

## 種卵の加温処理によるMycoplasma gallisepticumの不活化

誌名	鶏病研究会報
ISSN	0285709X
著者	加藤, 和好 村山, 仁一 笛木, 稔
巻/号	16巻3号
掲載ページ	p. 125-128
発行年月	1980年8月

# 種卵の加温処理による *Mycoplasma gallisepticum* の不活化

## Inactivation of *Mycoplasma gallisepticum* by Heat Treatment of Hatching Eggs

加藤 和好・村山 仁一\*・笛木 稔\*

(家畜衛生試験場北陸支場, 新潟県柏崎市 現在: 動物医薬品検査所, 東京都分寺市, 及び \*新潟県養鶏試験場, 西蒲原郡巻町)

Kazuyoshi KATO, Jinichi MURAYAMA\* and Minoru FUEKI\*

Hokuriku Branch Laboratory, National Institute of Animal Health, Kashiwazaki, Niigata 945 (Present address: National Veterinary Assay Laboratory, Kokubunji, Tokyo 185) and \*Niigata Prefectural Poultry Experiment Station, Maki-machi, Nishikambara-gun, Niigata 953

われわれは、さきに *Mycoplasma synoviae* (M. s) を卵黄囊内に接種した種卵を用い、YODER<sup>3)</sup>の方法に準じて加温処理を行ない、卵黄囊内の M. s が完全に不活化されること、及びこの方法は M. s フリー鶏群の作出に極めて有効な方法であることを確認した<sup>2)</sup>。しかし、その際同時に行なった *Mycoplasma gallisepticum* (M. g) 接種卵については、加温処理後もなお高率に M. g が検出され、YODER<sup>3)</sup>の報告とやや異なる成績であった。そこで卵黄囊内への M. g 接種菌量を変えて不活化の有無を再検討すると共に、M. g と M. s の熱抵抗性についても比較検討を行なった。

### 材料と方法

供試卵: 新潟県養鶏試験場の M. g 及び M. s フリー白色レグホーン種の種卵を用いた。

供試菌株: M. g の不活化試験には 1RF 及び 1357 株を、熱抵抗性試験には、M. g は 1RF, 1357, 1362, 1671, 1424, 2241 の計 6 株を、M. s は WVU 1853, 1-3SN, 174, 3883 及び 138 の計 5 株を供試した。

種卵への菌接種: 種卵への菌接種は、加温処理の前日午後に行なった。菌接種卵は一夜室温に放置し、翌日早朝より加温処理を行なった。

加温処理は既報<sup>2)</sup>の通りで、室温より出発して 13 時間 45 分かけて 46.3°C (孵卵機内温度) まで加温し、その後孵卵器を開放して温度を下げ、卵内温度が 37.6°C に達したところで通常の孵卵に切り換え、10~11 日齢まで孵卵を行なった。この間 5 日、7 日及び 9 日目に検卵し、死亡卵は 5°C に保存して M. g の培養に供した。なお無精卵は 5 日目の検卵時に除去し、M. g の培養は行なわなかった。

M. g の培養と同定: 死亡卵及び 10~11 日齢殺卵の卵黄 0.1 ml を、鶏肉汁培地 (改良 Hofstad の培地)<sup>1)</sup>に接種して 37°C で 5 日間培養を行なった。この間に培地の色が黄変したものは直ちに寒天培地<sup>1)</sup>に移植し、コロニー形態観察と鶏赤血球の吸着性を調べた。なお 5 日以内に培地の色が黄変しないものについては、3 代まで盲継代を行なって判定した。

熱抵抗性試験: あらかじめ 45°C に加温された 50% 卵黄食塩液 18 ml 中に、液体培地 48~72 時間培養菌 2 ml を加え、混合直後及び 1 時間置きに汲み取った卵黄液を 10 進法で希釈し、各希釈液を 2 本の液体培地に 0.1 ml ずつ接種、37°C に 7 日間培養して菌の発育を調べた。

1980 年 3 月 7 日受付

結 果

1. 大量菌接種卵の加温処理成績

種卵 200 個を用い、うち 100 個には 1RF 株を  $10^6$ /egg、残り 100 個には 1357 株を  $10^6$ /egg 接種した。各群半数を加温処理、残り半数を対照卵とし、通常の孵卵器で孵卵を行なった。

この試験における *M. g.* の培養結果は、表 1 及

表 1. 大量菌接種卵における *M. gallisepticum* 培養結果 (その 1)

群	10日齢以内 死亡卵	11日齢殺卵	合計 (%)
加温卵	20/50*	0	20/50 (40.0)
対照卵	45/45	0/1	45/46 (97.8)

接種菌株及び量: 1 RF 株,  $10^6$ /egg

\* 分子: *M. gallisepticum* 陽性個数

分母: 検査個数

表 2. 大量菌接種卵における *M. gallisepticum* 培養結果 (その 2)

