

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業

「肉用鶏農場における食中毒菌（カンピロバクター及びサルモネラ）の汚染リスクを低減するための研究」

令和４年度 最終年度報告書

課題番号 (e-Radシステム課題 ID)	18072554
課題名（契約課題名）	肉用鶏農場における食中毒菌（カンピロバクター及びサルモネラ）の汚染リスクを低減するための研究

研究実施期間	平成30年度～令和４年度（５年間）
代表機関	国立大学法人 山口大学
研究総括者	豊福 肇
研究総括者 連絡先	TEL : 083-933-5827
	E-mail : toyofuku@yamaguchi-u.ac.jp
共同研究機関	山口県立大学看護栄養学部
	山口県環境保健センター
	山口県西部家畜衛生保健所
	NPO法人日本食品安全検証機構
	深川養鶏農業協同組合

＜別紙様式 3＞最終年度報告書

1 研究目的

食品の安全確保は、国民の健康維持のために必要不可欠であり、我が国の農畜水産物及び食品の安定供給の基礎となる。カンピロバクターやサルモネラに汚染された肉用鶏による食中毒は、細菌性食中毒の大半を占めていることから、フードチェーン各段階における衛生管理手法の改善は急務である。

なかでも、肉用鶏農場（以下、農場）内や鶏舎内で出荷されるまでの間にカンピロバクター及びサルモネラに感染していることが報告されているが、わが国では汚染源は特定されておらず、効果的な対策に苦慮している。

このため、本研究では、

1. 農場内や鶏舎内への食中毒菌の侵入に寄与の高い汚染源の推定
2. 農場内や鶏舎内での食中毒菌の蔓延に寄与の高い汚染源の推定
3. 農場への食中毒菌の侵入源の確認と有効な衛生管理の検討
4. 農場における食中毒菌の蔓延の原因の確認と有効な衛生管理の検討

により、農場や鶏舎において、科学的知見及び微生物学的手法をもとに侵入及び蔓延に寄与の高い汚染源を特定し、衛生管理手法の開発を行うと共に、開発された技術・手法等の実用化と普及を図ることを目的とする。また、このような鶏舎環境で、このような衛生管理対策を講じれば汚染リスクを低減することができた事例、またその再現性を証明するためのデータ収集の事例を示すことを目標とする。

（1）侵入について

- 1) 昆虫、小動物等を介した汚染源の確認
- 2) 肉用鶏が摂取する餌・水等を介した汚染源の確認
- 3) ヒト、運送車両等を介した汚染源の確認

（2）蔓延について

- 1) 給餌システムを介した汚染蔓延の検討
- 2) 肉用鶏同士の接触による汚染蔓延の検討
- 3) 糞口感染による汚染蔓延の確認

その結果、共同研究機関であるF養鶏が中心となり、特定された汚染箇所の衛生管理手法の実用化を図るとともに、山口県西部家畜保健衛生所を中心に、1)汚染低減化に有効な農場及び鶏舎構造の普及並びに2)食中毒菌の侵入及び蔓延に有効な制御法の普及を図る。さらに、コンソーシアムとして、リスク管理手法に関する提言を行うことで、生産段階における新たなリスク管理技術の開発・実用化が期待される。

2 研究内容

(1) 研究課題

小課題1：農場内や鶏舎内への食中毒菌の侵入及び蔓延に寄与の高い汚染源の推定と寄与の低減に有効な衛生管理手法の検討（汚染源推定・衛生管理手法開発）（小課題責任者名：豊福 肇・研究機関：山口大学）

- ① 農場内及び鶏舎への汚染源：5つ以上を推定し、3つ以上を特定する。
- ② 飼養試験：カンピロバクター菌数2桁以上低減する衛生管理対策を実施する。
- ③ 衛生管理対策：汚染源を特定する手法及び汚染源に対する対策を検討し、選択する方法を提示する。

(ア) 農場内・鶏舎内の汚染源調査

- ① 国内外での先行研究からのリスク因子の推定
国内外で肉用鶏の生産段階での汚染源の推定及び汚染源に対する介入研究について文献調査を行い、今回の研究でターゲットとすべきリスク因子を絞り込む。
- ② 試験農場の観察
試験農場において、汚染源と考えられるリスク因子が存在するか、観察、ヒアリングを行い、④の検査対象を絞り込む。
- ③ 肉用鶏から食中毒菌の分離・同定
鶏舎で飼育されている肉用鶏の新鮮盲腸便よりカンピロバクター及びサルモネラをReal-Time PCR、ISO法等の妥当性が確認された検査法にて分離同定を行い、株名、血清型等を決定する。1群当たり5羽以上の検体を採取する。
- ④ 推定汚染源から食中毒菌の分離同定・定量
汚染源と推定される飲料水、飼料、野生動物、衛生害虫、車両、機材、ヒト、導入雛、敷料等、孵卵場等から試料を採取し、カンピロバクター及びサルモネラについてReal-Time PCR、ISO法等の妥当性が確認された検査法にて分離同定し、株名、血清型等を決定する。また、菌の定量を行う。このとき、担当する各機関間で目合わせを行う。
- ⑤ 遺伝子型パターンの解析
③、④から分離同定された、カンピロバクター及びサルモネラの遺伝子型について、PFGE等を用いて解析し、各汚染源に肉用鶏が直接接触する頻度や各汚染源における食中毒菌の生残性等の科学的知見を基に、侵入及び蔓延に関連する要因について解析する。侵入及び蔓延については以下のものを検討している。
 - (1) 侵入について
 - 1) 昆虫、小動物等を介した汚染源の確認
 - 2) 肉用鶏が摂取する餌・水等を介した汚染源の確認
 - 3) ヒト、運送車両等を介した汚染源の確認
 - (2) 蔓延について
 - 1) 給餌システムを介した汚染蔓延の検討
 - 2) 肉用鶏同士の接触による汚染蔓延の検討
 - 3) 糞口感染による汚染蔓延の確認

(イ) 飼養段階における汚染の把握

試験農場において、飼養衛生管理基準を実施したうえで、それでも食中毒菌が検出される要因と考えられる対象物別に衛生実態の把握を行う。飼育施設や敷地内への人（衣服や靴など）や物品（車両、機材など）の汚染実態調査として、鶏舎内外のスワブ、飲用水、飼料、換気扇等について、サルモネラ及びカンピロバクターの検出を行う。

(ウ) 衛生管理対策の開発

(ア) の結果から、汚染源を3つ以上特定し、F養鶏試験農場において、管理者のハンドリング等バイオセキュリティも含め、衛生管理対策を試行する。

小課題2：農場における食中毒菌の侵入及び蔓延の汚染源の確認と有効な衛生管理手法の検討（汚染源確認と衛生管理手法の一般化）（小課題責任者名：豊福 肇・研究機関：山口大学）

試験農場を絞り、小課題1の文献調査や農場調査で得られた知見や試験農場の疫学的な特徴を「農場調査表」に整理のうえ網羅的に把握し、重要なリスク因子に対して重点的に対策をとり、その結果食中毒菌がこれだけ減ったというアプローチを成果として提示する。このような鶏舎環境で、このような衛生管理対策を講じれば、再現性をもって汚染リスクを低減することができた事例（例、鶏舎の洗浄・消毒方法）、また、農場調査（孵化場調査も含む）や各対策の再現性を証明するためのデータ収集（サンプリングや検査法等）の事例を示すとともに、重点的なリスク因子や対策の決定の過程も成果に含める。事例の中で取り組んだ各対策については、定量的な方法論として示すとともに、各対策の現場作業の様子を、写真等を活用してわかりやすく紹介する。

(2) 達成目標

1. 農場内及び鶏舎への汚染源：5つ以上を推定し、3つ以上を特定する。
2. 飼養試験：カンピロバクター菌数2桁以上低減する衛生管理対策を実施する。
3. 衛生管理対策：汚染源1つに対して1つ以上（計3つ以上）提示する。
4. 汚染源確認と衛生管理の検討：農場の疫学的な特徴を農場調査で網羅的に把握し、重要なリスク因子に対して重点的に対策をとり、その結果食中毒菌がこれだけ減ったというアプローチを成果として提示する。

(3) 研究開発された成果の取扱い

選定した試験農場の疫学的な特徴を農場調査で網羅的に把握し、重要なリスク因子に対して重点的に対策をとり、その結果食中毒菌がこれだけ減ったというアプローチを成果として提示されることで、コンソーシアムを通して、広く全国に周知させることができるほか、小規模鶏農場においても対策が容易になる。なお、成果の情報発信にあたっては、行政部局との相談のうえで実施する。

・特定された汚染箇所の衛生管理手法の実用化

成果が得られた場合、適切な時期に山口大学共同獣医学部及びF養鶏のHPで情報発信するほか、有効な手段と判断された衛生管理手法については、山口県西部家畜保健衛生所から随時養鶏業者に対する衛生管理手法改善策の研修等を実施し、普及を推進する。また、NPO法人日本食品安全検証機構における農場HACCPトレーニングにおいても教材として活用する。

・汚染低減化に有効な構造の普及

成果が得られた場合、3年以内に山口大学共同獣医学部及びF養鶏のHPで情報発信するほか、汚染低減化に有効な構造と判断されたものについては、山口県西部家畜保健衛生所から、随時養鶏業者等への研修等を実施し、普及を推進する。また、NPO法人日本食品安全検証機構における農場HACCPトレーニングにおいても教材として活用する。

・食中毒菌の侵入及び蔓延に有効な細菌制御法の普及

山口大学、山口県及びNPO法人日本食品安全検証機構からの情報発信、農林水産省、厚生労働省との連携による食品安全対策の推進を行う。

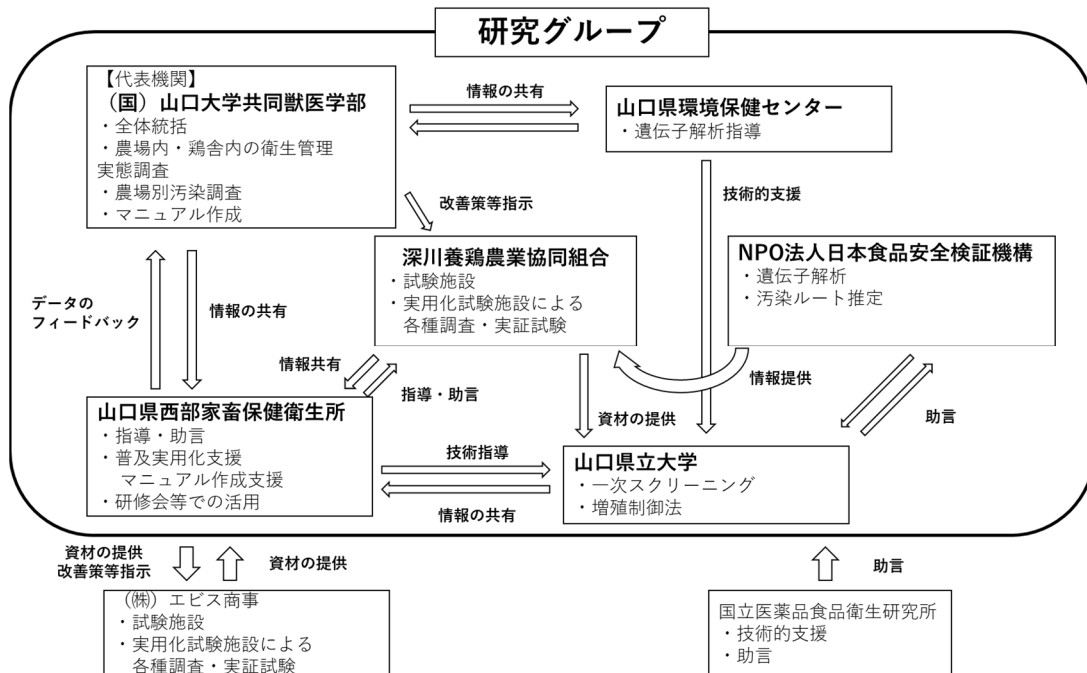
・リスク管理手法に関する提言

飼養衛生管理基準の構成・項目に基づいて、小課題1の文献調査や農場調査で得られた知見や農場の疫学的な特徴を「農場調査表」に整理のうえ網羅的に把握し、重要なリスク因子に対して重点的に対策を講じ、その結果食中毒菌がこれだけ減ったというアプローチを、広く公表・周知できる報告書としてまとめる。本研究で得られた成果を2年以内に論文等で公表する。

(4) 年次計画

研究課題	研究年度				
	H30	R元	R2	R3	R4
小課題 1. 汚染源推定・衛生管理手法の検討 (1) 農場内・鶏舎内の汚染源調査 (遺伝子型解析等) (2) 飼養段階における汚染の把握 (カンピロバクター菌数把握、増殖制御策等) (3) 衛生管理対策の開発 (消毒法、消毒剤等)	遺伝子解析等による汚染実態調査 衛生実態把握・増殖制御策の検討 消毒法・消毒剤等の開発				
小課題 2. 汚染源確認と衛生管理手法の一般化：重点的に対策を講じた結果食中毒菌が低減したアプローチの提示 (1) 養鶏業者への介入対策 (2) 洗浄消毒方法の再現性試験	アプローチ提示 養鶏業者への介入対策 洗浄消毒方法の再現性試験				

(5) 研究体制



(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	エフォート (%)
	機関	研究室		
研究総括者	山口大学	獣医疫学	◎ 豊福 肇	10
1. 汚染源推定・衛生管理手法検討	山口大学	獣医疫学	◎ 豊福 肇	前出
(1) 農場内・鶏舎内の汚染源調査	山口大学	獣医疫学	○ 豊福 肇	前出
	山口県環境保健センター	保健科学部	調 恒明	5
	山口県西部家畜保健衛生所	所長	惠本茂樹 (2018. 4. 1～ 2020. 3. 31)	10
	山口県立大学	食品衛生学	△ 溝手朝子 (2020. 4. 1～)	10
	NPO 法人 JVO		茶菌 明	10
	深川養鶏農業協同組合	生産部	永井寿宗	10

