

ウインドウレス鶏舎におけるサルモネラ汚染事例

誌名	鶏病研究会報
ISSN	0285709X
著者	北川, 久 松馬, 定子
巻/号	32巻増刊号
掲載ページ	p. 15-21
発行年月	1996年10月

ウインドウレス鶏舎におけるサルモネラ汚染事例

A Case of *Salmonella* Contamination in Windowless Layer Houses

北川 久・松馬 定子¹⁾

岡山県真庭家畜保健衛生所 〒717 岡山県真庭郡勝山町勝山 1884-16

¹⁾岡山県勝英地方振興局 〒707 岡山県英田郡美作町入田 291-1

Hisashi Kitakawa and Sadako Matsuba

Maniwa Livestock Hygiene Service Center, 1844-16

Katsuyama, Katsuyama-cho, Maniwa, Okayama 717

¹⁾Syoei Regional Bureau, 291-1

Mimasaka-cho, Aida, Okayama 707

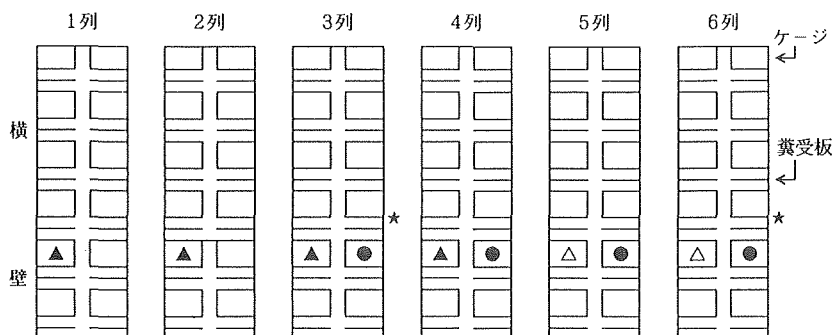
キーワード：ウインドウレス鶏舎, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg, サルモネラ症, 急速平板凝集反応

はじめに

ウインドウレス養鶏場の衛生実態に関する報告は、その経営の閉鎖性のためか、比較的少ないのが現状であり、特に同養鶏場のサルモネラ汚染の実態に関する報告は見当たらない²⁾。1994年10月Kウインドウレス採卵養

鶏場でひな白痢急速診断用菌液に対し高い陽性率を示す鶏群を発見し、その原因究明のため、当該農場の衛生実態調査を実施した。

その結果、同陽性反応の主原因が *S. Enteritidis* (SE)



注●：A,B号舎 ▲：C,D号舎 △：C号舎検査場所 ★：ダスト, 落下細菌測定場

図1. 鶏舎構造縦列側面図 (1棟 直立6段 6列)

1996年7月2日受付

鶏病研報32巻増刊号, 15-21(1996)

およびS. Heidelberg (SH) 感染症であることと共に、細菌汚染に弱いウインドウレス養鶏場の一側面が明らかになったので、その概要を報告する。本稿がウインドウレス養鶏場の衛生実態の解明や、サルモネラ汚染卵対策の抜本的な強化の一助となれば幸いである。

材料および方法

1. 養鶏場の概要

飼養鶏は、新潟県I種鶏場のH種で、1992年11月4日、および1993年12月1日、1994年4月6日および6月1日餌付けの4鶏群（各鶏群約100,000羽）いずれも130日齢前後で大雛導入していた。なお、本養鶏場では470日齢ころに強制換羽を実施していた。

各棟（鶏群）の鶏舎構造を図1に示したが、東洋シテム社のウインドウレス直立6段6列で、1ケージ当たり6羽収容されていた。

鶏舎内の換気システムは、温度センサーにより、ファンの起動数を自動調節することによる陰圧方式で調節している。鶏糞は格段のケージ下約20 cmの位置に設けられた糞受け板で受けた後に自動除糞装置によって、各列の中央部から床下に落下させる仕組みになっている。

2. 検査材料

1) 血清

1994年11月7日、各鶏群とも各列端から約30 m入った位置で、下から2段目のケージより各列5羽計20羽（図1中の○印。ただしC号舎のみ△印計30羽）、4鶏舎計90羽採血し材料に供した。

