

コリーザ発症鶏から分離されたHaemophilus paragallinarumの生物ならびに血清学的性状

誌名	鶏病研究会報
ISSN	0285709X
著者	内田, 幸治 高山, 公一 古谷, 徳次郎 原田, 良昭
巻/号	15巻1号
掲載ページ	p. 13-17
発行年月	1979年3月

コリーザ発症鶏から分離された *Haemophilus paragallinarum* の生物ならびに血清学的性状

Biologic and Serologic Properties of *Haemophilus paragallinarum* Isolated from Chickens Affected with Coryza

内田幸治・高山公一・古谷徳次郎・原田良昭

台糖ファイザー(株)農産技術センター: 〒419-01 静岡県田方郡函南町

Koji UCHIDA, Koichi TAKAYAMA, Tokujiro FURUYA
and Yoshiaki HARADA

Pfizer Taito Agricultural Technical Center: 1694-27 Gohonmathu, Hirai,
Kannami-cho, Tagata-gun, Shizuoka, 419-01

我が国における伝染性コリーザ (IC) の予防には、1967 年以来、加藤³⁾ の *Haemophilus paragallinarum* (Hpg) 221 株を用いたワクチンが応用されてきた。しかしながら、このワクチンが市販された当初から養鶏場によっては必ずしも期待した効果が得られず、その原因は免疫量や免疫間隔の問題とみなされていた。しかし、久米ら⁴⁾ は、1975 年から 1976 年にかけて IC ワクチン接種鶏から Hpg を分離し、これらの株が、赤血球凝集 (HA) 能を欠くこと、交叉凝集免疫が成立しないことから、Hpg 221 株とは異なった血清型に属することを認め、IC ワクチンが効果を発揮しない原因のひとつであることを示唆した。

著者は、1976 年秋から 1978 年春にかけての約 2 年間に、全国各地から本センターに送付された検体に多数のコリーザ症状を呈する病鶏を認め、検査する機会を得、起因菌の分離ならびにその性状を検討したので、その概要を報告する。

材料と方法

1. 供試鶏

全国各地の 25 農場より当センターに送付され

昭和 53 年 11 月 24 日受付

た 26 鶏群、137 羽の採卵鶏 (1976 年秋から 1977 年春にかけて 15 鶏群、94 羽、1977 年秋から 1978 年春にかけて 11 鶏群、43 羽) を用いた。供試鶏は、いずれも初発後 1 週間以内のもので、いずれも鼻汁流出ならびに顔面腫脹を主徴とする典型的な伝染性コリーザ症状を呈していた。

2. ヘモフィルスの分離

ヘモフィルスの分離は、鼻腔および眼窩下洞の滅菌綿棒拭い液から試みた。分離用培地としては、マイコプラズマプロスペース (Pfizer) に馬血液を 5%、還元型ニコチンアミドアデニンデスクレオタイド (NADH, オリエンタル酵母) を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、非働化鶏血清 (56°C, 30 分) を 5%、ならびにバクトアガー (Difco) を 1.5% に加えた固型培地を用いた。5% CO₂ 加孵卵器で 37°C, 24 時間培養後 Smooth な単一集落を選び、5% 馬血液加ブレインハート・インフュージョン寒天培地 (栄研) で、*Staphylococcus epidermidis* を用い衛星現象の認められた菌株について各種の性状検査を実施した。なお、対照菌株として、加藤ら³⁾ の分離した Hpg 221 株 (卵黄 3 代、固形培地 1 代継代) を用いた。

3. 性状検査

<形態>ヘモフィルスを疑う集落については、グラム染色を行ない、MÖLLERの方法⁹⁾で莢膜の有無を検査した。

<生化学的性状>カタラーゼの産生は、のせガラス上で3%過酸化水素と被検菌の1白金耳量を混じ、酸素の発生の有無を検査した。インドール、硫化水素の産生は、0.5%寒天加ブレインハート・インフュージョン半流動培地(栄研)で、硝酸塩還元は同じくブレインハート・インフュージョン半流動培地に硝酸カリウムを加えた培地で、37°C、48時間培養後、それぞれの試薬を加え検査した。

<栄養要求性>トリプトソイ寒天(栄研)に、V因子としてはNADHを5µg/ml、X因子としてはヘミン(和光)を50µg/ml、鶏血清としては非働化(56°C、30分)したものを1%に加えた培地にリン酸緩衝生理食塩液(PBS, pH7.0)に浮遊させた被検菌液を塗抹し、5%CO₂下で37°C、48時間培養後、判定した。