(2)飼養段階における汚染の把握	山口大学 深川養鶏農業協同組合	獣医疫学 生産部	○ 豊福 肇 永井寿宗	前出 前出
	山口県西部家畜保健衛生所	所長	惠本茂樹 (2018. 4. 1～ 2020. 3. 31)	前出
	山口県立大学 NPO 法人 JV0	食品衛生学	柳澤 郁成 (2020. 4. 1～) 溝手朝子 茶藺 明	前出 前出 前出
	山口県環境保健センター	保健科学部	調 恒明	前出
(3)衛生管理対策の開発	山口県西部家畜保健衛生所	所長	○惠本茂樹 (2018. 4. 1～ 2020. 3. 31)	前出
			柳澤 郁成 (2020. 4. 1～)	前出
	山口県立大学 NPO 法人 JV0 深川養鶏農業協同組合	食品衛生学 生産部	溝手朝子 茶藺 明 永井寿宗	前出 前出 前出
2. 農場における食中毒菌の侵入及び蔓延の汚染源の確認と有効な衛生管理の検討(汚染源確認と衛生管理手法の一般化)	深川養鶏農業協同組合	生産部	○ 永井寿宗	前出
	山口県西部家畜保健衛生所	所長	△惠本茂樹 (2018. 4. 1～ 2020. 3. 31)	前出
(1)養鶏業者への介入対策	山口大学 山口県立大学	獣医疫学 食品衛生学	柳澤 郁成 (2020. 4. 1～) 豊福 肇 溝手 朝子 茶藺 明	前出 前出 前出
(2)洗浄消毒方法の再現性試験	NPO 法人 JV0			前出

(7) 各年度の研究費

平成 30 年度	8,531,484 円
令和元年度 (平成 31 年度)	7,824,838 円
令和 2 年度	6,191,420 円
令和 3 年度	5,846,970 円
令和 4 年度	5,360,000 円

3 研究成果の概要

(1) 主な成果

1) 成果の内容

- ① カンピロバクターは、中抜き出荷の有無はリスク因子の可能性はあるが、感染源は特定できなかった。孵卵場や、3週齢以前の環境及び死鳥検体からはほぼ分離されなかったため、サルモネラと感染経路は異なると考えられた。
- ② サルモネラは鶏群に入っても、全羽に広がるわけではないが、カンピロバクターは一度鶏群に入ると、鶏群全体に広がる傾向が認められた。
- ③ 出荷時の盲腸便中の菌数は、カンピロバクターは6~8 乗/g のオーダーで検出された。
- ④ カンピロバクターは同一農場の同一鶏舎でも、生産サイクルによって陽性・陰性が変わった。
- ⑤ 農場調査表を活用した実態把握を試みて、総合的に、食中毒菌の侵入防止（バイオセキュリティ）に取り組まないと、出荷時鶏群が陽性になると考えられた。各養鶏業者が汚染実態を把握したうえで、飼養衛生管理基準を参考に、自社の衛生管理の弱点を第三者のアドバイスをもらいながら、強化する必要がある。

2) 成果の活用

- ・サルモネラは、導入前・導入時・3週齢時、更には孵卵場の環境検体からの検出から、垂直感染や農場での持続的生存の可能性は大きい
- ・農場調査表を活用した実態把握及び総合的な衛生対策の検討事例を通じた農場衛生管理向上への寄与
- ・サルモネラについては上流（種鶏場、孵卵場）も含む衛生対策の必要性の周知
- ・空舎後の鶏舎の洗浄消毒効果の微生物検査による妥当性確認と検証と見直しの必要性の周知

(2) 各研究課題の成果

小課題1:農場内や鶏舎内への食中毒菌の侵入及び蔓延に寄与の高い汚染源の推定と寄与の低減に有効な衛生管理手法の検討(汚染源推定・衛生管理手法開発)(小課題責任者名:豊福 肇・研究機関:山口大学)

(ア) 研究目標

農場内及び鶏舎へのカンピロバクター・サルモネラの汚染源について、5つ以上を推定し、3つ以上を特定する。汚染源を特定する手法及び汚染源に対する対策を検討し、選択する方法を提示する。

(イ) 研究内容

小課題1 - (1) 農場内・鶏舎内の汚染源調査

① 文献調査による汚染源推定 (H30 及び R2 年度)

本研究でターゲットとすべきリスク因子候補を絞り込むため、肉用鶏の生産段階での汚染源の推定に関する国内外の文献調査を実施した(調査対象:国内文献:26本、海外文献:116本)

さらに、カンピロバクターについて、より詳細にリスク因子を明らかにするため文献調査を実施(調査対象:海外文献40本)した。(別紙1 文献一覧参照。)

② リスク因子と陽性農場の関連性の検討

文献調査により推定されたリスク因子について、調査農場におけるリスク因子の存在を確認するため、農場での衛生管理に関するアンケート調査を実施するとともに、衛生管理の実態把握のため一部農場への立ち入り調査を実施。合わせて、調査農場の出荷鶏の盲腸内容物の汚染調査を実施し、農場の汚染状況を把握（H30～R1年度）した。

農場アンケート：調査対象のF養鶏33農場（堆積養鶏実施）、45項目について実施（回答主は農場主）した。

出荷鶏の汚染状況調査：平成30年10月～令和元年9月に採取した。

調査対象：33農場中17農場、22鶏群（14農場各1鶏群、2農場各2鶏群、1農場各4鶏群）
（1群あたり原則5羽）

検査能力の限界から原則1農場、1鶏舎の検査データに基づき陽性農場とした。

採取部位：肉用鶏検査後の肉用鶏の消化管（盲腸便）

検査方法：カンピロバクター及びサルモネラについて、国立衛研標準検査法にて分離同定を行い、株名、血清型等を決定した。

農場アンケート結果と陽性率の関連性について、t検定を用いて解析した。

③ -1 推定汚染源からの食中毒菌の分離同定

F養鶏のA,B農場における食中毒菌の汚染源の推定のため、令和元年～2年度に次の表で示す採取場所から経時的に検体を採取の上、カンピロバクター及びサルモネラの分離同定を実施した。令和元年度はF養鶏のA,B農場各1鶏舎について各1サイクル実施し、令和2年度はA農場について実施した。

表1 推定汚染源の追求のための検体採材時期及び採材箇所

検体採取時期	採取箇所（各1検体）
雛導入前	鶏舎内スワブ（*1） 使用水の原水（*2） 貯水タンク（*2） 500Lタンクおよび末端水（*2） 鶏舎外スワブ（*3）
雛導入時	雛マット（*1） 死籠り卵（*2） 鶏舎内スワブ（*1） 換気扇（*2） 飼料給餌装置内の飼料（*2） 鶏舎外スワブ（*1）
導入3週目 及び6週目	鶏舎内スワブ（*1） 換気扇（*2）、末端水（*2）、飼料（*2）、鶏舎外スワブ（*1）

*1：令和元年・令和2年採取 *2：令和元年のみ採取 *3：令和2年のみ採取

表 2 採取材料及び検体調整方法

採取材料	採取及び検体調整方法
鶏舎内/外スワブ	長靴に滅菌ガーゼを巻き、鶏舎内外を一周後、ガーゼを滅菌ペプトン水に浸漬の上 10ml を検体とした
雛マット	雛マットをガーゼで拭き取り、ガーゼを滅菌ペプトン水に浸漬の上 10ml を検体とした
死籠り卵	死こもり卵全体をホモジナイズして検体とした
水	無菌的に 100ml 採取
飼料	鶏舎内餌箱から 25g を採取
換気扇スワブ	滅菌ガーゼで 10×10cm 拭き取り後、滅菌ペプトン水に浸漬、10ml を検体とした

検査方法：国立衛研標準検査法にて分離同定を行い、株名、血清型等を決定。
カンピロバクターについてはMLST解析を実施。

③-2 推定汚染源からの食中毒菌の分離同定（孵卵場検査）

孵卵場からのサルモネラ等の導入可能性を検証するため、F養鶏の孵卵場の拭き取り検査を、令和元年11月に、下の表に示した採取箇所、各2検体採取し、サルモネラ及びカンピロバクターについて検出を試みた。PCR法による遺伝子検査は、ポリメラーゼにQuick Taq® HS DyeMix（東洋紡）を使用し、サルモネラの検出には、ChiuらのinvA遺伝子に特異的なプライマーを、カンピロバクターの検出にはWangらのプライマーを用いて行った。なお、アニーリング温度はそれぞれ56℃及び59℃で30秒とした。

表 3 孵卵場での拭き取り箇所と採材方法及び検体数

NO.	ふき取り箇所	採材方法	検体数	必要な備品
1	貯卵庫 床面	DS 方式	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
2	入卵準備室 床面	DS 方式	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
3	①チックセッター室 床面	DS 方式	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
4	②パックセッター室 床面	DS 方式	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
5	①チックハッチャー室 室 床面	DS 方式	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚

6	②バックハッチャー室 床面	DS 方式	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
7	雛箱・餌付箱倉庫 床面	DS 方式	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
8	ヒナカゴ乾燥・保管室 床面	DS 方式	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
9	ワクチン接種・ 雛選別及び雛保管室床 面	DS 方式	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
10	雛取り出し及び洗浄室 床面	ふき 取り	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
11	雛箱表面ふき取り （ダンボール）	ふき 取り	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
12	換気扇（①チックセッ ター室）	ふき 取り	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
13	換気扇（②バックセッ ター室）	ふき 取り	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
14	換気扇（①チックハッ チャー室）	ふき 取り	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
15	換気扇（②バックハッ チャー室）	ふき 取り	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
16	換気扇（ワクチン接 種・雛選別及び雛保管 室）	ふき 取り	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
17	セッター内（3 室）	ふき 取り	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚
18	ハッチャー内 （バックハッチャー室 5 号機）	ふき 取り	2 検体	環状包帯（幅 15 cm×40 cm）2 枚 滅菌ビニール袋 2 枚

③-3 推定汚染源からの食中毒菌の分離同定（廃卵検査）

種鶏場からのサルモネラ等の侵入可能性を検証するため、令和2年4～5月に計4回、種鶏場Aの複数鶏舎から廃卵を入手し、4～8個の廃卵を1検体としてサルモネラの分離検査を実施した。調査実施月と対照鶏舎数は表のとおり。

表 4 廃卵検査の実施時期及び採材場所

実施時期	採材場所
令和2年4月	種鶏場 A 4 鶏舎
令和2年5月①	種鶏場 A 5 鶏舎
令和2年5月②	種鶏場 A 5 鶏舎
令和2年5月③	種鶏場 A 5 鶏舎

③-4 推定汚染源からの食中毒菌の分離同定（堆積糞検査）

堆積糞による汚染可能性を検証するため、令和2年8月及び10月に3回、F養鶏S農場1号鶏舎において堆積糞発酵後の敷料検体を採取し、カンピロバクター及びサルモネラの分離検査及び薬剤耐性試験を実施した。堆積糞は発酵終了後、山積み状態から敷料として鶏舎全体に均一に広げられた。発酵終了後の敷料検体を鶏舎内8か所から13～16gを採取して試験に供した。サルモネラは敷料5gを45mlのBPWで増菌、カンピロバクターは敷料10gを40mlのPreston培地で増菌した。増菌産物について次のPCRを実施した。すなわち、PCR法による遺伝子検査は、ポリメラーゼにQuick Taq® HS DyeMix（東洋紡）を使用し、サルモネラの検出には、ChiuらのinvA遺伝子に特異的なプライマーを、カンピロバクターの検出にはWangらの方法に従い*C. jejuni*の検出にはhip0を*C. coli*の検出にはglyAに特異的なプライマーを用いて、を行った。なお、アニーリング温度はサルモネラ及びカンピロバクター、それぞれ56℃及び59℃で30秒とした。そのほか、サルモネラについてはRV及びTT培地で42℃24時間選択増菌し、DHL及びCHS培地で37℃、24時間、カンピロバクターはmCCDAおよびmCCDAclear HT培地で42℃、48時間微好気培養を実施した。

④ 分離菌（*Campylobacter*）の遺伝子解析

山口県のF養鶏S農場5号鶏舎において平成30年10月に採材した盲腸内容物、令和元年7月及び令和2年9月に飼育6週齢の鶏舎内ソックススワブ、令和元年8月に盲腸内容物から、令和2年5月、7月及び10月に盲腸内容物から、分離された*C. jejuni*株、さらにM農場において平成30年11月の盲腸内容物、平成31年1月の盲腸内容物、平成31年7月の3週齢のエサ、8月の6週齢鶏舎内スワブ及び出荷時の盲腸内容物から分離された*C. jejuni*株についてMP-BIT、RFLP及びMLSTを用いた遺伝子解析を行った。

同農場9号鶏舎で令和2年5月に採材した盲腸内容物、令和2年9月に行った経時的検査で3、6週齢の鶏舎内ソックススワブ及び出荷時の盲腸内容物から分離された*C. jejuni*についてもMP-BIT、RFLP及びMLSTを用いた遺伝子解析を行った。

⑤ 分離菌（サルモネラ）の薬剤獲得状況と種鶏場分離株の関連性

平成30年10月から令和2年10月までに、F養鶏33農場の45～50日齢ブロイラーのサルモネラ汚染実態を調査した。各農場で肉用鶏を食鳥処理場に出荷時に、1鶏群当たり5羽の腸内容物を採取した。S農場では、汚染実態の経時的な変化を把握するため、異なる時期に複数回の検査を実施した。S農場は平成30年10月から令和2年7月までに計5回、2回実施した農場は4農場、その他の農場は1回の検査を実施した。検査鶏群と検査羽数の合計は、37鶏群の185羽を調査した。その他、経時的な農場の環境調査、孵卵場環境調査、死籠り卵検査、種鶏場における廃卵検査から分離されたサルモネラについても以下の通り、薬剤感受性試験を実施した。

分離された全ての菌株について、微量液体希釈法により各薬剤に対する最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。薬剤は、アンピシリン（ABPC）、セフトキシム（CTX）、ストレプトマイシン（SM）、カナマイシン（KM）、ゲンタマイシン（GM）、テトラサイクリン（TC）、クロラムフェニコール（CP）、ナリジクス酸（NA）、シプロフロキサシン（CPFX）およびトリメトプリム（TMP）の10剤を用いた。供試菌を生理食

塩水にMcFarland 0.5となるように懸濁し、ミューラーヒントン培地により希釈し、接種菌液とした。薬剤を添加したMH培地に最終接種菌量がおおよそ 5×10^4 CFU/mLとなるように接種菌液を添加し、37℃の好気条件下で24時間培養後にMICを測定した。ブレイクポイントは、CLSI またはJVARMの基準を用い、ABPCは32 µg/mL、CTXは4 µg/mL、SMは32 µg/mL、KMは64 µg/mL、GMは16 µg/mL、TCは16 µg/mL、CPは32 µg/mL、NAは32 µg/mL、CPFXは1 µg/mL、TMPは16 µg/mLとした。

