

病原微生物汚染鶏舎の消毒法(1)

誌名	愛知県農業総合試験場研究報告 = Research bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center
ISSN	03887995
著者	番場, 久雄 田和, 均 水野, 真樹 三輪, 寿男
巻/号	19号
掲載ページ	p. 485-489
発行年月	1987年10月

病原微生物汚染鶏舎の消毒法 (第1報)

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス、及びアイメリア・

テネラに対する効果

番場久雄*・田和 均*・水野真樹*・三輪寿男*

緒 言

養鶏経営は大型化、集約化が進み、大規模飼育に伴う飼養環境の悪化や各種病原体の常在化による伝染性疾病の多発が生産性低下の一因となっている。

急性伝染病に対するワクチンの開発により、被害は減少しているが、反面、慢性伝染病は多発の傾向にあり、かつ複合化している。従って、鶏病対策としての養鶏施設の消毒は、病原微生物の鶏への感染環を断つ方法として重要性を増してきている。消毒剤の効果判定には実験室内での石炭酸係数法⁽⁴⁾が長い間用いられていたが、最近鶏舎の付着一般細菌を効果判定の指標とするいくつかの報告^(1, 9, 10, 11)がなされ、より有効的な消毒方法に改善されて来ている。しかし、最も実用的である消毒効果の判定に病原微生物を対象にした消毒の報告はほとんど無い。

そこで、消毒薬に比較的抵抗性の強い病原微生物である伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスと *Eimeria tenella* の感染鶏で汚染させた鶏舎を使用して、病原微生物汚染に対する水洗、消毒効果について若干の知見を得たので報告する。

なお、本試験の実施に当たりご指導を賜った日本生物科学研究所大永博資博士に感謝の意を表する。

材料及び方法

1 試験方法

供試鶏はコクシジウム原虫、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) フリーである特定病原不在 (SPF) 鶏を用いた。

飼料は當場慣用飼料 (幼すう用: CP 20%, ME 2,800 Kcal/kg、育成用: CP 15%, ME 2,700 Kcal/kg) の抗菌剤無添加のものを用い、自由摂取とし、飲水は流

下式で不断給水とした。飼育方法は4週齢までは立体電熱育すう器、4週齢からは中すうケージで飼育し、試験開始時点で平飼飼育とした。

汚染鶏舎は床面積 25.0 m²、内壁面積 137.0 m² でコンクリート壁で2室に隔離された平飼無窓鶏舎を使用し、各室の一部を金網で6 m²の広さに仕切り15羽の鶏を飼育した。

(1) 試験1

Eimeria tenella (ET) の汚染鶏舎に対する消毒薬の効果进行调查した。

供試薬剤は市販のオルソ剤で成分は、オルソジクロベンゼン 70%、メタクレゾール 10%、ドデシルベンゼンスルホン酸塩 15%、メタノール 5% を含有し、使用濃度は 200 倍液とした。6 週齢のひな 30 羽に ET の強毒株 N I A H・P D L 株の成熟オーシストを 1 羽当たり 50,000 個経口接種し、隔離された 2 室に 15 羽ずつ、3 週間飼育した。鶏舎の汚染については、毎週、排出糞のオーシスト数 (OPG) 検査と、血清中の E T - E L I S A 抗体検査により ET 汚染の状況を確認した。

3 週間飼育後に感染鶏をオールアウトし、室内を清掃後、3 ℓ/m² 量の水水道で水洗した。試験区分は 2 区分とし、1 区は水洗 1 日後にオルソ剤の 200 倍液を 1 ℓ/m² 量で消毒し 6 日間放置乾燥した。2 区は水洗後無消毒とし、10 週齢の S P F ひなを 15 羽ずつ同時に両鶏舎に入れ 4 週間飼育した。

試験期間は 1986 年 5 月 29 日～1986 年 9 月 4 日である。

(2) 試験2

IBDV の汚染鶏舎に対する消毒薬の効果进行调查した。

鶏舎は試験1と同じ無窓鶏舎2室を使用した。供試薬剤は市販のヨード剤で、成分はヨウ素 2% (有効ヨウ素 1.75%)、ノニールフェノキシポリエタノール 11%、リン酸 10%、精製水 77% を含有し、使用濃度は 200 倍

