^6
	12	10^7	0
3週目	13	0	10^8
	14	10^8	10^8
	15	10^8	10^8
4週目	16	10^8	$10^8 <$
	17	0	10^6
	18	10^8	10^8
5週目	19	10^8	10^7
	20	10^8	10^8
	21	—	10^6
	22	—	10^8

a) 菌数 (個/g)

内容物より, *C. jejuni*が再分離された (表1)。

実験2 (ヒト食中毒事例由来*C. jejuni*の病原性の検討)

病理学的所見: すべての接種群において特異的な臨床症状は認められなかった。肉眼所見として, C群の盲腸内容物は接種後1週目まで重度に水様, 泡沫状であったが, 2週目以降は褐色泥状を呈していた。病理組織学的には, すべての接種群のほぼ全例の盲腸において, グラム陽性, 陰性菌が多数認められ, D, E, F群の盲腸粘膜上皮あるいは陰窩領域におけるグラム陰性フィラメント状桿菌は, 抗*C. jejuni*モノクローナル抗体に陽性を示した (図2, 3)。C群の接種後3日目, 1週目, 5~9週目では卵黄囊の遺残がみられ, 卵黄囊内では組織学的にグラム陽性, 陰性の多数の細菌塊が認められた (図4, 5, 表2)。F群のファブリキウス嚢は, 全例で高度に萎縮していた。

細菌検査結果: C群では, 接種後1日目から9週目までのすべての観察期間における盲腸内容物より, *C. jejuni*が再分離された (表2)。D, E, F群では, 接種後1日目を除くすべての観察期間において*C. jejuni*が再分離された (表3)。

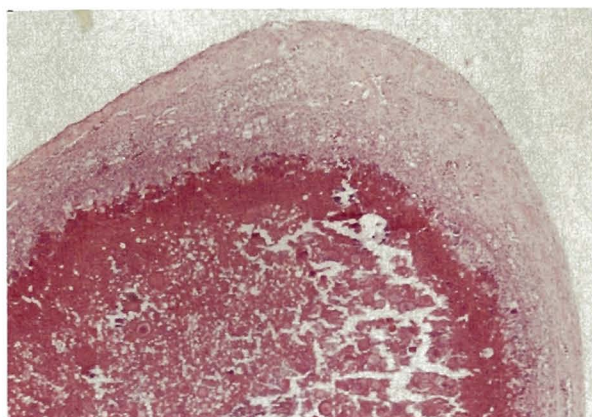


図4 実験2, C群, No.7, 卵黄囊, HE染色
卵黄囊の中心部が強好酸性を呈し, 壊死に陥っている (卵黄囊炎).

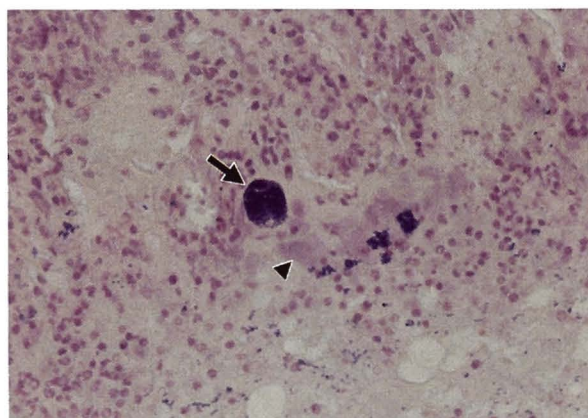


図5 実験2, C群, No.7, 卵黄囊, グラム染色
卵黄囊の壊死領域において, 多数のグラム陽性 (矢印) および陰性菌 (矢頭) が認められる。

表2 ヒト食中毒事例由来 *C.jejuni* 接種群における盲腸内容物からの再分離成績 (実験2)