2) 細菌検査材料

血清採取と同時に各群30羽ずつのクロアカスワブ（プールし1検体とした）のほか、鶏舎内環境については、集卵ベルト・給餌トレイ・糞受け板および床面の各スワブならびにダスト（5分間降塵量）およびハエを細菌検査材料に供した。また、選卵施設内環境は、洗卵排液・鶏卵トレイ・選卵者の手指のスワブおよびハエを同検査材料に供した。

3) 病性鑑定材料

急速平板凝集反応で陽性を示した個体のうち各鶏群3羽計12羽を1994年11月30日および12月1日、病性鑑定材料に供した。

3. 検査方法

1) 血清学的検査

a. 急速平板凝集反応 (RPA)

(a) ひな白痢急速診断用菌液（以下「SP診断液」）を用いて、常法により実施し、凝集反応強度を±～卍の

5段階に分類し記録した。

(b) 生菌凝集反応は、分離菌（SEおよびSH）を抗原として、上記の方法（a）に準じて実施した。

b. Microagglutination Test

SP診断液をリン酸緩衝液（PBS）で25倍に希釈したものを抗原とし、被検血清はマイクロプレートを用いて25～800倍に段階稀釈し、これに等量の抗原を加え、37℃ 2時間感作、1夜4℃に静置後、50倍以上凝集を陽性と判定した（全農家畜衛生研究所で実施）。

c. 寒天ゲル内沈降反応（AGP）検査は、SP診断液ならびに分離株（SEおよびSH）のPBS浮遊液を121℃ 30分間、加熱処理し調整した抗原を用いて常法により実施した。

d. ELISA法

シグマ社製のSEのLPSを超音波処理したものを抗原とし、間接法により行いOD値（650 nm）0.300以上を陽性と判定した（全農家畜衛生研究所で実施）¹⁾。

2) 病理学的検査

心採血殺後剖検し、その所見を記録するとともに、主要臓器を10%ホルマリンで固定後、常法により処理し、HE染色を行い鏡検した。

3) 細菌学的検査

鶏舎内等環境より採材したスワブは、原則としてSBGスルファ基礎培地（栄研）で37℃18～20時間また臓器については、原則としてトリプトソイブイオン培地（Difco）で37℃24～48時間前増菌培養後、SBGスルファ基礎培地で37℃18～20時間、それぞれ選択増菌培養を行った。分離培養はMLCB寒天培地（ニッスイ）で20時間以上培養の後、H₂S産生コロニー6個を釣菌し、ハートインフュージョン寒天培地（Difco）・DHL寒天培地（栄研）で、5～20時間画線培養後、サルモネラO多価血清でスライド凝集反応を行った。

同凝集陽性菌株について、生化学的性状検査を行いサルモネラと決定後、O群およびH群血清（デンカ生研）によるスライドまたは試験管凝集試験を行い血清型を決定した。また、分離したSEについては、国立予防衛生研究所に、ファージ型別検査を依頼した。

4) 環境検査

塵埃濃度は図1中★の位置（ケージ列端から30 m入った床面から約1.2 m）でシバタのデジタル粉塵計を用いて、1分間測定した。落下細菌数は、同位置で普通寒天培地15秒間暴露後、37℃ 24時間培養した後菌数を測定した。

成 績

1. 鶏群別血清学的検査成績

1) 鶏群別の RPA 検査成績

RPA の全 4 鶏群の検査成績は、A 号舎 20 羽中 5 羽 (25%)、B 号舎 20 羽中 15 羽 (75%)、C 号舎 30 羽中 3 羽 (10%)、D 号舎 20 羽中 5 羽 (25%) と、いずれも高い陽性率であった。また、これらのうち反応強度 卍 以上のものが A 鶏群 1 羽、B 鶏群 5 羽、D 鶏群 1 羽認められた (表 1)。

RPA 陽性鶏の発生状況をケージ別に見ると端列より中央列で、NPR 陽性率が高く、また陽性反応強度も同様の傾向がみられた (表 2)。

2) MT 法, AGP 法, ELISA 法検査成績

表 1 に示した検査ならびに A, B, C 鶏舎について約 10 カ月後に行われた追跡調査の検査で、RPA 陽性 (+ 以上) を示した検体について MT 法, AGP 法および ELISA 法を試みたところ、215 日齢から 733 日齢で検査した A, B および D 鶏舎の鶏群では MT 法および ELISA 法により約 60% から 100% の陽性率が得られ、これらの陽性率は抗体陽転後少なくとも 10 カ月間は持続することが認められた。