小課題 1－（２）飼養段階における汚染の把握

① 環境検体の経時的検査による汚染把握

試験農場における環境検体の経時的検査による汚染把握を目的として、令和元年から２年度に次の表で示す採取場所から採取の上、カンピロバクター及びサルモネラの分離同定を実施した。令和元年はF養鶏のA,B農場各1鶏舎について実施した。

表 5 環境検体の経時的検査の採取時期及び採取箇所

検体採取時期	採取箇所（各 1 検体）
雛導入前	鶏舎内スワブ（＊１） 使用水の原水（＊２） 貯水タンク（＊２） 500Lタンクおよび末端水（＊２） 鶏舎外スワブ（＊３）
雛導入時	雛マット（＊１） 死籠り卵（＊２） 鶏舎内スワブ（＊１） 換気扇（＊２） 飼料給餌装置内の飼料（＊２） 鶏舎外スワブ（＊１）
導入 3 週目 及び 6 週目	鶏舎内スワブ（＊１） 換気扇（＊２）、末端水（＊２）、飼料（＊２）、鶏舎外スワブ（＊１）

＊１：令和元年・令和２年採取 ＊２：令和元年のみ採取 ＊３：令和２年のみ採取

表 6 採取材料及び検体調整方法

採材材料	採取及び検体調整方法
鶏舎内/外スワブ	長靴に滅菌ガーゼを巻き、鶏舎内外を一周後、ガーゼを滅菌ペプトン水に浸漬の上 10ml を検体とした
雛マット	雛マットをガーゼで拭き取り、ガーゼを滅菌ペプトン水に浸漬の上 10ml を検体とした
死籠り卵	死こもり卵全体をホモジナイズして検体とした
水	無菌的に 100ml 採取
飼料	鶏舎内餌箱から 25g を採取
換気扇スワブ	滅菌ガーゼで 10×10cm 拭き取り後、滅菌ペプトン水に浸漬、10ml を検体とした

検査方法：国立衛研標準検査法にて分離同定を行い、株名、血清型等を決定。
カンピロバクターについてはMLST解析を実施。

② M県のE商事汚染実態把握

平成31年度から令和2年度に、堆積糞養鶏を行っていないM県のE商事の30農場において、出荷時盲腸内容物のカンピロバクター及びサルモネラの検査を行った。また、令和2年度の8月～9月に、E商事のM農場（ブロイラーより長く肉用鶏を飼養）の1鶏舎において、入雛から出荷までの経時的環境検査を行った。

令和2年度のサンプル採取時期と場所は次のとおり。

導入前：鶏舎内及び外スワブ、貯水タンク、末端水、換気扇

導入時：鶏舎内及び外周スワブ

3週齢：鶏舎内及び鶏舎外周スワブ並びに換気扇スワブ

7週齢：鶏舎内及び鶏舎外周スワブ、末端水及び換気扇

小課題1－（3）衛生管理手法の開発

① 夏期の石灰散布介入による食中毒菌低減効果の試行

冬期にカンピロバクターの陽性率が下がるのは、鳥インフルエンザ対策で鶏舎周囲に石灰散布をしていることが要因ではないかと推測し、夏期に散布したら、カンピロバクターの汚染が防げるか調査することを目的として、令和2年8月と10月に、F養鶏のS農場の5号鶏舎周囲に石灰を散布した。対照鶏舎の9号鶏舎には散布せず、サルモネラ及びカンピロバクターの分離検査を行った。なお、試験鶏舎については令和2年8月と10月入雛の2回検査を実施、対照鶏舎については8月のみ検査を実施した。

検体は以下の通り：

入雛前：鶏舎内外スワブ

入雛時：鶏舎内外スワブ＋雛マット10枚分

3週齢及び6週齢：鶏舎内外スワブ

出荷時：盲腸内容物

検査法はサルモネラ、カンピロバクターは国立衛研標準検査法により実施した。

② プロバイオティクス投与による食中毒菌低減効果の試行

海外文献調査で、プロバイオティクスが鶏群をカンピロバクター及びサルモネラから守る因子として報告されていたことから、プロバイオティクスの飲水投与による鶏群の感染防御効果を確認することを目的として、F養鶏S農場1号鶏舎の令和3年10月末の入雛鶏群に対し、プロバイオティクス（市販品）を導入4、5、6週で各3日間、20mg/羽/日を飲水投与した。対照として同農場の4号鶏舎を設定し、試験鶏舎と対照鶏舎について、出荷時の盲腸内容物を採取し、カンピロバクターの定量的な検査を実施した。

③ 空舎期間の洗浄・消毒を徹底しての介入

令和3年度から以下の条件を満たす試験農場の選定・確保に取り組んだ。予定していた試験農場の候補先において、雛導入前の鶏舎環境からサルモネラが検出されたことか

ら、令和3年度には、以下の選定方法及び条件により、改めて試験農場（F養鶏：1農場、E商事：1農場）を決定することとした。

※選定方法と条件

- (ア) 一般的な飼育形態（日齢の長い飼育、ブランド鶏は除外する）の農場であること
- (イ) 複数の鶏舎があること（2～3棟以上の鶏舎があること）※試験鶏舎の設定の可能性を考慮
- (ウ) チームの編成；生産者・ブロイラーインテ生産部・管理獣医師・家畜保健衛生所の相互協力が得られること
- (エ) 空舎期間の洗浄・消毒を徹底して行い、環境を整えられること（オールアウト後の鶏糞を鶏舎から全て搬出し、洗浄・消毒後に未使用のチップ等汚染されていない敷料を使用する等の対策を予め実施）
- (オ) 飼養衛生管理基準を遵守しており、雛導入前の鶏舎環境の複数試料から食中毒菌が分離されない状態であること。

【F養鶏：1農場】

令和3年5月、F養鶏のS農場の1号鶏舎（試験鶏舎）において空舎期間に堆積糞を搬出して洗浄消毒を徹底して行い、入雛前に鶏舎内ソックスワブ、鶏舎内支柱、換気扇のほこり、天井及びブリーダーの傘のスワブから食中毒菌が検出されない状態となったことから、同年6月入雛から出荷まで、表のとおり一定間隔で鶏舎内外環境サンプルを採取し、菌分離を行った。また、各週鶏舎内で死亡した鶏の盲腸便からも菌分離を試みた。当該鶏群出荷後は、夏期であり、空舎期間を十分に確保できないために洗浄消毒の行程を実施することが難しい状況であったことから、堆積糞の搬出をせず、従来の手順で洗浄後、入雛して飼養を行い、その鶏群を出荷した後は堆積糞搬出及び徹底した洗浄消毒を実施後、令和3年10月入雛鶏群について、6月入雛と同じ調査を行った。

表7 F養鶏 堆積糞搬出及び洗浄消毒徹底した鶏舎での採材時期、箇所及び対象鶏群

採材時期	入雛前、入雛時、導入1，2，3，4，5，6週齢、出荷時
採材箇所	鶏舎内スワブ、鶏舎外スワブ、飼料、鶏舎内末端水、換気扇埃、サービスルームスワブ、雛マット、死鳥、盲腸内容物
対象鶏群	令和3年6月入雛及び10月入雛

【E商事：1農場】

E商事については、試験農場の選定方法に則し、通常の飼育期間のブロイラー農場であるE農場において、令和3年の5、7及び9月に、2鶏舎（3号、5号鶏舎）で各3サイクル、経時的調査を行った。サンプリング時期と箇所は、小課題1－（2）②のE商事M農場の経時的検査と同じとした（表のとおり）。5号鶏舎を試験区、3号鶏舎を対照区に設定し、試験区については、生鳥出荷後にF養鶏の試験鶏舎（1号鶏舎）で成功した洗浄消毒方法による徹底した洗浄消毒を実施し、対照区については通常の洗浄消毒を行った上で、鶏舎内外の環境の検査を行った。

表8 E商事 堆積糞搬出及び洗浄消毒徹底した鶏舎での採材時期、箇所及び対象鶏群

採材時期	新品チップ搬入前、入雛前、入雛時、導入1，3，6週齢、出荷時
採材箇所	鶏舎内スワブ、鶏舎外スワブ、鶏舎内天井柱部分、ブルーダー傘部分、飼料、鶏舎内末端水、換気扇埃、サービスルームスワブ、雛マット、死鳥、盲腸内容物、鶏舎内タンク、胸肉
対象鶏群	令和3年5月、7月及び9月入雛

表9 試験区及び対照区における洗浄消毒概要

号舎	区分	坪数	概要
3号舎	対照区	390坪	生鳥出荷後、洗浄、消毒、新品チップ搬入
5号舎	試験区	390坪	生鳥出荷後、徹底した洗浄、消毒、新品チップ搬入

(ウ) 研究結果

小課題1 - (1) 農場内・鶏舎内の汚染源調査

① 農場内・鶏舎内の汚染源調査

文献調査による汚染源推定（H30及びR2年度）により、“鶏舎”“汚染”及び“サルモネラ”または“カンピロバクター”のキーワードで検索して、一度でも本研究に適していると考えられた以下のリスク因子が推定された。

表10 文献調査で明らかになったリスク因子と汚染防止となる要因

菌	リスク因子	汚染防止となる要因
サルモネラ	- 不適切なバイオセキュリティ - 飲用水、飼料 - 昆虫 - 垂直感染	- 農場単位のオールインオールアウトの実施 - 出荷毎の鶏舎の洗浄消毒の実施 - 鶏舎周囲への消石灰の散布
カンピロバクター	- 不適切なバイオセキュリティ - 飲用水、飼料 - 昆虫 - 農場近隣の家畜の飼養	- 飲用水の消毒 - 鶏舎毎の専用靴の使用 - 鶏舎毎の作業員の専任化 - 鶏舎内のネズミの定期的な駆除

また、カンピロバクター詳細リスク因子解析の結果、以下の項目がリスク因子及び陰性関与因子として推定された。

表11 カンピロバクターの農場での感染のリスク因子

リスク因子	報告数
不適切なバイオセキュリティ	17
飲用水	15
農場内外での家畜や野生動物の存在	12
鶏の日齢	11

農場の鶏舎数	11
季節（夏季の方が感染していることが多い）	9
ハエ等の昆虫	9
中抜き（部分出荷）	8
飲用水のニップルの形状や汚染	4
ネズミの存在、不適切な駆除	3
鶏群のサイズが大きい	3

一方、陰性になることに関与する因子としては、空舎期間が長いこと及びProbioticsの給餌（各2報）があった。

② リスク因子と陽性農場の関連性の検討

主なアンケート項目とカンピロバクターの農場陽性率の関連については表12のとおりであった。

表12 アンケート調査で聴取した感染関連因子と農場カンピロバクター汚染率の関係

アンケート	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	入雛前の洗浄消毒は、実施していますか？	入雛前の洗浄消毒に要する総日数はどのくらいですか？	水洗後の鶏舎床面には、石灰散布はしているか？	給水ラインの清掃、消毒は実施されていますか？	給餌タンクの清掃は実施されていますか？	鶏舎ごとに同緑りは区分されていますか？	ねずみ対策は実施されていますか？	犬走りがありますか？	鶏の飲用水は消毒していますか？	鶏舎数7以上
陽性率	実施農場 陽性率 10/25 (40%) 未実施 1/1(100%)	8日以上 農場陽性率 4/11(36.4%) 7日以下 6/14(42.9%)	実施農場 陽性率 4/12(33.3%) 未実施 7/14(50.0%)	実施農場 陽性率 9/12(42.9%) 未実施 2/5(40.0%)	実施農場 陽性率 6/12(50%) 未実施 5/14(35.7%)	実施農場 陽性率 4/11(36.4%) 未実施 7/15(46.7%)	すべて実施	ありの 陽性率 43.5% 未実施 33.3%	実施農場 陽性率 9/23(39.1%) 未実施 2/2(100%)	鶏舎7以上の陽性率87.5%) 6鶏舎以下は32.0%
p値	0.23	0.74	0.39	0.91	0.46	0.59		0.73	0.09	<0.05

アンケート	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	生産時の中抜き作業はあるか？	雄雌混合飼育ですか？	ワクチン投与時の中和剤等の使用の有無	農場入場時は、靴の踏み込み消毒はしていますか？	農場入場時は衣服の着替えはしていますか？	農場の管理者は他のぬお嬢管理と兼任か？	捕鳥作業者は農場管理者とは別の者か？	農場入場時は衣服の着替えはしているか？	農場入場時に手洗い、消毒を実施しているか？	鶏舎ごとに長靴の履き替えはしているか？
陽性率	ある農場の陽性率 5/5 (100%) なし 6/20(30%)	混合農場陽性率 10/25(40%) 無回答・空欄含むそれ以外 5/8(62.5%)	はいと回答した陽性率 10/19(52.6%) 未実施 0/6(0.0%)	実施農場 陽性率 10/25(40%) 無回答・空欄含むそれ以外 5/8(62.5%)	YES.NO ともに 陽性率 40%	実施農場 陽性率 5/12(41.7%) 未実施 5/13(38.5%)	はいと回答した陽性率 7/21(33.3%) 未実施 3/4(75.0%)	実施農場 陽性率 9/23(39.1%) 未実施 2/2(100%)	実施農場 陽性率 8/23(34.8%) いいえ 1/1(100%)	実施農場 陽性率 9/24(37.5%) いいえ 3/4(75.0%)
p値	<0.05	0.26	0.022	0.26		0.87	0.119	0.21	0.19	0.16

- ・ F 養鶏 33 農場のうち、カンピロバクター陽性率の季節性を考慮し解析した結果、
✓ 鶏舎 7 つ以上の大規模農場であること
✓ 生産時の中抜きを行うこと
について、カンピロバクター陽性率との間に有意差が認められた（ $p < 0.05$ ）。
- ・ その他、カンピロバクター及びサルモネラの陽性率に有意差が認められた項目はなかった。
- ・ 検査結果とは直接結びつかないが、アンケートや査察で得られた一次情報から、除糞までの日数、洗浄消毒にかかる日数、堆積糞の処理方法の違いが影響している可能性が考えられた。

- ・ 農場の陽性か陰性判定は、1 農場から 1 鶏舎、1 回の鶏群、各鶏群あたり 5 羽の盲腸内容物で行ったため、これも不確実性は存在すると考えられた。
- ・ 用いたアンケート方法について、単に実施の有無を質問しても、現場査察においてその実施情報に問題があるなど、農場の担当者のアンケートの回答と実際のカンピロバクター汚染対策の効果の間には乖離がある可能性があるという問題点・課題が明らかになった。
- ・ カンピロバクター陰性農場の衛生管理の実施状況に関する査察は課題であったが、F 養鶏の直営農場以外には査察が困難であること及び秋から春にかけては鳥インフルエンザ対策のため農場に入れない等の研究上の障害が認められた。