<赤血球凝集(HA)能>加藤ら⁹⁾の方法を参考にして、鶏、牛、馬、羊およびモルモットの赤血球に対するHA能の有無を調べた。

<血清反応>平板凝集反応を用いた。Hpg 221株に対する抗血清には、10週令のSPFヒナに、6時間振とう培養した菌を接種し4週後の血清(凝集価40倍)を用いた。分離菌の抗原はCO₂存在下でNADHを5µg/mlおよび鶏血清を5%に加えたブレインハート・インフュージョンブイヨン(栄研)に24あるいは48時間静置培養後、遠心して1/20容量に濃縮した菌液である。この抗原と5倍稀釈抗Hpg 221血清とを混合して1分以内に凝集が現われた場合、被凝集性陽性とみなした。

<病原性>病原性の検査には、H & N伊豆農場のSPF種鶏から生産されたヒナを使用した。

7週齢ヒナの両鼻腔内にそれぞれ供試菌液の0.1ml(約10⁸個/羽)を接種し、鼻汁流出および顔面の腫脹を10日間観察して判定した。

成 績

1. ヘモフィルスの分離

表1に1976年秋から1977年春にかけての成績

を示す。青森Aおよび宮崎Aの2群を除きICワクチンを1ないし4回接種済で、剖検例の赤血球凝集抑制抗体(HI)価の幾何平均値は15鶏群中8群が10倍以上であった。そして各群のヒナの発症率(鼻汁流出ならびに顔面腫脹を呈するヒナの割合)は4%から80%まで様々であった。ヘモフィルスは、剖検した94羽中82羽(87.2%)の鼻腔または眼窩下洞から分離された。

表2は1977年秋から1978年春にかけての成績を示す。群馬AAの鶏群は表1に示す群馬Aの鶏群と同じ農場由来である。ICワクチンは、群馬AA、静岡および福岡を除く各群で2回接種済であった。それにもかかわらず抗体は、幾何平均値で10倍以上を呈する群はなかった。各群のヒナの発症率は、前年度と同様に5ないし65%で様々であった。ヘモフィルスは、剖検した43羽中35羽(81.4%)の鼻腔または眼窩下洞から分離された。

2. ヘモフィルスの性状

表3は117羽のヒナから分離した合計117株のヘモフィルスの性状を示す。全株とも莢膜を有し、カタラーゼ、インドールおよび硫化水素を産生せず、硝酸塩を還元した。また、すべての株はその発育にV因子(NADH)と鶏血清を要求し、X因子(ヘミン)を要求しなかった。これらの性状から分離菌株は*Haemophilus paragallinarum*と同定された。

全株は、7週齢ヒナの鼻腔内接種で鼻汁流出および顔面腫脹を主徴とするコリーザ症状を起こさせ、いずれも病原性を有することが確認された。

HA能では、青森A、青森B、青森C、岩手および群馬AAの5群由来の全分離株計42株は、鶏、牛、馬、羊およびモルモットの各血球に対していずれもHA能を有したのに対し、他の21群由来の75株はいずれの血球に対してもHA能を欠き、分離株はHA能で2分された。

年度別で比較してみると、1976~1977年におけるHA陽性株の分離率は15群中2群の13.3%、1977~1978年におけるHA陽性株の分離率は11群中3群の27.2%であった。なお、群馬A群では陰性株が、群馬AA群では陽性株が分離された。これらは実際には同一農場で飼育されていた

表1. ヘモフィルス の 分離 (1976年秋~1977年春)