また、検査鶏群中で最も若い C 鶏舎の鶏群は 150 日齢の検査では、いずれの方法も陰性であったが、約 10 カ月

表 1. 鶏舎別 RPA の検査成績

鶏舎 NO.	A	B	C	D
検査日齢	215	341	150	733
検体羽数	20	20	30	20
陽性羽数 (うち卍以上)	5 (1)	15 (5)	3 (0)	5 (1)
陽性率%	25	75	10	25

表 2. ケージ別 RPA 陽性率 (%)¹⁾

鶏舎 No.	検体数 (羽)	ケージ列					
		1	2	3	4	5	6
A	20			20	20 (20)	20	40
B	20			60	100 (20)	100 (80)	40
C	30	0	0	20	0	40	0
D	20	0	20	60	20 (20)		

1): 表中 () は NPR 卍 以上の個体の占める比率

表 3. MT 法, AGP 法および ELISA 法による検査成績¹⁾

鶏舎 No. 日齢	A		B		C		D
	215	517	341	644	155	448	733
MT 法	7/11 (63.6) ²⁾	10/16 (62.5)	19/19 (100.0)	16/17 (94.1)	0/5	9/19 (47.4)	4/5 (80.8)
AGP 法 ³⁾	7/11 (63.6)	5/16 (31.3)	14/19 (73.7)	12/17 (70.5)	0/5	7/19 (36.8)	1/5 (25.0)
ELISA 法	7/11 (63.6)	11/16 (68.8)	19/19 (100.0)	16/17 (94.1)	0/5	11/19 (57.9)	5/5 (100.0)

- この成績には追跡調査 (約 10 カ月後) 分も含む
- 分母は検体数, 分子は陽性数, () 内は陽性率 (%)
- AGP 法の抗原は、ひな白痢急速凝集診断用菌液

後の 448 日齢には MT 法および ELISA 法により 50% 前後の陽性率を示した。なお、AGP 法については A 鶏舎の 215 日齢での検査では他の方法と同程度の陽性率を示したが、341 日齢以上の日齢では MT 法および ELISA 法に比べて陽性率が低い傾向がみられた (表 3)。また、RPA 反応強度別に、これら 3 検査方法の成績を検討したところ RPA 「+」では ELISA 法は約 50% その他が約 20% の陽性率にとどまったが、「卍」ではそれぞれ約 50~80% の陽性率を、「卍」では MT と ELISA 法は 100%、AGP 法でも約 90% の高い陽性率を示した (表 4)。

2. 病性鑑定成績

1) 病理解剖所見では、全例の喉頭に充出血、肥厚、カタルなどの炎症像が認められ、変性軟卵胞を有するものが、7/12 羽に認められた。なお、肝臓には、針頭大の白斑を有するものが一部に認められた (表 5)。

2) 病理組織所見では全例の喉頭に炎症性細胞浸潤、リンパ濾胞の活性化などの慢性炎症像を認めた。気嚢でも導入後時間的経過の少ない、C 鶏群を除き、同様の慢性炎症像を、またはほぼ全例の肝臓、卵巣にも感染症の所見を認めた。ただし肝臓には、チフス結節の所見は認められなかった (表 6)。

表4. RPA反応とMT, AGPおよびELISA法の比較¹⁾

RPA法	+	#	#
MT法	7/37(18.9) ²⁾	22/29(75.9)	26/26(100.0)
AGP法 ³⁾	7/37(18.9)	16/29(55.2)	23/26(88.5)
ELISA法	19/37(51.4)	24/29(82.8)	26/26(100.0)

- 1) この成績には追跡調査(約10ヶ月後)分も含む
 2) 分母は検体数, 分子は陽性数, ()内は陽性率(%)
 3) AGP法の抗原は, ひな白痢急速凝集診断用菌液