群	9日齢以内 死亡卵	10日齢殺卵	合計 (%)
加温卵	24/33*	12/17	36/50 (72.0)
対照卵	48/48	2/2	50/50 (100)

接種菌株及び量: 1357 株,  $10^6$ /egg

\* 分子: *M. gallisepticum* 陽性個数

分母: 検査個数

び表 2 に示したとおりで、加温処理卵からの *M. g.* 検出率は、対照卵のそれより低かったが、それでも 40 及び 72% の高率に検出された。

2. 各種菌量接種卵における加温処理成績

種卵への菌の接種量を変えて加温処理の影響を調べた。すなわち、240 個の種卵を 60 個ずつ A, B, C 及び D の 4 群に分け、A 群には 1RF 株を  $10^7$ /egg、B 群には  $10^6$ /egg、C 群には  $10^3$ /egg 及び D 群には  $10^1$ /egg を接種、各群半数を加温処理、半数を対照卵とした。

*M. g.* の培養結果は、表 3 に示したとおりで、 $10^7$ /egg 接種群は、前 2 回の試験と同様、加温処理群でも 50% 以上の卵から *M. g.* が検出された。 $10^6$ /egg 接種群では、対照卵からは 100% 検出されたのに対し、加温処理卵からの検出率は 10% で、明らかに加温処理による検出率の低下が認められた。 $10^3$ /egg 接種群の加温処理卵からの *M. g.* 検出率はさらに低下し、 $10^1$ /egg 接種群では、

表 4. 小量菌接種卵における *M. gallisepticum* 培養結果

群	9日齢以内 死亡卵	10日齢殺卵	合計 (%)
加温卵	0/34*	0/65	0/99 (0)
対照卵	15/24	23/24	38/48 (79.2)

接種菌株及び量: 1 RF 株,  $1.8 \times 10^3$ /egg

\* 分子: *M. gallisepticum* 陽性個数

分母: 検査個数

表 3. 各種菌量接種卵における *M. gallisepticum* 培養結果

群	接種菌量/egg	加 温 卵			対 照 卵		
		9日齢以内 死亡卵	10日齢殺卵	合計 (%)	9日齢以内 死亡率	10日齢殺卵	合計 (%)
A	$10^7$	4/10*	12/20	16/30 (53.3)	9/9	20/20	29/29 (100)
B	$10^6$	2/16	1/14	3/30 (10.0)	6/6	22/22	28/28 (100)
C	$10^3$	1/8	0/18	1/26 (3.8)	4/5	22/23	26/28 (92.9)
D	$10^1$	0/13	0/16	0/29 (0)	3/11	9/15	12/26 (46.2)