とした。10週齢のひな30羽にIBDV強毒株GBF-1株 $10^{5.5}$ EID₅₀/0.05mlを経口接種し、各室15羽ずつ3週間飼育し、感染鶏をオールアウトした。鶏舎のIBDVの汚染については、接種後の臨床観察と、オールアウト時に採取した血清でIBDVの中和抗体(NT)検査を行うことにより確認した。

オールアウト後は、試験1と同様に水洗し、試験区分は2区分とした。1区は水洗1日後にヨード剤を1ℓ/m²量で消毒、2区は無消毒とした。6日間放置乾燥後10週齢のSPF鶏を各室15羽ずつ、計30羽を入れ、4週間飼育した。

試験期間は1986年9月18日～1987年1月23日である。

2 調査項目と方法

付着細菌数の測定は、水洗、消毒前後の鶏舎の床面、壁面の10cmからハートインフィジョン(HI)ブイオン液を浸したスタンプスプレッドで付着菌を採取し10mlのHIブイオン液に浸漬、振盪後、採取菌を浮遊させた。その浮遊液を10倍段階に希釈して、それぞれの検体について0.005mlをHI寒天培地に滴下して、37℃24時間培養し、増殖したコロニー数から1cm当たりの細菌数を算出した。

(1) 試験1

ETのELISA抗体は、導入0,1,2,3,4週間後に採取した血清で調査した。方法はETの成熟オーシストを抗原としてマイクロプレートの各穴に吸着させてから希釈した血清をその上に滴下し反応させた後、ペルオキシダーゼを結合させた抗ニワトリアグロブリン特異的モノクローナル抗体を添加し、発色剤を加えて405nmの波長で吸光度(OD値)を測定した。

臨床症状の観察は毎日行い、剖検は導入0,1,2,3,4週間後に各区2羽ずつ実施し、盲腸を重点的に調査した。原虫検査はメロゾイトの検出と盲腸内容物中のOPG検査を実施した。

鶏舎の水洗、消毒後のETオーシストの回収検査は、生理食塩水に浸漬したガーゼで、床面の100cmを拭き取り生理食塩水に浮遊させ、遠沈後鏡検しオーシストの検査を行った。

(2) 試験2

IBD-NT価は導入0,1,2,3,4週間後に採取した血清について調査した。方法は鶏胎児線維芽細胞の24時間培養細胞を用い、鶏胚噴化IBDVのPV-1株を1Well当たり200TCID₅₀/0.05mlに調整して、マイクロタイタープレート法で行い、GM値で示した。

臨床症状の観察は導入後毎日行った。剖検は導入4週間後に全羽数実施し、ファブリキウス嚢を重点的に調査した。

鶏舎の水洗、消毒後のIBDVの回収検査は、イーグル液で浸漬した滅菌ガーゼで、床面の100cmを拭き取りイーグル液に浮遊させた後、0.45μフィルタでろ過し、6日齢のIBDVフリーの発育鶏卵に接種、3代継代培養し判定した。

結果及び考察

1 試験1

(1) 付着菌数の推移

オルソ剤消毒による付着菌数の推移は、表1に示した。

第1表 鶏舎の付着菌数の推移(試験1)

区分	位置	水洗前	水洗1日後	消毒1日後
1	側壁	10 ^{2.0} ±0.1(注1)	10 ^{2.0} ±0.3	10 ^{1.2} ±0.1
	床面	10 ^{7.7} ±0.1	10 ^{5.8} ±0.3	10 ^{3.2} ±0.2
2	側壁	10 ^{2.4} ±0.1	10 ^{1.5} ±0.2	- (注2)
	床面	10 ^{7.9} ±0.1	10 ^{4.5} ±0.3	-

注1) 1cm当たりの菌数、平均値±標準偏差
注2) -: 無消毒

水洗前の菌数は1,2区とも側壁で10²程度、床面で10⁷であったが、水洗により10⁻³減少し、消毒により10⁻¹の減少を示した。これらの成績は牧野ら⁽¹¹⁾、鈴木ら⁽¹⁶⁾の成績とほぼ一致した。

(2) 臨床症状・剖検成績

臨床症状では、1区には変化が認められず、2区では導入2週間後から元氣消失、食欲減退がみられ、血便も認められた。症状は3週間後が最も重く、4週間後には回復した。

剖検所見及び原虫検査は表2に示した。

第2表 剖検所見及び原虫検査状況(試験1)