表5. 病理解剖所見

所見	鶏舎No. 検体No.	A			B			C			D		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
喉頭													
充出血, 肥厚, カタル		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肝臓													
針頭大白斑		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
卵巣													
変性卵胞, 軟卵胞		-	#	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
小腸粘膜													
一部肥厚, 出血		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
盲腸													
カタル		+	-	-	+	+	#	-	#	+	+	+	+
肥厚		-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
出血巣		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

表6. 病理組織所見

所見	鶏舎No. 検体No.	A			B			C			D		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
喉頭													
炎症性細胞浸潤		+	NT	-	-	-	+	NT	+	NT	+	+	+
リンパ濾胞活性化		+	NT	+	+	+	+	NT	+	NT	+	+	+
気嚢													
偽好酸球浸潤		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
リンパ濾胞活性化		-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
肉芽組織増生		-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
肝臓													
偽好酸球浸潤		+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
リンパ球浸潤・集簇		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RES系細胞活性化		+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
卵巣													
偽好酸球浸潤		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
リンパ球浸潤・集簇		+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
マクロファージ浸潤		+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
肉芽組織増生		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
プラズマ細胞浸潤		-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
巨細胞浸潤		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

NT: 検査せず

表 7. 臓器別 *Salmonella* 分離成績

臓器名	鶏舎 No. 検体 No.	A			B			C			D		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
胆嚢		SE	SE	SE	-	-	-	-	SE	SE	SH	-	-
卵巣		SE	SE	SE	-	SH	-	SE	SE	SE	-	-	SH
卵胞		SE	SE	-	-	-	-	-	-	-	SH	-	SH
卵管		-	SE	SE	-	-	-	SE	SE	SE	-	-	-
盲腸		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
その他 (肺)													SH

表 8. 病性鑑定鶏の血清反応と菌分離成績

		急速凝集反応			MT 法	ELISA 法	A.G.P		菌分離	診断
		SP 診断液	生菌抗原				SE	SH		
			SE	SH						
A	1	+	+	+	<25	-	-	-	SE	SE 感染症
	2	卍	卍	卍	800	+	++	-	SE	
	3	+	++	+	25	-	++	+	SE	
B	1	++	+	+	100	+	-	-		SH 感染症
	2	++	++	++	100	+	-	-	SH	
	3	卍	卍	卍	800	+	++	卍		
C	1	++	++	++	25	-	-	-	SE	SE 感染症
	2	++	+	+	25	-	-	-	SE	
	3	±	+	+	25	-	-	-	SE	
D	1	++	++	++	25	+	-	-	SH	SH 感染症
	2	+	++	++	100	+	-	-		
	3	卍	++	卍	200	+	++	++	SH	

表 9. *Salmonella* 分離成績

採材場所	鶏舎 No.	A	B	C	D
《鶏体》					
胆嚢, 卵巣, 卵管等		SE 10 株	SH	SE 8 株	SH 5 株
クロアカスワブ		<i>S. Corvallis</i>	-	<i>S. Ohio</i>	<i>S. Livingstone</i>
《環境》					
鶏舎内					
給餌トレイ			SE	-	-
糞受板		<i>S. Corvallis</i>	-	<i>S. Ohio</i>	SE SH
床面		<i>S. Ohio</i>	SH	-	<i>S. Ohio</i>
《選卵場》					
洗卵排液		SE			SH
鶏卵トレイ			<i>S. Singapore</i>		

注 : SE = *S. Enteritidis*, SH = *S. Heidelberg*

3) 細菌検査成績では、主要臓器(胆嚢, 卵巣, 卵胞, 卵管等)からの分離菌は, グラム陰性桿菌, H₂S 産生(+), 尿素分解(-), ゼラチン液化(-), サルモネラO多価血清凝集(+)等で, 血清学的性状(O抗原, H抗原)検査の結果, A鶏群11株はSE, B鶏群1株はSH, C鶏群8株はSE, D鶏群5株はSHと鶏群ごとに単一の血清型の4鶏群2血清型に固定された。

これらサルモネラの臓器別分離頻度は検査材料数当りでは卵巣が最多の8/12で, 以下胆嚢6/12, 卵胞4/12であり, D鶏群のNo. 3では肺炎病巣からもSHが分離された。なお, 盲腸からの分離は全て陰性であった。