③ -1 推定汚染源からの食中毒菌の分離同定

A, B農場で、各採材時期に、各検査材料から分離された食中毒菌の結果は次の表のとおりであった

表13 A, B農場で、採材時期ごと、各検査材料から分離された食中毒菌の結果

農場	採取時期	令和1年					令和2年				
		鶏舎内スワブ	雛マット	飼料	換気扇スワブ	鶏舎外スワブ	鶏舎内スワブ	雛マット	飼料	換気扇スワブ	鶏舎外スワブ
A	導入前	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	導入時	—	S.S	—	—	—	S.S	—	—	—	—
	3週目	S.S	—	—	—	—	S.S	—	—	—	—
	6週目	S.S, C.j	—	—	S.S	S.S	S.S	—	—	—	S.S
B	導入前	—	—	—	—	—					
	導入時	S.S	—	—	—	—					
	3週目	S.S, C.j	—	C.j	—	—					
	6週目	S.S, C.j	—	—	—	S.S, C.j					

注記) S. S: *Salmonella* Schwarzengrund C. j: *Campylobacterla jejuni* —: 不検出

- ・ A、B 農場とも、導入前は全検体で食中毒菌は不検出であった。
 - ・ 導入時の雛マットから *Salmonella* Schwarzengrund（以下、S. S）が分離。
 - ・ 死ごもり卵、水からは全期間で不検出であった。
- A農場において、導入時の雛マットからS. Sが分離されたことから、導入前の孵化場からの汚染が疑われ、孵卵場及び種鶏場廃卵の追加検査を実施した。

③ -2 推定汚染源からの食中毒菌の分離同定

以下の場所からサルモネラが検出された（各1検体）。

表14 孵卵場検査の検査場所と食中毒菌の検出状況

場所	サルモネラ	カンピロバクター
①貯卵庫 床面		+ (<i>C. coli</i>)
②入卵準備室	+	
⑨ワクチン接種・雛選別保管室 床面	+	

⑬換気扇（バックセンター）	+	+（ <i>C. coli</i> 及び <i>C. jejuni</i> ）
⑭ハッチャー内	+	

注記：＋は陽性、カンピロバクターはPCRでは痕跡が検出されたが、菌の検出には至らなかった。

- ・ 孵卵場内の4箇所において検出されたことから、サルモネラは孵卵場を広範囲に汚染していると考えられた。
- ・ ①貯卵庫床及び⑬換気扇（バックセッター）からPCRで*Campylobacterla jejuni* (*C. jejuni*) 及び*Campylobacterla Coli* (*C. coli*) の痕跡が認められたが、菌の検出には至らなかった。種鶏はカンピロバクターを保菌している可能性が示唆された。ただし、文献情報等から垂直感染して雛が保菌しているとは限らない。

③ -3 推定汚染源からの食中毒菌の分離同定（廃卵検査）

検査した4回のうち、令和2年5月①の1鶏舎に由来する廃卵のみからサルモネラが分離された。

③ -4 推定汚染源からの食中毒菌の分離同定（堆積糞検査）

サルモネラについて、敷料検査結果（1回目）では8か所中1か所、サービスルームからおよそ42m離れた地点で採取した堆積糞からS. Sが分離され、KM, SM, TMP及びTC耐性であった。敷料検査結果（2回目）では8か所中1か所、サービスルーム近く採取した堆積糞からS. Sが分離され、KM, SM, TMP及びTC耐性であった。敷料検査結果（3回目）では発酵終了時の堆積糞200gからS. Sが分離され、KM, SM, TMP及びTC耐性であった。

カンピロバクターについては、1回目、3回目はPCR、培養とも陰性、2回目は1か所で採材した検体からPCRで痕跡が認められたものの、培養では陰性であった。一方、発酵専用プラントの発酵糞からはサルモネラは検出されず、カンピロバクターはPCRで痕跡が認められたが、分離はできなかった。

これらの結果から、堆積糞の不十分な発酵により、サルモネラの残存、及びカンピロバクターの残存の可能性が示唆された。

④ 分離菌（*Campylobacter*）の遺伝子解析

遺伝子解析を行った結果は以下のとおりであった（表15）。

平成30年10月のF養鶏S農場から出荷された肉用鶏の盲腸内容物に分離された*C. jejuni* (mP-Bit:0-260, RFLP:III, b) は、令和2年5月に同農場から出荷された盲腸内容物から分離され、令和2年9月に実施した同農場の6週目週齢時点での鶏舎内ソックスワブ及び同ロットの出荷時の肉用鶏の盲腸内容物からも分離されたことから、同じ遺伝子型の*C. jejuni*が生残している可能性が高いと考えられた。

令和元年7月にF養鶏S農場の6週齢時点での鶏舎内ソックスワブから分離された*C. jejuni* (mP-Bit:11-311, RFLP:II. a, ST 4325) は、同じロットの出荷時の肉用鶏盲腸内容物のほか、令和2年5月、7月及び10月の出荷時の同農場別ロットの鶏盲腸内容物から分離されていることから、鶏舎内に生残している可能性が高いと考えられた。

これらの株の他に、同農場では平成30年10月にはMLST、ST1945株が分離されたほか、令和2年5月には、MLST(ST 407株) (mP-Bit 138-55, RFLP:IV, c) が分離されていることから、

外部からの侵入も考えられた。

一方、F養鶏M農場から分離されたカンピロバクターの遺伝子型は表16のとおりであった。

平成30年11月に分離された株（MP-BIT：359，RFLP：I，a，MLST：4526）は、平成31年1月にも分離された株と同一のものであった（MP-BIT：359，RFLP：I，a，MLST：4526）。令和元平成31年7月に実施した経時的検査において、環境中や餌から分離された株は、以前に分離されたものとは異なる遺伝子型の株（mP-Bit：58-247，RFLP：V，a及びVI，a，ST：3926）であった。一方で、腸管内容物から分離された株（mP-Bit：1558-487247，RFLP：I，a，ST：4526）は、平成30年11月から継続的に分離されている菌株（ST：4526、NA，OFLX，CPFX耐性）が、外来株のTC及びOTC耐性を獲得したものであることが明らかになった。

MLST解析の結果、いずれもCC：ST21に属する株であったことから、全く異なる由来の株ではないと推察された。

表15 S農場5号鶏舎由来*C. jejuni*の遺伝子解析結果

ロット	採材時期	検体	P-BIT/ 0-260	RFLP	MLST /ST	P-BIT/ 11-311	RFLP	MLST /ST	その他	RFLP	MLST /ST
1	2018.10	腸管内容物	○	Ⅲ,b	22				2-33	I,a	1945
2	2019.07	鶏舎内スワブ 6週				○	Ⅱ,a	4325			
	2019.08	腸管内容物				○	Ⅱ,a	4325			
3	2020.05	腸管内容物	○	Ⅲ,b	22	○	Ⅱ,a	4325	138-55	Ⅳ,c	407
4	2020.07	腸管内容物				○	Ⅱ,a	4325			
5	2020.09	鶏舎内スワブ 6週	○	Ⅲ,b	22						
	2020.10	腸管内容物	○	Ⅲ,b	22	○	Ⅱ,a	4325			

表16 M農場で分離された*C. jejuni*遺伝子解析及び薬剤耐性結果

ロット	採材時期	検体	P-BIT	RFLP	MLST /ST	DR
1	2018.11	腸管内容物	15-359	I,a	4526	NA,CFLX,CPFX
	2018.11	腸管内容物	15-359	I,a	4526	CPFX
2	2019.01	腸管内容物	15-359	I,a	4526	NA,CFLX,CPFX
	2019.01	腸管内容物	15-359	I,a	4526	CPFX
3	2019.07	飼料	58-247	V,a	-	TC,OTC
	2019.08	鶏舎内スワブ 6週	10-47	Ⅵ,a	3926	TC,OTC
	2019.08	腸管内容物	15-487	I,a	4526	NA,OFLX,CFLX,CPFX,TC,OTC

⑤ F養鶏分離菌サルモネラの薬剤耐性獲得状況と種鶏場分離株の関連性

F養鶏の肉用鶏由来のS. S 238株とS. Infantis 43株について、試した10剤の薬剤に対する耐性株数と耐性率は次の通り。S. Sは、ABPC・SM・KM・TC・TMPの5剤に対する耐性を確認された。各薬剤に対する耐性率（耐性株数）とMICは

ABPC耐性0.8%（2株） MIC 128 µg/mL以上

SM耐性100%（238株） MIC 32～128 µg/mL以上

KM耐性49.2%（117株）、MIC 64～256 µg/mL以上

TC耐性96.6%（230株） MIC 32～64 µg/mL以上

TMP耐性97.9%（233株）、MIC16～64 µg/mL以上であった。

S. Sの薬剤耐性パターンは、2～5剤の5パターンが確認され、SM・KM・TC・TMPが48.3%（115株）で最も多く、SM・TC・TMPが45.4%（108株）、SM・TMPが3.4%（8株）、SM・TCが2.1%（5株）、ABPC・SM・KM・TC・TMPが0.8%（2株）で、農場別ではSM・TC・TMPのパターンの株が分離された農場が最も多かった（13農場）。

なお、令和2年に3度、F養鶏S農場の発酵済の堆積糞を検査し、3回連続でSM・KM・TC・TMP耐性のS. Sが分離された（再掲）。

S. Infantisは、ABPC・CTX・SM・TCの4剤に対する耐性が確認された。

試した10剤の薬剤に対する耐性株数と耐性率は次の通り。

ABPC・CTX・SM・TCの4剤に対する耐性が確認され耐性率（耐性株数）とMICは

ABPC耐性34.9%（15株） MICが128 µg/mL以上

CTX耐性32.6%（14株） MIC 4～32 µg/mL、

SM耐性100%（43株、MIC 64～256 µg/mL

TC耐性100%（43株）、MIC32～68 µg/mL以上 であった。

S. Infantisの薬剤耐性パターンは、2～4剤耐性の3パターンが確認され、

SM・TCが65.1%（28株）で最も多く、

ABPC・CTX・SM・TCが32.6%（14株）、

ABPC・SM・TCが2.3%（1株）

農場別ではSM・TCの薬剤耐性パターンの株が分離された農場が最も多かった（4農場）

異なる時期に複数回の検査を実施した5農場における分離株の薬剤耐性は、S農場で平成30年10月の検査でのみABPC耐性株が、M農場では令和元年9月の検査でのみNA耐性株が、令和元年11月の検査でのみKM耐性株が分離され、検査時期により分離株の薬剤耐性に違いがみられた。

雛マットからS. Sが分離されたことから、孵卵場、死籠り卵、種鶏場廃卵の検査を行ったところ、O種鶏場からS. S：KM、SM、TMP、TC耐性が分離され、その時期の卵を由来とする初生雛を導入していたS農場から分離されたS. Sの薬剤耐性獲得パターンは同一であった。O種鶏場を起源とする雛だけが入雛していた肉用鶏から分離されたS. Sは、すべてKM、SM、TMP、TC耐性であった。M種鶏場の卵を由来とする雛が入雛していた場合には、これとは異なる薬剤耐性パターン（KM感受性）が検出されたことから、種鶏場からの垂直感染が疑われた。

表17 Y県とM県の農場で分離されたサルモネラの薬剤耐性と遺伝子型

都道府県	採取年月日	農場	採取対象試料	血清型	薬剤耐性	遺伝子型
Y県	2018.10.11	S農場	腸内容物	Schwarzengrund	ABPC,KM,SM,TMP,TC	ST241
	2018.11.08	M農場	腸内容物	Schwarzengrund	SM,TMP,TC	ST241
	2019.01.24	F農場	腸内容物	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2019.04.15	Y農場	腸内容物	Schwarzengrund	SM,TMP,TC	ST241
	2019.05.21	FM農場	腸内容物	Schwarzengrund	SM,TMP,TC	ST241
	2019.05.31	NA農場	腸内容物	Schwarzengrund	SM,TMP,TC	ST241
	2019.06.21	S農場	雛マット	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2020.05.07	SY農場	腸内容物	Schwarzengrund	SM,TMP,TC	ST241
	2020.05.07	O農場(種鶏場)	廃棄卵	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2020.07.29	S農場	腸内容物	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2021.03.17	S農場	腸内容物	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2022.03.07	S農場	腸内容物	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2022.07.01	S農場	腸内容物	Schwarzengrund	SM,TC	ST241
	2022.07.29	S農場	腸内容物	Schwarzengrund	SM,TC	ST241
	2022.08.18	S農場	雛マット	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2022.08.18	S農場	腸内容物	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
M県	2019.08.26	M,Y農場	腸内容物	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2020.08.12	Eファーム	貯水タンク 水	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2021.04.23	Eファーム	腸内容物	Schwarzengrund	SM,TC	ST241
	2021.11.10	Eファーム	腸内容物	Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	ST241
	2022.10.19	Eファーム	腸内容物	Schwarzengrund	KM,SM,NA,TMP,TC	ST241

小課題 1 - (2) 飼養段階における汚染の把握

① 環境検体の経時的検査による汚染把握

表 18 Y 県の A、B 農場での経時的食中毒菌検査結果

農場	採取時期	令和1年						令和2年					
		鶏舎内スワブ	雛マット	飼料	換気扇スワブ	鶏舎外スワブ	盲腸内容物	鶏舎内スワブ	雛マット	飼料	換気扇スワブ	鶏舎外スワブ	盲腸内容物
A	導入前	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	導入時	—	S.S	—	—	—	—	S.S	—	—	—	—	—
	3週目	S.S	—	—	—	—	—	S.S	—	—	—	—	—
	6週目	S.S, C.j	—	—	S.S	S.S	—	S.S	—	—	—	S.S	—
	出荷時	—	—	—	—	—	S.S (3/4) C.j (4/4)	—	—	—	—	—	S.S (5/5) C.j (5/5)
B	導入前	—	—	—	—	—	—	—					
	導入時	S.S	—	—	—	—	—						
	3週目	S.S, C.j	—	C.j	—	—	—						
	6週目	S.S, C.j	—	—	—	S.S, C.j	—						
	出荷時	—	—	—	—	—	S.S (2/5) C.j (5/5)						