(盲腸)

区分	検査項目	導入後経過週				
		0	1	2	3	4
1	点状出血	-	-	-	-	-
	腸壁の肥厚	-	-	-	-	-
	メロゾイト	-	-	-	-	-
	オーシスト	-	-	-	-	-
2	点状出血(注1)	-	-	+	+	-
	腸壁の肥厚(注2)	-	-	+	+	+
	メロゾイト(注3)	-	-	+	-	-
	オーシスト(注4)	-	-	-	卅	卅

注1) +: 出血有 - : 正常
注2) +: 肥厚有 - : 正常
注3) +: メロゾイト陽性 - : 陰性
注4) -: OPG 1万以下
+: 10万～100万個
卅: 100万～1000万個

1週間後までは両区とも変化を認めなかったが、2週間後には、2区で盲腸粘膜に点状出血がみられ、内容物は血液で充満し、鏡検すると多数のメロゾイトが認められた。盲腸壁は肥厚し、3、4週間後さらに厚くなり、なかには逆に萎縮するものや、盲腸内にチーズ様物がみられるものもあった。オーシストは3週間後に検出され、OPG値で200万個を越すものもみられ、4週間後には30万個程度に減少したが1区では、全期間、変化は認められなかった。

(3) ET-ELISA抗体

ELISAによるOD値は、表3に示した。

第3表 ET-ELISA抗体の推移（試験1）
 (OD値)

区分	導入後経過週				
	0	1	2	3	4
1	0.332	0.423	0.501	0.454	0.421
2	0.393	0.519	0.992	1.811	1.442

注 ET: *Eimeria Tenella*

1区では導入期間中0.5以上を示さなかったが、2区では、導入2週間後に0.992、3週間後では1.811と最高値を示し、個体別では2.0以上を示すものがみられた。4週間後には1.442と低下の傾向を示した。大永⁽⁹⁾によるとETを経口感染させた鶏では2週間後にはOD値は上昇し、陽性限界は0.5以上と報告している。このことから今回の試験では無消毒の2区で、経口接種に比べて感染量が少なく、1週間程度、症状が遅れて発現したが、1区では発症がみられず、消毒剤が排出されたオーシストに有効に作用し、鶏への感染がおきなかったものと考えられる。

桐岡⁽⁵⁾は成熟オーシストをオルソ剤200倍液に6時間浸漬させた後、初生ひなに投与した場合、完全にオーシストを殺滅出来なかった事を報告し、大永⁽³⁾も本薬剤の効果は12時間の作用区で認められたと報告し、成熟オーシストの消毒剤に対する抵抗性の強いことを報告しているが、今回の場合、効果的であったのは、消毒時の気温が30℃で、鶏舎が乾燥するまでの時間は24時間程度で、薬剤の作用時間が長く、かつ作用温度が高かったことによるものと考えられる。コクシジウムのオーシストに有効な消毒剤は、現在オルソ剤のみであるが、使用に当たっては作用時間を長くすることが必要であると考えられる。

鶏舎の水洗及び消毒後の床面からのオーシスト回収は1、2区とも認められず、残存していたとしても、オーシストは極めて少量であると考えられた。

2 試験2

(1) 付着細菌数の推移

ヨード剤消毒による付着細菌数の推移は表4に示した。

第4表 鶏舎の付着菌数の推移（試験2）

区分	位置	水洗前	水洗1日後	消毒1日後
1	側壁	10 ^{3.1} ± 0.2注1)	10 ^{2.5} ± 0.2	10 ^{2.1} ± 0.1
	床面	10 ^{6.5} ± 0.1	10 ^{4.2} ± 0.2	10 ^{2.9} ± 0.3
2	側壁	10 ^{3.2} ± 0.3	10 ^{2.2} ± 0.1	-注2)
	床面	10 ^{6.4} ± 0.2	10 ^{4.4} ± 0.2	-

注1) 1cm当たりの菌数、平均値 ± 標準偏差

注2) -: 無消毒

水洗前の菌数は1、2区とも側壁で10³、床面で10⁶、程度であった。水洗1日後で側壁10²と10⁻¹、床面で10⁴と10⁻²減少した。1区は消毒により床面でさらに10⁻¹減少し、この傾向は試験1と同様の結果を示した。