また, 鶏群別サルモネラの分離頻度は, Aが10/15と最多で, 以下C8/15, D4/15, B1/15の順であった(表7)。

4) 血清学的検査成績(表8)

a. 急速凝集反応では, RPAの結果と分離抗原(SEまたはSH)によるそれとの間に強い相関が認められた。分離抗原による成績では, SEにより強く反応したもののA群2検体, SHにより強く反応したもののB群1, D群1検体であった。

b. MT法ではA群1, B群3, D群2の計6検体が陽性と判定された。

c. ELISA法ではA群1, B群3, D群3の計7検体が陽性と判定された。これは1検体を除き, MT法の結果とほぼ一致していた。

d. 分離株菌から調製した抗原によるAGP試験では, 交差反応が4検体中3検体に認められたが, SEにより強く反応したA群2検体, SHにより強く反応したもののB群1検体であった。

5) 診断

病性鑑定鶏9羽の血清学的検査では, SP診断液やSEおよびSH生菌抗原による急速凝集反応は1羽(C3)が±を示した以外は全て種々な程度に陽性反応を呈し, MT法, ELISA法およびAGP法では, 4羽(A1およびC1, 2, 3)が全て陰性であった以外は, いずれかの方法に陽性反応を示し, SEあるいはSHの保有抗原に対する抗体が認められた。さらに細菌学的検査でAおよびC鶏舎の鶏ではSEが, BおよびD鶏舎の鶏からはSHがそれぞれ単一の血清型として分離されたので, これらの鶏はSEあるいはSH感染症と診断された(表8)。

3. 環境等の細菌検査成績

1) *Salmonella*の分離成績

病性鑑定および環境検査により分離され, 血清型が同定された*Salmonella*の分離成績をまとめて表9に示した。A鶏群の床面(S.Ohio), B鶏群の給餌トレー(SE), D鶏

群の糞受板(SE)および床面(S.Ohio)を除き, おおむね各鶏群ごとに独立した菌相を示していた。また, 洗卵排液からは, SEおよびSHが, 鶏卵トレーからは, 鶏群とは異なる*Salmonella*が分離された。なお, 鶏体および環境由来のSEは全株(21株)ファジータイプ(PT)1であった(表9)。

2) 環境調査成績

鶏舎内環境として, ダスト濃度と落下細菌数を測定したところ(表10), ダスト濃度は, 端列の10 mg/m²×分に対して, 中央部列では20 mg/m²×分と2倍の値であり, 落下細菌数は, ダスト濃度に比例していた。

表10. 鶏舎内の環境

検査場所	中央列	端列
検査項目		
ダスト濃度 (mg/m ²)	20	10
落下細菌数 (個/分)	2136	1040

注: B鶏舎内で測定

考察とまとめ

1. RPA陽性鶏は, 経験的に, 開放鶏舎では鶏群の10%程度で認められ, かつ反応強度(+)程度のものが多い。本症例の場合, 最高で75%の異常に高い陽性率を示す鶏群があり, かつ1鶏群を除いて, ひな白痢の場合に類似した強い反応強度を示す個体が含まれていたことが特徴であった。

2. RPAにみられるNPRは全く非特異的なものから共通O抗原による交差反応性のものまであり, また交差反応性のものも, *Salmonella* (SE, SH, ST)によるものと, *Salmonella*以外の腸内細菌(大腸菌, *Proteus* sppなど)によるものなど多様であることが知られている⁹⁾。今回, RPA陽性検体について, AGP法, MT法, ELISA法を用い, *Salmonella*菌群の共通のO抗原によるものかどうかという意味でその特異性を検討したところ, RPA法で「卍」陽性反応を呈した血清ではMT法・ELISA法100%, AGP法約90%の高い陽性率を, また, 「+」の血清でもELISAとMT法は約80%, AGP法は約50%の陽性率を示した。しかし, 「+」の血清ではELISA法での陽性率が約50%でMTやAGP法での陽性率は約20%程度と低率であったので, これらの血清には抗原的な交差反応によらない非特異的なNPRの関与が示唆された。

なお, これらの血清を採取したK農場の鶏群からは

SEあるいはSHが分離されているので、今回みられた高率かつ強いRPA陽性反応は、おもに*S. Pullorum*との共通O抗原(O9, O12など)を有するSEまたはSHなどの感染鶏における交差反応性NPRであることが明らかにされた。