鶏群 ¹⁾	一群の羽数	日齢	IC ²⁾ ワクチン接種回数 (接種日齢)	初発から剖検までの日数	剖検時の ³⁾ 発症率 (%)	剖検羽数	剖検例の IC・HI ⁴⁾ 抗体価幾何平均	ヘモフィルス分離羽数 (株数)
北海道 胆振	9,300	252	2 (45, 125)	3	20	7	≦2.5	4
〃 後志	5,700	386	2 (45, 125)	7	30	6	17.8	1
〃 空地	7,000	189	2 (45, 127)	7	10	3	10.0	3
〃 十勝	13,000	96	1 (35)	7	80	10	4.1	10
青森 A	17,000	168	0	2	80	23	≦2.5	23
岩手	10,000	147	2 (70, 140)	1	5	10	3.3	10
宮城 A	15,000	242	4 (50, 80, 120, 167)	3	4	5	40.0	4
〃 B	8,000	481	2 (45, 95)	3	50	3	12.6	3
群馬 A	3,500	335	2 (48, 95)	7	35	3	≦2.5	3
岐阜 A	16,000	235	3 (35, 100, 130)	3	15	4	16.8	4
〃 B	10,000	270	3 (61, 110, 162)	7	60	4	20.0	4
香川	8,000	225	1 (35)	5	30	3	≦2.5	3
宮崎 A	11,000	125	0	7	10	3	≦2.5	3
鹿児島 A	3,200	151	2 (40, 90)	5	80	7	15.2	4
〃 B	2,500	255	1 (215)	7	65	3	15.9	3
計						94		82

1) 由来農場はすべて異なる, 北海道のみ所在支庁を示す

2) 伝染性コリネバ

3) 鼻汁流出および顔面腫脹

4) 赤血球凝集抑制

表2. ヘモフィルス の 分離 (1977年秋~1978年春)

鶏群 ¹⁾	一群の羽数	日齢	IC ²⁾ ワクチン接種回数 (接種日齢)	初発から剖検までの日数	剖検時の ³⁾ 発症率 (%)	剖検羽数	剖検例の IC・HI ⁴⁾ 抗体価幾何平均	ヘモフィルス分離羽数 (株数)
北海道 石狩	5,000	168	2 (75, 115)	3	20	3	3.2	3
青森 B	9,800	365	2 (50, 105)	6	65	4	≦2.5	4
〃 C	19,800	532	2 (50, 120)	7	15	2	≦2.5	2
群馬 A A	2,400	266	0	3	20	3	4.0	3
〃 B	6,200	216	2 (50, 107)	3	50	2	≦2.5	2
茨城	4,000	140	2 (42, 95)	7	50	4	≦2.5	3
千葉	8,000	270	2 (45, 100)	7	20	5	≦2.5	3
神奈川	4,500	170	2 (不明)	7	20	5	7.6	4
静岡	6,500	220	0	3	5	5	≦2.5	3
福岡	1,800	53	0	7	5	5	≦2.5	4
宮崎 B	25,000	69	2 (35, 65)	7	10	5	≦2.5	4
計						43		35

1) 群馬A Aは表1の群馬Aと同一農場, その他はすべて異なる農場由来, 北海道のみ所在支庁を示す

2) 伝染性コリネバ

3) 鼻汁流出および顔面腫脹

4) 赤血球凝集抑制

表 3. 分離株の性状

分離時期	鶏群	株数	莢膜	カタラーゼ	インドール	硫化水素	硝酸塩還元	栄養要求性			病 ⁴⁾ 原性	赤凝 ⁵⁾ 血集球能	221株免疫鶏 ⁶⁾ 血清凝集対性
								NADH ¹⁾	ヘミン ²⁾	鶏血清 ³⁾			
1976 (秋) 1977 年 (春)	北海道 胆振	4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	〃 後志	1	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	〃 空地	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	〃 十勝	10	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	青森 A	23	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	岩手	10	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	宮城 A	4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	〃 B	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	群馬 A	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	岐阜 A	4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	〃 B	4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	香川	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	宮崎 A	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	鹿児島 A	4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	〃 B	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
15鶏群		82											
1977 (秋) 1978 年 (春)	北海道 石狩	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	青森 B	4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	〃 C	2	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	群馬 AA	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	〃 B	2	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	茨城	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	千葉	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	神奈川	4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	静岡	3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	福岡	4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	宮崎 B	4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
11鶏群		35											
Hpg 221 株		1	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+

- 1) 5 µg/ml
- 2) 50 µg/ml
- 3) 1%
- 4) 7週齢ピナ
- 5) 鶏, 牛, 馬, 羊およびモルモット血球
- 6) 平板法による, 1分以内の被凝集性