注記) S.S: *Salmonella* Schwarzengrund C.j: *Campylobacter jejuni* — : 不検出
盲腸内容物 (陽性数/検体数)

- ・ A, B 農場とも、導入3週齢から鶏舎内スワブ検体から S. S が検出された。
- ・ B 農場では導入3週齢で飼料から C. j が検出され、鶏舎内スワブからも検出された。
- ・ 導入前及び導入時までは、C. j の検出はない。
- ・ 分離されたカンピロバクターの MLST による解析では、MLST タイプが令和元年には 4325、令和2年には 22、407 及び 4325 が存在した。（表 19）
- ・ カンピロバクターは、出荷時盲腸内容物の検査した全羽から $1.3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^7$ cfu/g で検出された。S. S の菌数は測定不能であった。
- ・ S. S は導入3週齢から鶏舎内に拡散していることが示唆された。
- ・ C. j は導入3週齢で飼料から検出され、その後も鶏舎内スワブから検出されていることから、飼料を介した汚染の可能性が示唆された。また、導入6週齢の鶏舎内スワブ及び出荷時盲腸内容物から同じ MLST タイプの C. j が検出されていることから、6週齢時から出荷まで同じタイプの C. j を保菌し続けている可能性が示唆された。
- ・ カンピロバクターは導入後3週齢までは検出されないため、垂直感染はないことが推察された。また、MLST 解析結果から、鶏舎内に古くに侵入して定着している株と比較的最近侵入して定着している株が共存していると考えられた。

表 19 分離されたカンピロバクターの遺伝子解析結果

出荷時期	中抜き 有無	試験区		対照区		その他 鶏舎	
		環境	死鳥 盲腸内容物	環境	死鳥 盲腸内容物	環境	死鳥 盲腸内容物
2018年10月						[0-260] ST22	
						[2-33] ST1954	
2019年8月						[11-311] ST4325	[11-311] ST4325
						[11-311] ST4325	
2020年5月						[0-260] ST22	[0-260] ST22
						[138-55] ST407	[138-55] ST407
2020年7月						[11-311] ST4325	[11-311] ST4325
2020年9月						[11-311] ST4325	
						[0-260] ST22	[0-260] ST22
2021年3月			[11-311] ST4325		[11-311] ST4325		[11-311] ST4325
			[0-260] ST22				[0-260] ST22
2021年5月	○	C.jejuni	[11-311] ST4325		[11-311] ST4325		
				[0-260] ST22	[0-260] ST22		
2021年7月		[11-311] ST4325	[11-311] ST4325	[11-311] ST4325	[11-311] ST4325		
2021年12月		不検出	[11-311] ST4325	不検出	不検出		
2022年3月	○		C.jejuni		C.jejuni		
2022年5月	○	不検出	6週死鳥 [11-311] ST4325 出荷時不検出	不検出	[11-311] ST4325		
2022年7月		不検出	不検出	不検出	不検出		
					出荷時		
2022年9月	○	不検出	[11-311]	不検出	[11-311] ST4325		
					出荷時 [58-47] ST4389	種鶏場分離株 ST354	2022年10月
2022年11月		不検出	5週死鳥 [58-47] ST4389 出荷時	不検出			
					出荷時 [58-47] ST4389		

② M県のE商事汚染実態把握

30鶏群のサルモネラ、カンピロバクター陽性率はそれぞれ、83%、74%であった。
令和2年8月～9月のM農場の1鶏舎における経時的環境検査の結果は下表のとおりであった。

表20 E商事のM農場の1鶏舎における経時的環境検査の結果

	鶏舎内スワブ	鶏舎外スワブ	貯水タンク 水	末端水	換気扇	飼料
導入前	S.S C痕跡#	S.S	S.S*、C痕跡	S.S	S.S△	
導入時	C痕跡	S.S*				C痕跡
3週齢	S.S C痕跡	S.S*、C痕跡		C痕跡	S.S△、C痕跡	
7週齢	S.S C痕跡	S.S*、C痕跡		S.S、C痕跡	S.S△、C痕跡	

注記) *: 導入時、3週齢及び7週齢の鶏舎外スワブからのS.S分離株の薬剤耐性パターンが一致。△: S.Sの薬剤耐性パターン一致。# C痕跡: 培養では検出されなかったがPCRで痕跡が認められた。

出荷時の盲腸内容物については、サルモネラは増菌により5羽中5羽から検出、カンピロバクターは定量試験において検出限界以下であったが増菌培養により5羽中3羽からC. jejuniが分離された。

サルモネラについては、肉用鶏を出荷後、堆積糞はすべて搬出し、洗浄消毒しているにもかかわらず、洗浄消毒不足が示唆された。また、S.S分離株の薬剤耐性パターンが一致したことから、導入時から7週齢まで持続的に汚染していることが示唆された。特に、導入前に鶏舎ごとに設置されている貯水タンク（200リットル）並びに導入前及び7週齢時の末端水からS.Sが分離されたことから、飲水が汚染されている可能性が示唆された。なお、飲水用の水は、井戸水をくみ上げ、鶏舎ごとに設置されている貯水タンク（ワクチン飲水投与時にも使用するタンク）に貯水されていたが、井戸水の消毒（次亜塩素酸ナトリウムの添加）は実施されていなかった。導入前、3週齢、7週齢の換気扇から同じ薬剤耐性パターンのS.Sが分離され、空舎時の洗浄消毒不足の可能性が高いと考えられた。

カンピロバクターについては、出荷時の盲腸内容物から分離されたC. jejuniは、環境中に生残していたと考えられた。

小課題1-（3）衛生管理対策の開発

①夏期の石灰散布介入による食中毒菌低減効果の試行

夏季の石灰散布の結果、鶏舎内外スワブからのサルモネラ及びカンピロバクターの分離状況に有意な差はみられなかった。

表21 介入鶏舎と対照鶏舎の出荷時の生鳥の盲腸内容物の食中毒菌検査結果

【サルモネラ】

介入鶏舎		対照鶏舎		t検定
陽性数/検体数	率 (%)	陽性数/検体数	率 (%)	p > 0.05
5/5	100	4/5	80	

【カンピロバクター】

介入鶏舎		対照鶏舎		t検定
菌数	平均 (log)	菌数	平均 (log)	p > 0.05
$4.2 \times 10^5/g \sim 1.4 \times 10^5/g$	5.8/g	陰性 $\sim 6.7 \times 10^5/g$	4.39/g	

- 介入試験を行った鶏舎において、入雛時からサルモネラが検出された。
- 石灰散布を行っている介入鶏舎では、6週齢に鶏舎内からC. jejuniが検出され、一方、対照鶏舎では3週齢からC. jejuniが検出された。出荷時の盲腸内容物のC. jejuniの菌数については、有意差は認められないものの対照鶏舎のほうが少ない状況にあった。サルモネラ介入試験を行った鶏舎において、入雛時からサルモネラが検出され、発酵済み堆積糞に由来するものと推察された。
- カンピロバクターは6週齢の鶏舎内スワブから検出され、遺伝子解析の結果、平成30年10月及び令和2年5月に同一鶏舎から検出された株と同じタイプ（mP-Bit 0-260）であり、VBNCとして残っている可能性も否定できなかった。

②プロバイオティクス投与による食中毒菌低減効果の試行

試験鶏舎の他のサイクルと比較しても、カンピロバクターの汚染率、菌数ともに有意差は認められなかった。対照鶏舎の鶏群からは、出荷時の盲腸内容物からカンピロバクターは検出されなかった。プロバイオティクスに関する試験は令和4年度以降実施しなかった。

③空舎期間の洗浄・消毒を徹底しての介入

F養鶏における空舎期間の洗浄・消毒を徹底しての介入結果は表22のとおり。

表22 F養鶏における空舎期間の洗浄・消毒を徹底しての介入結果

F養鶏:令和3年6月入雛 試験区：1号鶏舎堆積糞搬出後、洗浄消毒徹底、対照区：4号

		鶏舎内スワブ	鶏舎周囲スワブ	飼料	鶏舎内末端水	換気扇ほこり	サービスルームスワブ	糞マット	死鳥	盲腸内容物 (陽性数/検体数)
入雛前	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	—	S.S	NT	—	S.S	S.S	NT	NT	NT
入雛時	試験区	—	—	S.S	—	—	—	—	—	—
	対照区	—	—	—	NT	NT	S.S	—	NT	NT
1週	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	S.S S.S	NT
2週	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	—	NT
3週	試験区	S.S	S.S	—	—	S.S	S.S	—	S.S	—
	対照区	S.S	—	—	NT	S.S	S.S	NT	—	NT
4週	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	S.S S.S	NT
5週	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	S.S S.S C. jejuni	NT
6週	試験区	S.S	S.S	—	—	S.S	S.S	—	S.S	—
	対照区	S.S	—	—	NT	S.S	S.S	NT	S.S C. jejuni	NT
出荷時	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	サルモネラ：8/10 C. jejuni (対照区の10分の1程度の菌量) サルモネラ：7/10 C. jejuni

注記： NT：検査せず —：検査したがサルモネラ・カンピロバクターともに不検出
S.S：Salmonella Schwarzengrund

表23 同鶏舎の10月入雛の1及び4号鶏舎の経時的検査結果

		鶏舎内スワブ	鶏舎周囲スワブ	飼料	鶏舎内末端水	換気扇ほこり	サービスルームスワブ	糞マット	死鳥	盲腸内容物 (陽性数/検体数)
入雛前	試験区	—	S.S	—	—	—	S.S	—	—	—
	対照区	—	S.S	NT	—	S.S	S.S	NT	NT	—
入雛時	試験区	—	—	—	—	—	S.S	—	—	—
	対照区	—	—	—	NT	NT	S.S	—	NT	—
1週	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	— S.S	—
2週	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	— S.S	—
3週	試験区	S.S	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	S.S	—	S.T	NT	NT	NT	NT	S.S S.S	—
4週	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	S.S S.S	—
5週	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	S.S S.S	—
6週	試験区	S.S	—	—	—	S.S	S.S	—	S.S	—
	対照区	S.S	—	S.S	NT	S.S	S.S	NT	S.S C. jejuni	—
出荷時	試験区	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	サルモネラ：9/10 C. jejuni：10/10 サルモネラ：7/8 C. jejuni：0/8

注記： NT：検査せず —：検査したがサルモネラ・カンピロバクターともに不検出
S.S：Salmonella Schwarzengrund S.T：Salmonella Typhimurium

令和3年6月入雛のサイクルでは、雛導入前における堆積糞の搬出や鶏舎の洗浄消毒を実施し、雛導入前の時点では鶏舎内の環境サンプルから食中毒菌は分離されなかったものの、サルモネラは3週齢ですべての環境サンプルから、カンピロバクターは6週齢で鶏舎内から検出され、出荷時の盲腸内容物から両菌が検出された原因としては、飼料の汚染が考えられ、分離株の血清型がS. Sであったこと、薬剤耐性パターンが本鶏農場で頻繁に検出されるタイプであったことから、給餌パイプの汚染が考えられた。

空舎期間中の給餌パイプの洗浄について、現場で実施可能な方法や程度を検討する必要がある。出荷時の腸内容物の定量及び定性試験結果から、洗浄消毒を徹底していた期間の効果が少なからず継続しているように思われた一方で、この次のサイクルのチップ搬入前では、サルモネラは不検出であったものの、床面の大腸菌群の菌量は前回より多くなっており、一旦汚染されると清浄化を保つのは難しいことが示唆された。床面に堆積糞の山が存在しない、すなわち、床面及び天井柱の洗浄消毒は徹底できることから、食品安全上の観点では、発酵堆積糞の使用を中止すべきであるが、使用済み堆積糞の処理費用及び搬出した堆積糞の受け入れ先、新品チップの購入費用と労働への負担増加等を考慮すると困難であることが予測された。発酵堆積糞を使用していても、カンピロバクターが検出限界以下となる場合もあることから、より乾燥状態にも耐えられるサルモネラの不活化を確実に達成できる堆積糞の完熟化の手法の確立が必要な対策と考えられた。

令和3年10月入雛ロットでは、入雛前に環境から環境サンプルから食中毒菌は分離されなかったものの、サルモネラは3週齢ですべての環境サンプルから、カンピロバクターは6週齢で鶏舎内から検出され、出荷時の盲腸内容物から両菌が検出された。対照鶏舎では6週齢の死鳥からカンピロバクターが検出されたが、出荷時盲腸内容物からは不検出であった原因はわからなかった。

E商事において令和3年5、7、9月、E農場2鶏舎（3号、5号鶏舎）で各3サイクル、経時的調査を行った結果は以下のとおり。

表24 E商事における経時的環境検査の結果

		鶏舎内 スワブ	鶏舎周囲 スワブ	飼料	鶏舎内 末端水	換気扇 ほこり	サービス ルームスワブ	鶏マット	原水 (鶏舎共通)	貯水タンク (鶏舎共通)	鶏舎内 貯水タンク	盲腸内容物	ムネ肉
新品チップ 搬入前	試験区	2/3	1/3	NT	NT	0/3	NT	NT	0/2	0/2	0/2	NT	NT
	対照区	1/3	3/3			2/3				0/2			
入雛前	試験区	0/3	0/3	NT	NT	0/3	2/3	NT	0/1	0/1	0/1	NT	NT
	対照区	2/3	2/3			1/3	0/3			0/1			
入雛時	試験区	2/3	2/3	0/3	0/2	NT	0/3	0/3	NT	NT	NT	NT	NT
	対照区	0/3	1/3	0/3	0/2		0/3	0/3					
1週	試験区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2週	試験区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
3週	試験区	3/3	2/3	0/3	NT	2/3	2/3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
4週	試験区	2/3	2/3	0/3		2/3	2/3						
5週	試験区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6週	試験区	3/3	3/3	0/3		1/3	3/3						
0週	campylobacter	0/3			NT			NT	NT	NT	NT	NT	NT
	対照区	3/3	3/3	0/3		3/3	3/3						
出荷時	試験区											9/25	9/9
	対照区	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	campylobacter 1/25	campylobacter 0/9
												18/25	9/9
												campylobacter 5/25	campylobacter 4/9

表内の数字：陽性回数/検査回数

上段 サルモネラ 6週及び出荷時 下段 カンピロバクター
NT：検査せず

<サルモネラ>

F養鶏の1号鶏舎で食中毒菌排除に成功した洗浄消毒方法をE商事の試験鶏舎で令和3年5月に実施したが、入雛前に、鶏舎内、換気扇埃、天井柱、ブルーダー傘および鶏舎周囲からサルモネラが検出され、試験農場の条件を満たせなかった。