(2) 臨床症状・剖検成績

1区では飼育期間を通して臨床的な変化は認められなかった。2区では導入1週間後から、軽度の元気消失、食欲減退するものがみられ、白緑色の下痢便が認められたが1週間で全羽数回復した。4週間後に全羽数剖検したが、2区ではファブリキウス囊が1区に比べ小さく、萎縮がみられた。

(3) IB-D-N-T価

IB-D-N-T価は表5に示した。

第5表 IB-D-N-T価（試験2）
 (GM値)

区分	導入後経過週				
	0	1	2	3	4
1	<10	<10	<10	<10	<10
2	<10	<10	493.5	≥20,480	≥20,480

1区では各週とも10以下であったが、2区では2週間後493.5と上昇し、3週間後20,480以上になり、4週間後も同じ値であった。筆者ら⁽⁷⁾は、IBDV 10⁵ E1D₅₀/0.5mlの経口接種では、1週間で抗体の上昇がみられることを報告したが、今回の成績では、無消毒の2区で抗体の上昇が1週間遅れた。このことは水洗によりウイルス量が減少したことによる違いと考えられる。

鶏舎の水洗及び消毒後、床面からIBDVの回収は1、2区とも認められず、2区ではウイルス量が検出限界以下であったものと考えられる。

IBDVウイルスはRNAウイルスの中でも表面にエンペロープを持たず、消毒薬に対しても抵抗性が強い⁽¹³⁾と云われている。平田⁽⁸⁾はヨード剤0.01%液で組織培養法による消毒効果を試験した結果、他のウイルスには有効であったが、IBDVには効果がなかったことを報告している。しかし、宮本⁽¹²⁾は発育鶏卵を使用した試験ではヨード剤のIBDV不活化の有効値は214倍

であると報告し、山口ら⁽¹⁸⁾も、0.3%ヨード剤がIBDVに有効であるとのべている。平田らの成績は10,000倍液での成績であり、今回の試験は200倍液のため、ウイルスに有効に作用したものと考えられる。

以上試験1、2を通じて、今回*Eimeria tenella*汚染鶏舎に対するオルソ剤200倍液の散布と、IBDVウイルス汚染鶏舎に対するヨード剤200倍液の散布は、汚染病原微生物に有効に作用し、その後の導入鶏に対し感染を起さなかったものと考えられる。しかし、使用した薬剤濃度は野外で使用される最も高い濃度であるので、今後、低濃度の場合の調査を行う必要があると考えられる。

摘 要

ニワトリの飼育環境の改善と疾病発生防除の資とするため、平飼い飼育時に、病原微生物である*Eimeria tenella* (ET)と、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV)の感染鶏を飼育して鶏舎を汚染させた。その後、鶏をオールアウトし、ETに対してはオルソ剤、IBDVに対してはヨード剤の消毒効果を調査して次の結果を得た。