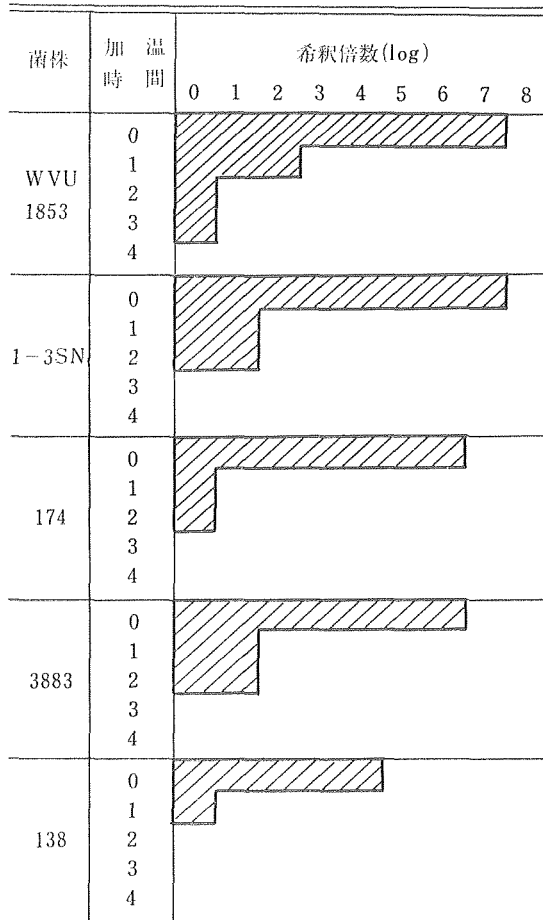
接種菌: 1 RF 株

\* 分子: *M. gallisepticum* 陽性個数

分母: 検査個数

図 1. *M. synoviae* の熱抵抗性

45°C加温



対照卵の約半数から *M. g* が検出されたのに対し、加温処理卵からは全く検出されなかった。

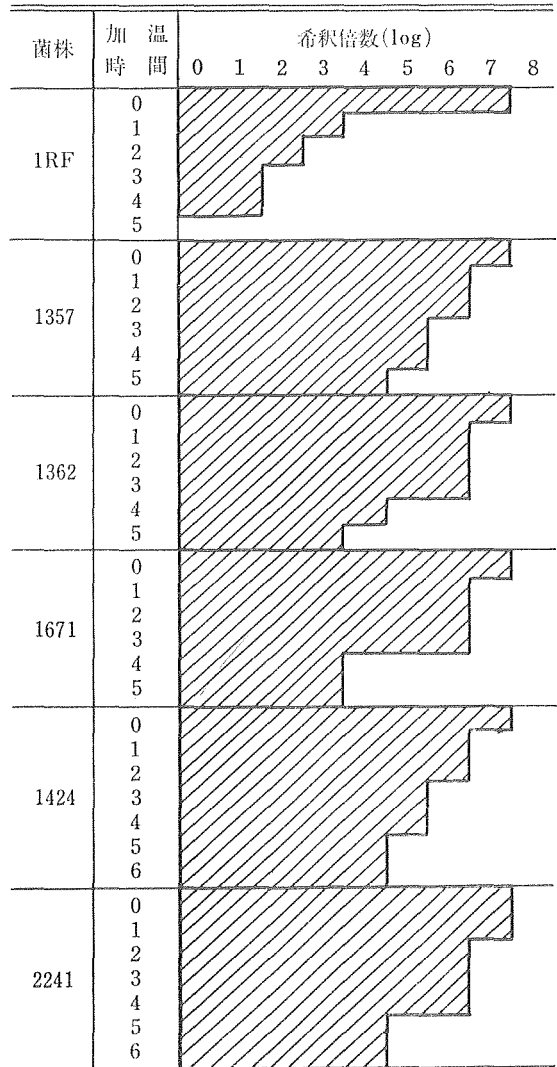
そこで加温処理群 100 個、対照群 50 個の種卵を供試し、少量菌接種における加温処理の効果を確認するための再試験を行なった。その結果は表 4 に示したとおりで、対照卵は 48 個中 38 個 (79.2%) から *M. g* が検出されたが、加温処理卵からは全く検出されなかった。

### 3. *M. s* 及び *M. g* の熱抵抗性

本実験の成績を図 1 及び図 2 に示した。すなわち、*M. s* は 5 株のうち 138 株は出発材料の菌数が少なく、45°C加温 2 時間で不活化された。他の 4 株については、混合直後 (加温前) には  $10^{-6}$ ~ $10^{-7}$  希釈まで菌の発育が認められたが、3~4 時

図 2. *M. gallisepticum* の熱抵抗性

45°C加温



間加温したものでは全く菌の発育が認められず *M. s* は完全に不活化された。

一方、*M. g* の場合は、加温前には 6 株とも  $10^{-7}$  希釈まで菌の発育が認められ、以後加温時間の経過に伴って菌数は徐々に減少した。しかし減少の程度は *M. s* に比べて著しく低く、1RF 株以外は 5~6 時間加温後でもなお  $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$  希釈まで菌の発育が認められた。

### 考察並びに総括

YODER<sup>3)</sup> は種卵を室温から 12~14 時間かけて

114~114.5°F (45.6~45.8°C) に加温することにより、卵内の M. g 及び M. s を完全に不活化できることを報告したが、その中で M. g の不活化には M. g よりわずかに高い温度をかけることが必要だと述べている。しかし、われわれの実験では、M. s が完全に不活化される条件下で M. g はなお生存し、YODER<sup>9)</sup>の成績と異なる結果であった。そこで種卵への M. g の接種菌量を変えて加温処理の効果を検討した結果、種卵中の菌量が少ない場合には M. s と同様の加温処理条件下で M. g も完全に不活化されることが明らかにされた。

M. g 及び M. s を 50%卵黄食塩液に浮遊させ、45°Cにおける熱抵抗性を比較した結果、明らかに M. s より M. g のほうが熱抵抗性が強いことが認められ、M. s が完全に不活化される条件下で M. g がなお生存した原因は、両菌の熱抵抗性の相異にあったものと考えられる。このことから、不活化のために M. g より M. s のほうがより高い温度を

必要としたという YODER<sup>9)</sup>の報告は、両菌の熱抵抗性の相異よりもむしろ種卵内に含まれる菌量が原因したのではないと思われる。

M. g 感染種鶏から生産された保菌卵中には  $10^9$  を越えるような大量の M. g が含まれる可能性はまずなかろうと思われることから、今回の実験によって、種卵の加温処理は、M. s 同様 M. g においてもフリー鶏群の作出に極めて有効な方法と考える。

終りに本研究の実施に当って種々御配慮をいただいた新潟県農業大学校岩佐昇科長(前新潟県養鶏試験場養鶏技術課長)に謝意を表す。

#### 引用文献

- 1) 国安主税: CRD. 鶏病図説. 187-211, 堀内貞治他編, 日本畜産振興会, 東京 (1969)
- 2) 村山仁一ら: 種卵の加温処理による *Mycoplasma synoviae* の浄化. 畜産の研究, 30, 429-430 (1976)
- 3) YODER, H. W., Jr.: Preincubation heat treatment of chicken hatching eggs to inactivate *Mycoplasma*. *Avian Dis.* 14, 75-86 (1970)