続いて7月入雛のサイクルではF養鶏の試験鶏舎（1号鶏舎）で成功した洗浄消毒方法をより徹底的に実施したが、入雛前に、鶏舎内天井柱、ブルーダー傘および鶏舎周囲からサルモネラ属が検出され、試験農場の条件を満たせなかった。

9月入雛のサイクルでは鶏舎内外のスワブからサルモネラが検出されたが、ほかの環境サンプルからは分離されなかった。

<カンピロバクター>

3号鶏舎の出荷時盲腸内容物の予備調査では*C. jejuni*と*C. coli*が検出されたが、5月入雛では*C. coli*のみ検出され、7月、9月入雛鶏群はカンピロバクターは10羽検査したが、すべて検出されなかった。

M県のE商事では、F養鶏の試験鶏舎では達成できた入雛時環境からの食中毒菌の排除ができなかった。その原因としては、洗浄消毒に必要な作業従事者の技術力や使用する機材の性能などが考えられた。今後マニュアル化する際に、細部に至るまでの手法や性能、簡易検査等の実施に配慮する必要がある。また、常に洗浄消毒担当者が食中毒菌を排除するという高いモチベーションとそれを持たせるトップマネジメントのコミットメントが必要であろう。

小課題1・(1)～(3) 小括

サルモネラの汚染源

- ・ 導入前の孵化場、雛マットからS.Sが検出されたことから、農場よりも上流での汚染が疑われた。
- ・ 発酵後の堆積糞からも検出されたことから、発酵不足または攪拌不足でサルモネラが生残した可能性が考えられた。
- ・ 飼料からサルモネラが検出されたことから、飼料も汚染源と考えられたが、雛由来の菌のほうが優位で、出荷時には餌由来の血清型の菌が盲腸内容物から検出されなかったと考えられた。
- ・ 導入3週齢から鶏舎内スワブ検体からS.S検出されたことから、この時期には鶏舎内にS.Sは拡散していることが示唆された。
- ・ 出荷後、鶏舎の洗浄消毒を徹底し、鶏舎環境から食中毒細菌を排除するのは困難であり、微生物検査による洗浄消毒方法の妥当性確認と検証が必要である。

カンピロバクターの汚染源

- ・ 導入後3週までは検出されない（多くの場合で6週齢まで検出されない）ことから、文献で指摘されているように垂直感染は極めて低いことが推察された。
- ・ MLSTによる解析結果から、鶏舎内に古くに侵入して定着している株と比較的最近侵入して定着している株が共存していると考えられた。
- ・ また、飼養中の3週齢以降に鶏舎にカンピロバクターを持ち込む汚染源が何かは特定も推定もできなかった。（飼料・飲料水から遺伝子が検出されたケースはあったが、鶏群の汚染源となっているのかについては解明できなかった）

(エ) 研究成果の活用における留意点

F養鶏の農場では堆積養鶏を実施している等、研究協力農場の特徴を考慮の上で結果を解釈する必要。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

商業用農場における試験設計・実施の困難性。

小課題2：農場における食中毒菌の侵入及び蔓延の汚染源の確認と有効な衛生管理手法の検討 (汚染源確認と衛生管理手法の一般化) (小課題責任者名：豊福 肇・研究機関：山口大学)

(ア) 研究目標

ある鶏舎環境で、このような衛生管理対策を講じれば、再現性をもって汚染リスクを低減することができるという事例（例．鶏舎の洗浄・消毒方法）、また、農場調査（孵化場調査も含む。）や各対策の再現性を証明するためのデータ収集（サンプリングや検査法等）の事例を示すとともに、重点的なリスク因子や対策の決定の過程も成果に含める。事例の中で取り組んだ各対策については、定量的な方法論として示すとともに、各対策の現場作業の様子を、写真等を活用してわかりやすく紹介する。

飼養衛生管理基準の構成・項目に基づいて、文献調査や農場調査で得られた知見や農場の疫学的な特徴を「農場調査表」に整理のうえ網羅的に把握し、重要なリスク因子に対して重点的に衛生管理対策をとり、その結果、食中毒菌がこれだけ減ったというアプローチの事例を収集し、広く公表・周知できるようにする。

(イ) 研究内容

小課題2・(1) 養鶏業者への介入試験と対策

試験農場において、鶏舎の洗浄消毒方法や、食中毒菌の侵入または蔓延に寄与する可能性が高いと農場調査表から考えられる重要なリスク因子に対する介入対策について、実施した結果、肉用鶏の盲腸内容物中の食中毒菌がどのように変化するか等を調査し、実際に効果があるということを示すとともに、定量的な方法論として示すためのデータ収集を試みた。

まず、飼養衛生管理基準の構成・項目に基づいて、小課題1の文献調査や農場調査で得られた知見や農場の疫学的な特徴を「農場調査表」に整理するための様式を作成した。その上で、F養鶏におけるS農場1号鶏舎（試験鶏舎）及び4号鶏舎（対照鶏舎）、E商事におけるE農場5号鶏舎（試験鶏舎）及び3号鶏舎（対照鶏舎）を試験対象農場の候補と位置づけ、各対象農場の「農場調査表」及び消毒洗浄工程書を作成した。

「農場調査表」にて整理した経時的サンプリングでの検出履歴や衛生管理の実施状況に基づき、F養鶏の農場においては、雛、鶏舎、堆積糞、飼料（パイプを含む）、鶏舎周囲が重要なリスク因子であると考えられたことから、各重要なリスク因子に対する介入措置を実施し、評価パラメータを設定の上、入雛から搬出までを1サイクルとし、9サイクルについて、試験鶏舎と対照鶏舎での比較を行った。重要なリスク因子と試験農場で行った介入措置、その評価パラメータ及び実施サイクルは次表のとおり。

表25 重要なリスク因子、実験農場で行う介入措置、評価のパラメータ及び実施サイクル

重要な リスク 因子	カンピロ バクター	サルモ ネラ	実験農場で行う 介入措置	評価パラメータ	試験鶏群数 (サイクル)
糞※1	△	○	種鶏場でのバイオセキュリティ対策、サルモネラワクチン（SE, ST, SI 3 種）の接種 孵卵場でのバイオセキュリティ対策	【共通】出荷時盲腸内容物の汚染（n=10/群）のカンピロ（定性・定量）、サルモネラ（定性） 【共通】死鳥からのサルモネラ、カンピロバクターの分離 （特に1週齢未満の遺残卵黄） 社内実施の種鶏場 ふき取り検査 サルモネラ検査の実施	8 (1サイクル) (2サイクル) (4サイクル) (6サイクル) (7サイクル) (8サイクル) (9サイクル)
長靴	○	○	外履き長靴のサービスルーム持込禁止 鶏舎内入口の踏込消毒を石灰溶液（10倍）に変更	サービスルーム拭き取り検査 外履き長靴を脱いだ際に使用するすこの拭き取り検査（サルモネラ、カンピロバクター、腸内細菌科菌群） 踏込槽の石灰溶液pHの測定	2 (8サイクル) (9サイクル)
飼料パイプ	△	○	出荷時の飼料パイプの可能な範囲で洗浄 →給餌パイプの洗浄は不可能 飼料の定期的なモニタリング検査	導入時、3週齢、6週齢時の飼料サンプル（サルモネラ、カンピロバクターの定性検査）	-
鶏舎間 共用機材	○	○	共用機材の徹底した消毒 →秤については1号鶏舎専用 4号鶏舎は鶏舎間共用 ガード、ドリンカーはすべての鶏舎共用	導入時、3週齢、6週齢に使用した鶏舎間共用機材の拭き取り検体（サルモネラ、カンピロバクターの定性検査）	3 (7サイクル) 防水用秤に変更 (8・9サイクル) 防水用秤の消毒手順の見直し
重要な リスク 因子	カンピロ バクター	サルモ ネラ	実験農場で行う 介入措置	評価パラメータ	試験鶏群数 (サイクル)
作業員の服	○	○	鶏舎外で着用していた作業服はサービスルーム前の糞の上で脱ぐ →作業服をすこの上で着替えるのは不可能。	導入時、3週齢、6週齢に使用した作業服の拭き取り検体（サルモネラ、カンピロバクターの定性検査）	-
手袋	△	○	アルコール消毒液スプレーの変更 消毒スプレーを屋内に設置	手袋のふき取り検体 （サルモネラ、カンピロバクターの定性検査）	2 (8サイクル) (9サイクル)
鶏舎内の キャリー オーバー	○	○	鶏舎洗浄・乾燥、消毒	チップ導入前の床面の腸内細菌科菌群の検査、チップ導入前及び雛導入前の鶏舎内外の環境サンプル（サルモネラ、カンピロバクターの定性検査）	6 洗浄消毒プログラム見直し (2, 4, 6, 7, 8 9サイクル)
サービス ルーム	○	○	1回/週のサービスルーム内の石灰散布 害虫侵入防止 サービスルーム内に粘着シートを設置 (9サイクル目) 入雛後の雛マット搬出後のサービスルームの石灰散布 1回/週 階段部分の石灰散布	サービスルーム拭き取り検査	2 (8サイクル) (9サイクル)

注記:食中毒菌の下の一〇は関連性大きい、△はやや関連性がある

また、各サイクルで経時的な環境検査を実施し、カンピロバクター及びサルモネラの分離検査を実施した。カンピロバクターについては、mP-Bit法及びMLST解析まで実施した。環境検査で採材した場所及び採材時期は以下のとおり。さらに、試験鶏舎と対照鶏舎での生産性を比較するため、各鶏舎のプロダクションスコア情報の収集も行った。

表26 カンピロバクター及びサルモネラの経時的分離検査を実施した採材場所及び時期

採材場所	鶏舎内（ソックススワブ）、鶏舎周囲（ソックススワブ）、換気扇埃、鶏舎内天井柱部分、ブルーダー傘部分、鶏舎内末端水栓、サービスルーム（ソックススワブ）、雛箱内の敷マット（ガーゼ拭き取り）、飼料、ガード、生鳥かご、ドリンカー、鶏舎入口に設置している簀の子全体、手袋、体重測定用ガード、台秤底、鶏舎内長靴
採材時期	入雛前、入雛時、導入後3週、6週、出荷時（盲腸便）及び、各週の死鳥（遺残卵黄ほか）

小課題2・（2）洗浄消毒方法の再現性試験

F養鶏1号鶏舎で出荷後鶏舎内環境から食中毒菌を排除できた洗浄消毒方法を参考に、E商事E農場への再現性を検証するため、F養鶏の手順を参考に、E商事E農場において、F養鶏の洗浄消毒手順を実施する試験区（5号舎）と、従来の洗浄消毒手順で実施する対照区（4号舎）を設定の上、洗浄消毒を実施し、その効果を確認した。洗浄消毒プログラムは以下の図のとおり。なお、検証は2サイクル（令和4年8月及び10月）で実施したが、2サイクル目は、鳥インフルエンザ防疫対策の関係上、対照区においても石灰塗布工程が追加された。

図1 設定した空舎後の鶏舎の洗浄消毒プログラム

設定した洗浄消毒プログラム							
試験区(5号舎)				対照区(4号舎)			
	使用薬剤	倍率	薬液量		使用薬剤	倍率	薬液量
除糞				除糞			
予備洗浄	バイオソルブ	100倍	540ℓ				
水洗				水洗			
天井・壁消毒	アストップ200	100倍(発泡)	540ℓ	天井・壁消毒	アストップ200	500倍(散布)	200ℓ
床面消毒	ゼクトン	100倍	540ℓ	床面消毒	ゼクトン	250倍	200ℓ
生石灰	生石灰	10倍	60kg	生石灰	生石灰	10倍	60kg
チップ搬入				チップ搬入			
煙霧消毒	ヘルミン	10倍					
							(再現試験2回目のみ石灰塗布あり)

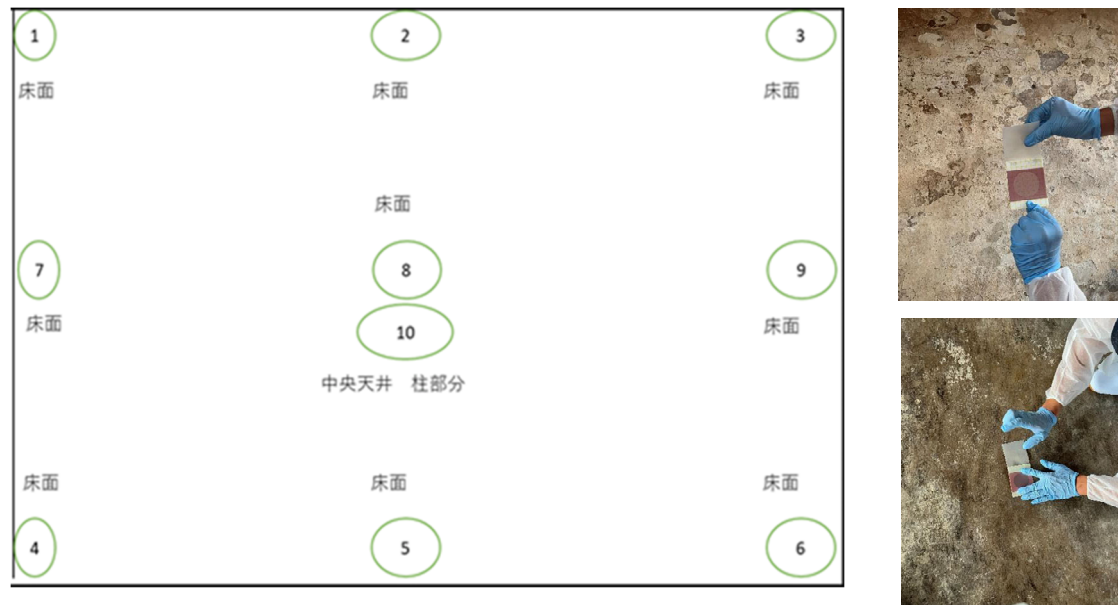
5号鶏舎では床水洗後に天井消毒までの間に1日乾燥の日があった。
実際の作業の流れは表27のとおり