1 ET汚染鶏舎を水洗後、オルソ剤の200倍液1ℓ/m²量で消毒した結果、その後の導入鶏にETの感染がみられず、消毒効果が認められた。

2 IBDV汚染鶏舎を水洗後、ヨード剤200倍液の1ℓ/m²量で消毒した結果、その後の導入鶏にIBDV感染がみとめられず、消毒効果が認められた。

3 消毒による付着菌の調査では、床面で水洗により10⁻²、消毒により10⁻¹程度、菌数が減少したが、水洗消毒しても10³個/cm²程度の菌数は残存した。

4 病原微生物で汚染した鶏舎の水洗、消毒後の床面からは、ETオーシスト、IBDVウイルスは検出されなかった。

以上の結果から病原微生物は水洗後には検出されなかったが、無消毒区ではSPF鶏を発症させ、消毒区では感染を阻止できた。

付着細菌数では、消毒剤により10³個/cm²程度にまで減少させれば病原微生物にも有効に作用したものと考えられる。

引用文献

1. 今西禎雄ら, 1983, 慣行消毒法及びその改善による無窓鶏舎の消毒, 家禽会誌, 20, 354~359.
2. ONAGA, H. H. SAEKI and S. UEDA 1985, An enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of coccidiosis in chickens: use of a single serum dilution, Avian Dis. 30, 658~661
3. 大永博資ら, 1984, 新消毒剤 (VEK-100-124) の鶏コクシジウムオーシストに対する効力試験, 第98回日本獣医学会講演会要旨, 200
4. 木村廉, 1957, 細菌学及免疫学, 金原出版, 東京, 37~38.
5. 桐岡寛司, 1972, コクシジウムに対するオルソ剤の消毒効果と問題点, 養鶏の友, 5, 47~52.
6. 鈴木達郎, 内村和也, 岡崎好子, 1986, 家畜由来病原菌に対する次亜塩素酸カルシウム製剤および各種消毒薬の殺菌効果, 千葉家畜研報, 13, 36~40.
7. 番場久雄ら, 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス感染がニューカッスル病ワクチン抗体の産生に及ぼす影響, 1986, 愛知農総試研報, 18, 402~407.
8. 平田清久, 後藤仁, 1987, 各種消毒剤の動物ウイルスに対する殺滅効果, 日獣会誌, 39, 508~511.
9. 古田賢治ら, 1979, 消毒の実施方法に関する研究, I・鶏舎の水洗による付着菌数の減少とホルムアルデヒド燻蒸による消毒効果, 鶏病研報, 15, 159~162.
10. 古田賢治ら, 1981, 消毒の実施方法に関する研究, IV・スチームクリーナーと動力噴霧機の水洗による付着菌数の減少とホルムアルデヒド燻蒸による鶏舎及び管理器材の消毒効果, 鶏病研報, 17, 39~45.
11. 牧野吉伸ら, 1983, 鶏舎の消毒法の再検討, 人工汚染物を指標にした鶏舎の水洗, 消毒効果, 愛知農総試研報, 15, 508~514.
12. 宮本猛ら, 1978, 鶏病ウイルスに対するヨード剤の効果, 畜産情報, 129.
13. 山口成夫, 1982, 鶏病診断 (伝染性ファブリキウス嚢病), 家の光協会, 東京, 119~133.

Sanitization of a Chicken House Contaminated With Pathogenic Microbe (I)

Microbicidal effect of disinfectants on Infectious bursal disease virus and *Eimeria tenella*

Hisao B AMBA, Hitoshi TAWA, Maki MIZUNO and Toshio MIWA

Summary

Experiments were conducted to evaluate the microbicidal effect of disinfectants on *Eimeria tenella* (ET) and Infectious bursal disease virus (IBDV) in chicken houses.

EXP. 1)

A windowless house, with a division in the middle, was contaminated with ET-infected chickens were kept in this house for 3 weeks.

After removing the chickens, the pen was swept to remove the litter. Washing was carried out by jet stream of 3 liter water per 1 m².

One side of the pen was disinfected with 1 liter of Orthodichlorobenzonic dilution 1:200 per 1 m² and the other side was left as it was.

After one week of postdisinfection, the chickens free of ET were housed in both sides of the pen for 4 weeks in isolation.

EXP. 2)

A windowless house, with a division in the middle, was contaminated with IBDV-infected chickens were kept in this house for 3 weeks.

After removing the chickens, sweeping and washing were carried out as mentioned in EXP, 1.

One side of the pen was disinfected with 1 liter of Iodic dilution 1:200 per 1 m² and the other was left as it was.

After one week of postdisinfection, the chickens free of IBDV were reared in isolation in both sides of the pen for 4 weeks.

Microbicidal effects of disinfection in these experiments were determined by development of positive serum enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against ET, neutralization test (NT) against IBDV, and clinical symptoms.

The following results were obtained.

EXP. 1)

The chickens in the disinfected side of the pen failed to develop detectable ET-ELISA antibody during the experimental period.

The chickens in the undisinfected side of the pen showed clinical symptoms for 2 weeks and they developed 100 % positive ELISA test of ET after 3 weeks of confinement.

EXP. 2)

The chickens in the disinfected side of the pen failed to develop detectable neutralizing antibody against IBDV during the experimental period.

The chickens in the undisinfected side of the pen developed 100% positive NT of IBDV after 2 weeks of observation.

From these results, we could infer that the disinfection against the pathogenic ET and IBDV in chicken houses were markedly effective.