接種後 日数	No	C群 (経口接種群)	卵黄囊内細菌塊
1日目	1	10^8 ^{a)}	—
	2	$10^8 <$	—
	3	$10^8 <$	—
3日目	4	$10^8 <$	+
	5	$10^8 <$	+
	6	$10^8 <$	+
1週目	7	10^8	+
	8	$10^8 <$	NE ^{b)}
	9	$10^8 <$	+
2週目	10	$10^8 <$	NE
	11	0	NE
	12	10^7	NE
3週目	13	$10^8 <$	NE
	14	$10^8 <$	NE
	15	0	NE
4週目	16	10^7	NE
	17	$10^8 <$	NE
	18	10^8	NE
5週目	19	$10^8 <$	+
	20	10^8	+
	21	$10^8 <$	+
6週目	22	$10^8 <$	NE
	23	10^6	+
	24	0	NE
7週目	25	$10^8 <$	NE
	26	$10^8 <$	+
	27	$10^8 <$	NE
8週目	28	10^7	NE
	29	0	NE
	30	10^7	+
9週目	31	10^8	NE
	32	$10^8 <$	+

^{a)} 菌数 (個/g)

^{b)} NE (検索せず)

考 察

鳥類ではカンピロバクター感染に起因した疾患として, 鳥ビブリオ肝炎が知られており [4], 実験的には臍十二指腸静脈内に *C.jejuni* を接種したウズラにおいて壊死性の肝炎が再現されたとの報告もあるが [5], 最近のプロイラーおよび採卵鶏を用いた鳥類, 犬およびヒト由来 *C.jejuni* による感染実験では, 病変形成は報告されていない [6-10]. 今回の実験では初生ヒナ, 2週齢および15週齢のSPF鶏を用いたが, 近年の報告と同様にいずれの日齢でも臨床症状の発現や全身諸臓器における特異的な病変形成は認められなかった. これらの結果より, 今回用いたプロイラー盲腸由来およびヒト食中毒事例由来 *C.jejuni* は鶏に対して病原性を示さず, 経口あるいは筋肉内接種による感染経路ではこれまで鳥類で報告されている鳥ビブリオ肝炎の病変再現は困難であることが示唆された.

小野ら [10] は, 鶏肉およびヒト由来 *C.jejuni* を鶏に投与し, 初生ヒナでは二つの株ともに消化管内への高い定着性がみられたが, 35日齢鶏では定着性の弱い菌株も認められたと報告している. 本実験では初生ヒナを用いたA, B, C群において, すべての観察期間を通して *C.jejuni* が再分離されたことから, 今回の実験に用いた *C.jejuni* の二株はいずれの接種経路によっても初生ヒナの盲腸内に長期間にわたって

表3 ヒト食中毒事例由来 *C.jejuni* 接種群における盲腸内容物からの再分離成績 (実験2)

接種後 日数	No.	D群 (2週齢経口接種群)	接種後 日数	No.	E群 (15週齢経口接種群)	接種後 日数	No.	F群 (CY前投与群)
1日目	1	0 ^{a)}	1日目	1	0	1日目	1	0
	2	0		2	7×10^8		2	0
	3	0		3	1.4×10^7		3	3×10^6
3日目	4	8×10^6	1週目	4	6×10^6	3日目	4	1×10^4
	5	0		5	4×10^8		5	1×10^4
	6	4×10^6		6	8×10^8		6	1×10^6
1週目	7	3×10^4	2週目	6	8×10^8	1週目	7	1×10^9
	8	1×10^8		7	1×10^6		8	1.1×10^7
	9	4×10^8					9	1.2×10^8
2週目	10	2×10^4			10	2×10^8		
	11	1×10^8			11	1.4×10^7		
3週目	12	8×10^8			12	1×10^8		
	13	2.4×10^7						
4週目	14	6×10^4						
	15	0						
	16	1×10^6						
	17	5.4×10^5						

a) 菌数 (個/g)

定着・増殖する可能性が示された。一方, D, E, F群における2週齢および15週齢鶏でも接種後1日目を除いて長期間にわたり *C.jejuni* が再分離されたことから, 高日齢鶏においても本菌株は盲腸内に定着・増殖することが示唆された。