表27 実際の洗浄消毒の実施の流れ

鶏舎	作業	8月18日							8月19日							8月20日							8月21日	8月22日							8月23日							8月24日									
		8	9	10	11	13	14	15	16	17	8	9	10	11	13	14	15	16	17	8	9	10		11	13	14	15	16	17	8	9	10	11	13	14	15	16	17	8	9	10	11	13	14	15	16	17
4号舎	予備洗浄																																														
	水洗																																														
	天井・壁消毒																																														
	床面消毒																																														
	石灰撒入																																														
5号舎	予備洗浄																																														
	水洗																																														
	天井・壁消毒																																														
	床面消毒																																														
	石灰																																														
	石灰撒入																																														
	産糞消毒																																														
4号舎	予備洗浄																																														
	水洗																																														
	天井・壁消毒																																														
	床面消毒																																														
	石灰																																														
5号舎	予備洗浄																																														
	水洗																																														
	天井・壁消毒																																														
	床面消毒																																														
	石灰																																														
	石灰撒入																																														
	産糞消毒																																														

検体の採取のタイミングは、洗浄前、消毒後、新品チップ搬入前とした。採取場所は床面、天井柱の計10か所（以下平面図に示す）で腸内細菌科菌群シート培地にてふき取り採取した。また、同検体を用いてカンピロバクター及びサルモネラの分離検査を実施した。フロー図に記載している通り、対象区4号舎では1回目は、石灰散布は実施していないが、2回目は、石灰塗布を行った。なお、いずれのサイクルとも、洗浄前に出荷した鶏群はサルモネラ、カンピロバクターとも陽性であった。

図2 微生物検査のサンプリング箇所



また、農場共用物品による持込の可能性を検討するため、令和4年8月、鶏舎内及び鶏舎周囲以外の農場内の倉庫に保管されている共用物品をガーゼによるふき取り検査を実施した。

(ウ) 研究結果

小課題2・(1) 養鶏業者への介入試験と対策

飼養衛生管理基準の構成・項目及び文献調査や農場実態調査から整理した「農場調査表」は別紙2のとおり。

また、F養鶏における試験鶏舎及び対照鶏舎のサイクル毎の入雛及び出荷日、概要及びProduction Scoreは以下のとおりであった。

表28 9サイクルの入雛日、概要及びProduction Score

サイクル	試験区		対照区		概要	Production Score	
	1号舎		4号舎			1号舎	4号舎
	入雛日	出荷日	入雛日	出荷日			
1	2021/3/22	2021/5/15	2021/3/29	2021/5/10	1号舎;鶏糞搬出	350	378
2	2021/6/7	2021/7/24	2021/5/31	2021/7/16	1号舎;鶏糞搬出	339	333
3	2021/8/13	2021/9/28	2021/8/9	2021/9/23	鶏糞搬出なし(1号舎・4号舎)	352	343
4	2021/10/26	2021/12/13	2021/10/19	2021/12/4	1号舎;鶏糞搬出	355	374
5	2022/1/5	2022/2/19	2021/12/28	2022/2/14	鶏糞搬出なし(1号舎・4号舎)	386	336
6	2022/3/17	2022/5/3	2022/3/11	2022/4/28	1号舎;鶏糞搬出	362	355
7	2022/5/26	2022/7/11	2022/5/20	2022/7/5	1号舎;鶏糞搬出	331	329
8	2022/8/22	2022/10/7	2022/8/15	2022/9/30	1号舎;鶏糞搬出	380	325
9	2022/11/6	2022/12/22	2022/10/30	2022/12/15	1号舎;鶏糞搬出	385	396

F養鶏試験鶏舎及び対照鶏舎のサイクル毎の検査総数、陽性数及び陽性率は以下のとおりであった。

表29 各サイクルの検査総数と食中毒菌ごとの陽性検体数の推移

		サイクル										合計
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	総数	30	77	122	26	120	26	145	139	138	142	935
サルモネラ	陽性数	29	34	69	20	69	23	49	58	59	63	444
	陽性率	96.7%	44.2%	56.6%	76.9%	57.5%	88.5%	33.8%	41.7%	42.8%	44.4%	47.5%
カンピロバクター	陽性数	28	10	32	24	14	26	15	0	29	27	205
	陽性率	93.3%	13.0%	26.2%	92.3%	11.7%	100.0%	10.3%	0.0%	21.0%	19.0%	21.9%

経時的検査を実施していない、3, 5 サイクルを除くとサルモネラの陽性率は40－50%, カンピロバクターは0 から26%であった。

サルモネラ血清型では、*S. Schwarzengrund*、*S. Mbandaka* 及び *S. Typhimurium* が検出された。血清型のうち、約99%は、*S. Schwarzengrund* であり、その他、飼料から、*S. Mbandaka*、*S. Typhimurium*、*S. Infantis* がムネ肉から1検体ずつ、検出された。サルモネラのST型の解析結果では、すべて、ST241であった。

表30：9サイクルにおける環境検査の検査材料ごとのまとめ

採材場所別	検体数	サルモネラ		カンピロバクター	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
鶏舎内(ソックススワブ)	62	32	52%	3	5%
鶏舎周囲(ソックススワブ)	62	16	26%	0	0%
換気扇 ほこり	32	13	41%	0	0%
鶏舎内 天井柱部分	14	1	7%	0	0%
ブルーダー傘部分	14	1	7%	0	0%
鶏舎内末端水栓	6	0	0%	0	0%
サービスルーム(ソックススワブ)	54	29	54%	0	0%
雛箱内の敷マットガーゼふき取り	14	1	7%	0	0%
飼料	42	9	21%	0	0%
ガード	6	0	0%	0	0%
鶏舎内末端水栓	6	0	0%	0	0%
生鳥かご	4	0	0%	0	0%
ドリンカー	6	0	0%	0	0%
鶏舎入口に設置しているすのこ全体	2	1	50%	0	0%
手袋	20	2	10%	0	0%
体重測定用 ガード、台はかり底	16	7	44%	0	0%
農場 長靴(鶏舎内長靴)	22	3	14%	0	0%

- ・ 経時的環境検査では、チップ搬入前（試験区1号舎のみ）、導入前、導入時、3週齢、6週齢のサルモネラ、カンピロバクターの汚染状況を調査した。
- ・ サルモネラは、サービスルームから最も高率（54％）で検出され、次いで、鶏舎内、換気扇ほこりから40％以上、その他、飼料や鶏舎周囲からも検出された。
- ・ カンピロバクターは、鶏舎内ソックススワブから検出（検出率5％）されたが、その他の採取場所からは検出されなかった。

表 31 1号舎と4号舎の採材場所別、経時的環境検査 結果（サルモネラ）

採材場所別	サルモネラ					
	1号舎（介入鶏舎）			4号舎（対照鶏舎）		
	検体数	陽性数	陽性率	検体数	陽性数	陽性率
鶏舎内（ソックススワブ）	34	17	50%	28	15	54%
鶏舎周囲（ソックススワブ）	34	9	26%	28	7	25%
換気扇 ほこり	19	7	37%	13	6	46%
鶏舎内 天井柱部分	10	1	10%	4	0	0%
ブルーダー傘部分	10	1	10%	4	0	0%
鶏舎内末端水栓	3	0	0%	3	0	0%
サービスルーム（ソックススワブ）	27	11	41%	27	18	67%
雛箱内の敷マットガーゼふき取り	7	0	0%	7	1	14%
飼料	21	3	14%	21	6	29%
死鳥：盲腸便	168	88	52%	159	77	48%
死鳥：遺残卵黄	11	2	18%	15	0	0%
ガード	3	0	0%	3	0	0%
鶏舎内末端水栓	3	0	0%	3	0	0%
生鳥かご	2	0	0%	2	0	0%
ドリンカー	3	0	0%	3	0	0%
鶏舎入口に設置しているすのこ全体	1	1	100%	1	0	0%
手袋	10	0	0%	10	2	20%
体重測定用 ガード、台はかり底	8	3	38%	8	4	50%
農場 長靴（鶏舎内長靴）	11	2	18%	11	1	9%

いずれの採材場所においても、1号と4号のサルモネラ検出率に有意差は認められなかった（t検定）。

表32 1号舎と4号舎の採材場所別経時的環境検査 結果（カンピロバクター）

採材場所別	カンピロバクター					
	1号舎（介入鶏舎）			4号舎（対照鶏舎）		
	検体数	陽性数	陽性率	検体数	陽性数	陽性率
鶏舎内（ソックススワブ）	34	0	0%	28	2	7%
鶏舎周囲（ソックススワブ）	34	0	0%	28	0	0%
換気扇 ほこり	19	0	0%	13	0	0%
鶏舎内 天井柱部分	10	0	0%	4	0	0%
ブルーダー傘部分	10	0	0%	4	0	0%
鶏舎内末端水栓	3	0	0%	3	0	0%
サービスルーム（ソックススワブ）	27	0	0%	27	0	0%
雛箱内の敷マットガーゼふき取り	7	0	0%	7	0	0%
飼料	21	0	0%	21	0	0%
死鳥：盲腸便	168	0	0%	159	9	6%
死鳥：遺残卵黄	11	0	0%	15	0	0%
ガード	3	0	0%	3	0	0%
鶏舎内末端水栓	3	0	0%	3	0	0%
生鳥かご	2	0	0%	2	0	0%
ドリンカー	3	0	0%	3	0	0%
鶏舎入口に設置しているすのこ全体	1	0	0%	1	0	0%
手袋	10	0	0%	10	0	0%
体重測定用 ガード、台はかり底	8	0	0%	8	0	0%
農場 長靴（鶏舎内長靴）	11	0	0%	11	0	0%

いずれの採材場所においても、1号と4号のカンピロバクター検出率に有意差は認められなかった（t検定）

表33 サルモネラ 鶏舎内スワブ（6週齢以前）

飼養衛生管理基準の改正施行前（1～5サイクル）と改正施行後の比較（6～9サイクル）

	改正前		改正後		改正前	改正後
	1号（試験）	4号（対照）	1号	4号	1, 4号合計	1, 4号合計
陽性数	8	7	9	8	15	17
陰性数	7	5	10	8	12	18
合計	15	12	19	16	27	35
陽性率%	53%	55%	47%	50%	55%	49%
改正施行前1と4号鶏舎とで有意差なし					有意差なし	
1号で改正施行前後で有意差なし						
改正施行後1号と4号で有意差なし						

試験鶏舎、対照鶏舎とも飼養衛生管理基準の改正に伴う飼養衛生管理マニュアルの策定に関する改正施行前後で、陽性率に有意差は認められなかった。

表34 カンピロバクター 鶏舎内スワブ（6週齢以前）

飼養衛生管理基準の改正施行前(1～5サイクル)と実施後の比較（6～9サイクル）

	改正前		改正後		改正前		改正後	
	1号(試験)	4号(対照)	1号	4号	1, 4号合計		1, 4号合計	
陽性数	1	2	0	0	3		0	
陰性数	14	10	19	16	24		35	
合計	15	12	19	16	27		35	
陽性率%	7%	10%	0%	0%	11%*		0%*	
改正施行前1と4号鶏舎とで有意差なし 1号鶏舎で改正施行前後で有意差なし					改正施行前後で有意差*あり(p<0.05)			

カンピロバクターの鶏舎内スワブの陽性率は、1, 4号合計した場合、飼養衛生管理基準の改正施行後は施行前に比べ有意に低かった（11%から0%、 $p<0.05$ ）

表35 サイクル毎、試験鶏舎と対照鶏舎の出荷時盲腸内容物サルモネラ検査結果

検体	サイクル	検体数	試験区 1号舎				試験区 4号舎			
			陽性数	陽性率	分離株血清型	薬剤耐性パターン	陽性数	陽性率	分離株血清型	薬剤耐性パターン
盲腸便	1	10	7	70%	S.Schwarzengrund	SM,TMP,TC	10	100%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC
	2	10	10	100%	S.Schwarzengrund	SM,TC KM,SM,TMP,TC	10	100%	S.Schwarzengrund	SM,TC KM,SM,TMP,TC
	3	10	5	50%	S.Schwarzengrund	SM,TC KM,SM,TMP,TC	9	90%	S.Schwarzengrund	SM,TC KM,SM,TMP,TC
	4	10	9	90%	S.Schwarzengrund	SM,TC KM,SM,TMP,TC	7	70%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC
	5	10	10	100%	S.Schwarzengrund	SM,TC KM,SM,TMP,TC	7	70%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC SM,TC
	6	10	8	80%	S.Schwarzengrund	SM,TC KM,SM,TMP,TC	10	100%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC
	7	10	5	50%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	6	60%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC SM,TC
	8	10	4	40%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC	6	60%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC
	9	10	5	50%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC KM,SM,TC SM,TMP,TC	6	60%	S.Schwarzengrund	KM,SM,TMP,TC

試験鶏舎、対照鶏舎ともすべての鶏群はサルモネラ陽性であった。鶏群内陽性率は試験鶏舎で40%から100%（平均70%）、対照鶏舎で50%から100%（平均78%）で両者の間に有意差は認められなかった（t検定）。

表36 出荷時盲腸内容物サルモネラ検査結果の1号4号別、飼養衛生管理基準の改正施行前（1～5サイクル）と施行後の比較（6～9サイクル）

	改正前		改正後		改正前	改正後
	1号(試験)	4号(対照)	1号	4号	1, 4号合計	1, 4号合計
陽性数	41	43	22	28	84	50
陰性数	9	5	18	12	14	30
合計	50	48	40	40	98	80
陽性率%	82%(*1)	90%	55%(*1)	70%	86%(*2)	63%(*2)
改正施行前の1号と4号鶏舎で陽性率に有意差なし 1号鶏舎において改正施行前後で陽性率に有意差あり ($p<0.01$)(*1) 改正施行後の1号と4号鶏舎で陽性率に有意差なし 4号鶏舎において改正施行前後で陽性率に有意差なし					改正施行前後で陽性率に有意差あり ($p<0.01$)(*2)	

1号鶏舎において飼養衛生管理基準の改正施行後は実施前にくらべて陽性率は優位に低かった（82から55%、 $p<0.05$ ）。また1, 4号鶏舎合計でも飼養衛生管理基準の改正施行後は実施前にくらべて陽性率は優位に低かった（86から63%、 $p<0.05$ ）

表37 出荷時盲腸内容物のサルモネラ陽性率が70%以上であった鶏群の数

	改正施行前		改正施行後		改正施行前	改正施行後
	1号(試験)	4号(対照)	1号	4号	1, 4号合計	1, 4号合計
70%以上	4	5	1	1	9	2
70%未満	1	0	3	3	1	6
合計	5	5	4	4	10	8
70%以上の%	80	100	25	25	90%*	25%*
改正施行前鶏舎1と4号で有意差なし 1号鶏舎で改正施行前後で有意差なし 改正施行後1号と4号鶏舎で有意差なし					有意差あり($p<0.01$)	