ものであるから, 同一農場で年次を異にして異なった Hpg の流行があり, 前者は IC ワクチン注射済, 後者は未注射群であったことは注目される。

地域別で比較してみると, 検査した範囲では HA 陽性株は東北地方の北部及び北関東の農場から分離されたのに対し, HA 陰性株はほぼ全国的

な地区から分離された。

分離株の血清学的性状を Hpg 221 株鶏免疫血清を用い, 平板凝集反応で調べた。HA 陽性の全 42 株は抗 Hpg 221 血清に対し被凝集を示したのに対し, HA 陰性の 75 株はすべて陰性で, HA で 2 分された株は, 血清学的性状も異にした。なお, 陰性株の一部 (各鶏群分離株の中から 1 株づ

つ、計21株)の同定を北里研究所に依頼した結果、H-18株と同一血清型であることを認めた。

考 察

今回分離したヘモフィルス菌株はすべて対照に用いた Hpg の代表株である 221 株と同一の生化学的性状を示したことから、検査したコリーザ疾患は伝染性コリーザと考えられる。

これら分離菌株は HA 能から陽性・陰性の 2 群に分けられた。前者は凝集反応の成績から 221 株と同定された。後者は各鶏群分離株の 1 株づつが、久米ら⁴⁾の分離した H-18 株と同定されたので、すべてこの範疇に入れられるものと思われる。

HA 陰性株は北海道を始め、東北、関東、東海、四国、九州などにある農場由来鶏群から分離されていることからみて、ほぼ全国的に分布していると考えられる。また宮崎 A、福岡、静岡の鶏群にみられたように、現行 IC ワクチン未接種にもかかわらず、HA 陰性株による発生があったことは、少なくともこれらの農場では HA 陰性株が優勢を占めていることを示唆している。これらの農場の所在する地域における状況を明らかにすることは防疫上必要であろう。

今回検査した範囲では HA 陽性株は青森、岩手、群馬のごく限られた地域の鶏群からのみ分離された。過去における HA 陽性菌の日本における分布を示す資料はないが、このように検出率の低かったのは、おそらく IC ワクチンの応用によるものと思われる。同一農場で、ワクチン接種群(群馬 A)では HA 陰性菌の感染が、ワクチン未接種群(群馬 AA)では HA 陽性菌の感染がみられたことは、この可能性を示唆している。

久米ら⁴⁾がすでに指摘しているように現行ワクチンは HA 陰性菌の予防にあまり効果がないことは、今回の例(岐阜 B、鹿児島 A、B)でも認められ、早急にこれに対するワクチンの開発が望

まれる。

ま と め

1976 年から 1978 年にかけてコリーザ発症鶏から起因菌の分離を試み分離菌の性状を検査した結果、次の成績を得た。

1. 伝染性コリーザ発症鶏 137 羽(25 農場 26 鶏群由来)中、117 羽からヘモフィルス 117 株が分離され、そのすべてが *H. paragallinarum*(Hpg)と同定された。

2. 分離株は、HA 能により 2 分され、HA 陽性株(5 群由来 42 株)は凝集反応で加藤の Hpg 221 株と同じ血清型に属することが確認された。一方、HA 陰性株(21 群由来 75 株)は血清学的に久米らの H-18 株と同定された。

3. HA 陰性株は全国的に分布していることが示唆された。

終りに臨み、HA 陰性株の一部について血清学的な同定をしてくださった北里研究所の中瀬安清博士に感謝の意を表します。

本論文の一部は 1977 年、秋、宮崎における第 84 回日本獣医学会で発表した。

引 用 文 献

- 1) 加藤和好, 椿原彦吉: 鶏の伝染性コリーザ II, 分離菌の同定, 家畜試研究報告 45: 21~26 (1962)
- 2) 加藤和好, 椿原彦吉, 大熊俊一: 鶏の伝染性コリーザ VI, *Haemophilus gallinarum* の赤血球凝集性, 日獣誌 27 (学会号), 457 (1965)
- 3) 加藤和好: 鶏の伝染性コリーザ IX, 鶏肉ブイヨン培養菌から調製したマーズニン死菌ワクチンの感染防御効果, 日獣誌 29 (学会号), 165 (1967)
- 4) 久米勝巳, 澤田 章, 中瀬安清: 鶏のヘモフィルス感染症に関する研究 I, 伝染性コリーザ発症鶏から分離されたヘモフィルス・パラガリナラムの性状, 日獣誌 40, 65~73 (1978)
- 5) 医科学研究所学会編: MÖLLER の法, 芽胞染色法, 細菌学実習提要改訂 5 版 125, 丸善, 東京 (1976)