したがって、これらのことを考慮して実施すればRPA法は簡便・スピーディかつコストも安く、公衆衛生上問題となる*Salmonella* (SE, SH, ST)による鶏群汚染の第一次のスクリーニングには有効な方法と考えられた。なお、特異性をチェックする方法としてはAGP法はやや感度が低く、MT法やELISA法がより優れていると考えられた。

3. 4鶏群各3羽についての病性鑑定の結果、主要臓器から各鶏群とも単一の血清型の*Salmonella* (SEまたはSH)が分離されSEおよびSH感染症各2鶏群と診断した。ただし環境調査における細菌検査成績(表9)では、病性鑑定鶏からSHが分離されたBおよびD鶏舎の給餌トレーや受糞板からSEが検出されているので、これらの鶏群にはSH感染鶏だけではなくSE感染鶏も存在した可能性も否定できない。また、鶏のクロアカスワブや環境からのSEおよびSH以外の*Salmonella*の分離状況をみるとクロアカスワブと糞受板からA鶏舎では*S. Corvallis*, C鶏舎では*S. Ohio*が、また、D鶏舎ではクロアカスワブから*S. Livingstone*が検出されており、これらの*Salmonella*がそれぞれの鶏舎の鶏群に保菌されていたことが示唆された。さらに、*S. Ohio*はC鶏舎のみならずAおよびD鶏舎の床面から、SEとSHは選卵場の洗卵排液からも検出されている。これらの成績から、本農場では各鶏舎ごとに特徴的な血清型を含め複数の血清型による鶏舎内の汚染も認められ、また、SEあるいはSHも鶏群の保菌にとどまらず鶏舎や選卵場などの施設を汚染しているものと思われる。したがって今後は、これら農場施設や鶏群の汚染菌が導入鶏群のサルモネラ感染源となる可能性も推測された。

4. 従来から鶏のサルモネラ症に及ぼす環境の影響が重視されているが²⁾、K農場におけるSEまたはSHによる鶏群の高度汚染の要因を探るため環境調査を実施したと

ころ、ダスト濃度が10~20 mg/m³/分と畜舎の一般環境基準0.1 mg/m³/分の100~200倍、開放鶏舎の1 mg > /m³/分に比しても10~20倍以上であり、落下細菌数はダスト濃度に比例していた。

いっぽう、病理所見として、一般の開放鶏舎のレイヤーではほとんどみられない喉頭や気嚢の慢性炎症が認められ、またダスト濃度の高い鶏舎の中央部でNPR陽性率や反応強度が高まる傾向が認められた。これらの事実はウインドウレス鶏舎における飼育環境が呼吸器病などの発生要因として重視されていると同様に、飼育環境そのものが本症例の発生を助長したことを示唆しており、「細菌感染症に弱い」ウインドウレス鶏舎の一面を指摘するものと考えられた^{2, 3)}。

本稿をおわるにあたり、本症例検査にご協力をいただいた岡山県家畜病性鑑定所奥田専門研究員、北村研究員、またELISA法検査等でご協力のご助言をいただいた全農家畜衛生研究所佐藤静夫先生、今井研究員さらにファージ型検査でご便宜をいただいた国立予防衛生研究所の中村明子外来性細菌室長に心から謝意を表します。

文 献

- 1) 今井康夫, 並松孝憲, 佐藤静夫: ELISA法による*S. Enteritidis*感染鶏群のスクリーニング法の検討. 第120回日本獣医学会講演要旨集, p139 (1995)
- 2) 鶏病研究会: ウインドウレス採卵鶏舎の衛生対策. 鶏病研報 32, 1-7 (1996)
- 3) 中村政幸: 鶏のサルモネラ感染と環境要因. 鶏病研報, 30 (増), 15-23 (1994)
- 4) 野村仁志: 採卵養鶏農家のサルモネラ浸潤状況. 全国家畜衛生保健所業績発表抄録 29. 1 (1995)
- 5) 佐藤静夫: ひな白痢の血清学的診断におけるいわゆる非特異反応 (non-pullorum reaction) について. 鶏病研報 8 (増), 1-11 (1972)