サンプル中70%以上がサルモネラ陽性であった鶏群の比率は1, 4号合計すると、飼養衛生管理基準の改正施行後は実施前より有意に低かった（90%から25%）（1号単独ではn数が少ないため、飼養衛生管理基準の改正施行前後で80%から25%に減少していたが有意差は認められなかった。1, 4号鶏舎合計でみると、飼養衛生管理基準の改正施行により、サルモネラの陽性率は減少したと考えられた。

表38 サイクル毎、鶏舎毎のカンピロバクターの10羽中の陽性率、菌種及び菌数

1号鶏舎(試験鶏舎)					4号鶏舎(対照鶏舎)		
サイクル	入雛月	陽性率	菌種	菌数 (Cells/g)	陽性率	菌種	菌数 (Cells/g)
1	2021年3月	7/10	<i>C.jejuni</i>	ND(検出限界以下)	7/10	<i>C.jejuni</i>	$6.0 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^7$
2	2021年6月	10/10	<i>C.jejuni</i>	$6.9 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^6$	7/10	<i>C.jejuni</i>	$5.5 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^7$
3	2021年8月	10/10	<i>C.jejuni</i>	$1.5 \times 10^6 \pm 2.4 \times 10^6$	10/10	<i>C.jejuni</i>	$2.4 \times 10^7 \pm 2.7 \times 10^7$
4	2021年10月	10/10	<i>C.jejuni</i>	$8.4 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^6$	0/8	ND(検出限界以下)	
5	2022年1月	10/10	<i>C.jejuni</i>	$4.2 \times 10^6 \pm 5.9 \times 10^6$	10/10	<i>C.jejuni</i>	$1.5 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^7$
6	2022年3月	0/10	ND(検出限界以下)		10/10	<i>C.jejuni</i>	$4.2 \times 10^6 \pm 5.9 \times 10^6$
7	2022年5月	0/10	ND(検出限界以下)		0/10	ND(検出限界以下)	
8	2022年7月	10/10	<i>C.jejuni</i>	$5.6 \times 10^6 \pm 9.7 \times 10^6$	10/10	<i>C.jejuni</i>	$7.8 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^7$
9	2022年10月	10/10	<i>C.jejuni</i>	$1.0 \times 10^7 \pm 2.3 \times 10^7$	10/10	<i>C.jejuni</i>	$4.3 \times 10^6 \pm 8.6 \times 10^6$

- ・試験鶏舎、対照鶏舎とも9鶏群中2回がすべての鶏が不検出であった。
- ・試験鶏舎では検出された鶏群では10羽中10羽が陽性、対照鶏舎では2鶏群が70%で残り5鶏群は100%であった。種々の介入を行った8, 9サイクルは両鶏舎とも陽性であった。出荷鶏の盲腸便中の *C. jejuni* の菌量は、季節に関係なくサイクルごとに異なり、また、同サイクルであっても、鶏舎間によって、1鶏舎は全羽陽性であった一方で、他の鶏舎では全羽陽性と認められた。(4, 6, 7サイクル)

表39 試験鶏舎と対照鶏舎の全体、環境試料、死鳥及び盲腸内容物の両菌の検出率

% (陽性数/検体数)				
サルモネラ		内訳		
	全体	環境試料	死鳥	出荷時 腸管内容物・ムネ肉
試験区 (1号舎)	45% (222/486)	27% (55/203)	50% (90/179)	74% (77/104)
対照区 (4号舎)	49% (222/449)	34% (60/173)	44% (77/174)	83% (85/102)

% (陽性数/検体数)				
カンピロバクター		内訳		
	全体	環境試料	死鳥	出荷時 腸管内容物・ムネ肉
試験区 (1号舎)	18% (89/486)	0.4% (1/203)	6% (11/179)	74% (77/104)
対照区 (4号舎)	19% (88/449)	1.15% (2/173)	5.1% (9/174)	75.4% (77/102)

- ・両菌とも、試験区と対照区で t 検定により有意差は認められなかった。

表40 サービスルーム内サルモネラ拭き取り検査結果

		サイクル									合計	陽性率
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
1号舎	件数	3	4	0	4	0	4	4	4	4	27	44%
	陽性数	0	2	0	4	0	2	2	1	1	12	
4号舎	件数	3	4	0	4	0	4	4	4	4	27	67%
	陽性数	1	3	0	4	0	0	2	4	4	18	

- ・ 1号鶏舎が試験鶏舎、4号鶏舎が対照鶏舎である。
- ・ サービスルームの石灰散布等の介入措置を講じたが、サービスルームのサルモネラ陽性率で1号鶏舎と4号鶏舎で有意差は認められなかった。
- ・ 1号鶏舎と4号鶏舎の陽性率の間に有意差は認められなかった。(t検定)

表 41 サルモネラ、サービスルームスワブ (6週齢以前)

	改正前		改正後		改正前	改正後
	1号(試験)	4号(対照)	1号	4号	1, 4号合計	1, 4号合計
陽性数	6	8	5	10	15	17
陰性数	5	3	11	6	12	18
合計	11	11	16	16	27	35
陽性率%	55	73	31	62.5	55%	49%

改正施行前の1号と4号鶏舎で陽性率に有意差なし 改正施行前後で有意差なし

改正施行完全実施後1号と4号で有意差なし

1号鶏舎で改正施行前後で有意差なし

改正施行後1号と4号で有意差なし

飼養衛生管理基準の改正施行前に1号鶏舎と4号鶏舎でサービスルームスワブで陽性率に有意差は認められなかった。1号鶏舎単独、1号鶏舎と4号鶏舎合計、いずれにおいても飼養衛生管理基準の改正施行前後で有意差は認められなかった。

表42 死鳥の消化管内容物検査結果

〔死鳥 盲腸内容物〕

週齢	検査数	区分	検査数	サルモネラ		カンピロバクター	
				陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
1 週齢	22	試験区 (1号舎)	9	4	44.4%	0	0.0%
		対照区 (4号舎)	13	6	46.2%	0	0.0%
2 週齢	49	試験区 (1号舎)	27	3	11.1%	0	0.0%
		対照区 (4号舎)	22	8	36.4%	0	0.0%
3 週齢	64	試験区 (1号舎)	34	16	47.1%	0	0.0%
		対照区 (4号舎)	30	10	33.3%	0	0.0%
4 週齢	69	試験区 (1号舎)	34	21	61.8%	0	0.0%
		対照区 (4号舎)	35	19	54.3%	0	0.0%
5 週齢	61	試験区 (1号舎)	30	22	73.3%	1	3.3%
		対照区 (4号舎)	31	17	54.8%	3	9.7%
6 週齢	62	試験区 (1号舎)	34	22	64.7%	10	29.4%
		対照区 (4号舎)	28	17	60.7%	6	21.4%

サルモネラは1週齢で死んだ鳥から分離率が45.5%、その後下がるが4週齢以降で再び上昇した。1週齢で死んだ鳥はすでにサルモネラに感染しており1週間以内に死亡し、その後の上昇は一部の雛が持ち込んだサルモネラが鶏舎内に拡散し、鶏への感染が拡大したことによると考えられた。

カンピロバクターは、4週齢までに死亡した鶏からは検出されず、5週齢以降で死亡した鶏からのみ検出され、週齢が大きくなるにつれて検出率は増加していた。このことから垂直感染は考えられない。

表43 死鳥のサルモネラとカンピロバクターの鶏舎別陽性率の比較

	サルモネラ		カンピロバクター	
	1号鶏舎 (試験)	4号鶏舎 (対照)	1号鶏舎 (試験)	4号鶏舎 (対照)
陽性数	88	77	11	9
検査数	168	159	168	159
陽性率%	52%	48%	6.50%	5.70%

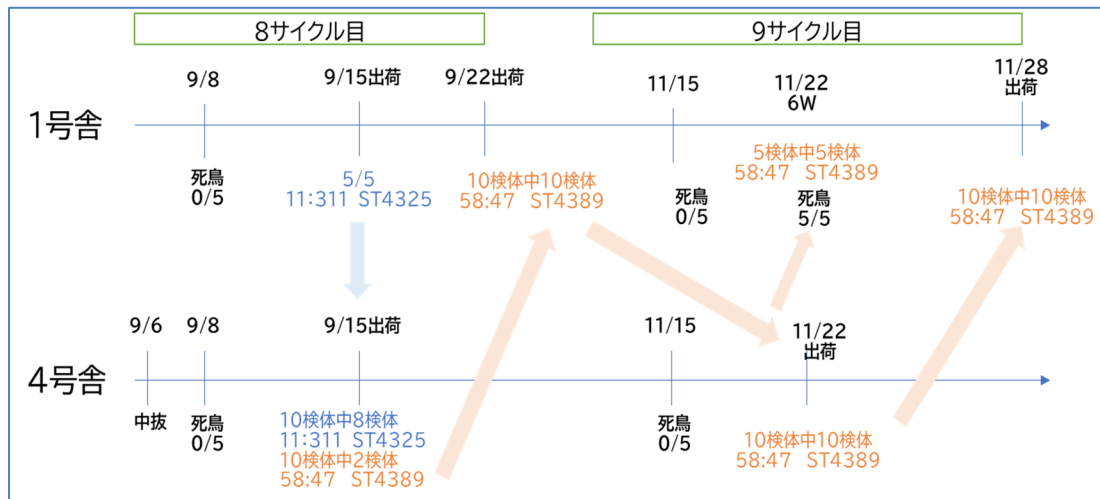
サルモネラ、カンピロバクターとも1号と4号で陽性率に有意差は認められなかった。

表44 死鳥の遺残卵黄の検査結果

週齢	検査数	区分	検査数	サルモネラ		カンピロバクター	
				陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
1 週齢	20	試験区 (1号舎)	11	2	18.2%	0	0.0%
		対照区 (4号舎)	9	0	0.0%	0	0.0%
2 週齢	6	試験区 (1号舎)	0	0	0.0%	0	0.0%
		対照区 (4号舎)	6	0	0.0%	0	0.0%

1週齢で死んだ鳥の遺残卵黄があった20検体中2検体からサルモネラが分離されたが、カンピロバクターは検出されなかった。このことから、サルモネラが垂直感染していることが濃厚になった。

図3 F養鶏 S農場 カンピロバクターST型解析結果



また、カンピロバクターのmP-Bit法及びMLST解析の結果、F養鶏S農場においては令和元年7月以降は11-311及びST4325型が検出されていたところ、令和5年9月（8サイクル目）の途中から、対照鶏舎において58-47及びST4389が検出されはじめ、11月（9サイクル目）では、両鶏舎ともに、58-47及びST4389に置換された。

小課題 2-（1）小括

農場の衛生管理状態を農場調査表（別紙2 農場調査表参照）に整理し、客観的に実態を把握することにより、農場におけるリスク因子の洗い出し及び介入措置の検討が容易となり、農場衛生管理向上への寄与が期待された。長靴及び手袋の消毒、長靴履き替え手順、サービスルーム床の石灰散布、鶏舎間共有物品の消毒、アルコール消毒等

農場調査表を用いたアプローチについて、現場関係者の方の意見を踏まえ、サービスルームの石灰散布の方法と頻度を協議して、実行可能な方法を見つけ出し、また石灰乳液のpH測定とその記録を始めた。鶏舎入り口に懸垂されていたアルコールスプレーは日光に晒され、濃度の管理も十分でなかったため、保管場所やアルコールの補充頻度を改善していただいた。

試験農場において、9サイクルにわたり段階的に介入措置を実施したが、出荷時盲腸内容物の検査結果（カンピロバクターの菌数及びサルモネラの鶏群内陽性率）において試験区・対照区の有意差は認められなかった。環境検査（サービスルーム、器材等）については、介入した結果、そこからの菌の分離はなくなったこともあったが、鶏盲腸内容物の菌の陽性率やカンピロバクターの菌数への影響は見られなかった。プロダクションスコアについては、試験区・対照区の有意差は認められなかった。

経時的な検査の実施により、F養鶏におけるサルモネラの侵入因子として、農場、鶏舎環境でのサルモネラの残存と、初生雛からの持込の2つの侵入経路が想定された。

【残存】

- 鶏舎周囲のソックスワブや、洗浄後のチップ搬入前の鶏舎内天井、導入前の鶏舎内、サービスルームからの検出されたことにより、初生雛の導入前から、サルモネラが生残していた。（表 13, 14, 27, 18）

【持込】

- ・ 初生雛からの持込（表 17）
- ・ 1 週齢で死んだ鳥の遺残卵黄から、20 検体中 2 検体検出、また雛箱内の雛マットから検出されたことから、*S. Schwarzengrund* の雛からの持込があると考えられた。（表 31、44）
- ・ 飼料から、*S. Mbandaka*、*S. Typhimurium* の検出があったが、出荷時の盲腸内容物の検査では、これらの血清型は検出されていないことから、雛から持続感染していた *S. Schwarzengrund* が汚染源として優位な状態にあったと考えられた。（表 23、31）

【伝播】

- ・ 共用物品による伝播の可能性（表 31）
- ・ 体重測定用のはかりやカードなど、鶏舎間をまたいで使用する物品を介して、鶏舎間の伝播の可能性はある。

また、F養鶏におけるカンピロバクターについては、以下の知見が得られた。

- ・ 分離株はすべて *C. Jejuni* であった。
- ・ 経時的環境検査では、1 サイクル目の 6 週鶏舎内から 1 検体検出があったが、サイクルによつては、検出されない時期、鶏舎による違いがあった。
- ・ 死鳥で、5，6 週齢から検出された場合、出荷時では陽性となることが多かったが（延べ 18 鶏群中死鳥陽性 7 鶏群中、うち 5 鶏群は出荷時盲腸内容物も陽性）、死鳥で検出されない場合でも出荷時陽性となることもあった。逆に、6 週齢の死鳥から検出されたが出荷時、腸管内容物から検出限界以下であることもあった（2 鶏群）。飼育期間中に初生雛段階から出荷まで、持続的に腸管内のカンピロバクター定着を抑えることにより、出荷時の菌量を低減させることができるものと考えられる。
- ・ 経時的環境検査で 1 から 4 週齢のいずれの検体からもカンピロバクターは検出されなかったことから、死鳥では 5 週齢から検出が報告されているため、5 週齢の時期に同菌が鶏群に侵入したのか、あるいは鶏舎内に存在したが、VBNC 状態であったのかは不明であり、引き続き調査が必要と考えられた。