本実験において初生ヒナに *C.jejuni* を接種したA, B, C群では, 接種後1日目より *C.jejuni* が盲腸内容物より再分離されたが, Coxら [6] は初生ヒナに *C.jejuni* を経口接種し, 接種1時間後より肝臓, 脾臓などの諸臓器から *C.jejuni* を再分離し, 初生ヒナにおける *C.jejuni* の体内動態が速やかであることを報告している。本実験でも初生ヒナ接種群では接種後1日目より *C.jejuni* が再分離されたことより, 初生ヒナでは接種後における *C.jejuni* の体内動態は比較的早いことが示唆された。それに対して, 2週齢以上の日齢で投与したD, E, F群では, 接種後1日目には *C.jejuni* が再分離されなかったことから, 2週齢以降の鶏では *C.jejuni* の盲腸への定着に数日の時間が必要であることが示唆された。

Sublerら [9] は伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス感染による免疫抑制状態が, *C.jejuni* の消化管内における感染範囲を広め, さらに消化管内容物より再分離される *C.jejuni* の菌数も増加させると報告している。本実験のF群では, CYの投与によってファブリキウス嚢が重度に萎縮していたことから, F群の実験鶏はすべて免疫抑制状態であったことが明らかであったが, 他群との間に盲腸内容物から再分離される *C.jejuni* の菌数などに差異は認められなかった。この結果より, CYは盲腸における *C.jejuni* の定着性あるいは増殖性に影響を及ぼさないことが示唆された。

最後に, カンピロバクターによる食中毒予防対策として, 生産現場ではプロバイオティクスなど様々な資材の応用も検討されているが [11], カンピロバクター食中毒を予防するためには, 養鶏場や食鳥処理場などにおける衛生対策の他, 消費段階における衛生的な取り扱いや加熱調理の徹底など, 農場から食卓にいたるまでの全てにわたる総合的な衛生対策が重要であると思われる。

謝 辞

本実験で用いたヒト食中毒事例由来 *Campylobacter jejuni* は、岩手県環境保健研究センター保健科学部上席専門研究員の故藤井伸一郎先生より分与していただきました。ここに心より感謝の意を表すとともに、謹んでご冥福をお祈りいたします。

引用文献

- [1] 高木昌美：鶏におけるカンピロバクター汚染，鶏病研報，38，25-34 (2002)
- [2] 佐々木 淳，小野寺司：市販鶏肉および鶏レバーにおけるカンピロバクターの汚染状況，盛岡大学短期大学部紀要，1-3 (2007)
- [3] Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaster MJ : Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans, J Infect Dis, 157, 472-479 (1988)
- [4] Shara SM, Stern NJ : *Campylobacter* infection, Disease of Poultry American Associated of Avian Pathologists, 11 th ed, 615-630, Blackwell Publishing, Iowa (2003)
- [5] Misawa N, Ohnishi T, Uchida K, Nakai M, Nasu T, Itoh K, Takahashi E : Experimental hepatitis induced by *Campylobacter jejuni* infection in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*), J Vet Med Sci, 58, 205-210 (1996)
- [6] Cox NA, Hofacre CL, Bailey JS, Buhr RJ, Wilson JL, Hiatt KL, Richardson LJ, Musgrove MT, Cosby DE, Tankson JD, Vizzier YL, Cray PF, Vaughn LE, Holt PS, Bourassa DV : 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 (2005)
- [7] Dhillon AS, Shivaprasad HL, Schaberg D, Wier F, Weber S, Bandli D : *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens, Avian Dis, 50, 55-58 (2006)
- [8] Stas T, Jordan FTW, Woldehiwet Z : Experimental infection of chickens with *Campylobacter jejuni* : Strains differ in their capacity to colonize the intestine, Avian Pathol, 28, 61-64 (1999)
- [9] Subler KA, Mickael CS, Jackwood DJ : Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression exacerbates *Campylobacter jejuni* colonization and shedding in chickens, Avian Dis, 50, 179-184 (2006)
- [10] 小野一晃：養鶏場におけるカンピロバクター汚染，鶏病研報，42，27-32 (2006)
- [11] 鶏病研究会：ブロイラー生産農場におけるサルモネラ・カンピロバクターの対策資材，鶏病研報，45，65-72 (2009)