

Salmonella Enteritidis 感染鶏の排菌に及ぼす産卵開始 の影響

誌名	鶏病研究会報
ISSN	0285709X
著者	佐藤, 寛子 竹原, 一明 中村, 政幸
巻/号	33巻3号
掲載ページ	p. 160-165
発行年月	1997年11月

Salmonella Enteritidis 感染鶏の排菌に及ぼす産卵開始の影響

佐藤寛子・竹原一明・中村 政幸

北里大学獣医畜産学部, 〒034 青森県十和田市東 23 番町 35-1

要 約

鶏の産卵開始をストレスとして考え、*Salmonella Enteritidis* (SE) 感染鶏における盲腸便排菌に及ぼす産卵開始の影響を調べるとともに、複合ビタミン剤が排菌を軽減するか検討した。実験 1 では、20羽の 16 週齢コマーシャル採卵鶏に SE HY-1 Rif を経口あるいは気管内接種し、29~30 週齢時に 9 日間断餌し、この間経時的に盲腸便排菌を調べた。いずれの接種群においても排菌陽性鶏は接種 4~5 週後に減少したが、その後の産卵開始とともに排菌陽性鶏は増加し、この傾向は約 4 週間続きその後減少した。さらに、断餌 3~4 週後から再び排菌陽性鶏が増加した。実験 2 では、24 羽の 15 週齢鶏を用い複合ビタミン剤投与群と非投与群に分け、両群に本菌を 10^9 CFU 経口接種し、経時的に盲腸便排菌を調べるとともにフローサイトメトリーによりリンパ球の動態を調べた。その結果、複合ビタミン剤の効果は認められず、両群において産卵開始とともに排菌羽数が増加し、この増加は産卵数の増加と密接な関係があった。また、産卵開始前後において CD4 および CD8 陽性リンパ球の減少が認められた。以上の成績より、産卵開始がストレスとなり、リンパ球が減少し、免疫機能が低下した結果、排菌羽数が増加したものと推察した。

キーワード：サルモネラ、排菌、産卵開始、ストレス、複合ビタミン剤

緒 言

最近、鶏における *Salmonella Enteritidis* (SE) 感染症をはじめサルモネラ感染に及ぼすストレスの影響が注目されている。このようなストレスには暑熱・寒冷ストレス、社会的ストレス、他病との複合感染、一時的断餌・断水、強制換羽等があり、これらのストレスにより排菌が高まり、感染が持続し、感受性が昇進することが認められている^{3,4,6-8,10,11,13}。この中で最も影響が大きいストレスは強制換羽であり、Holt^{4,6} が一連の研究で詳細に述べたように、このメカニズムとしてリンパ球が減少し、細胞性免疫機能が低下し、免疫応答も減弱することを明らかにしている⁵。

以上のように鶏のサルモネラ症、特に SE 感染症が種々のストレスによって影響を受けることが明らかにされているが、生理的な現象である産卵開始がストレスとして SE 感染鶏に対してどのような影響を与えるかについてはほとんど検討されていない。そこで、今回、著者等は接種菌数、接種方法を変えて盲腸便排菌に及ぼす産卵開始の影響について調べ、引き続き 9 日間の断餌の影

響についても検討した。また、強制換羽における SE に対する感受性増加のメカニズムを検討した Holt⁵ の報告を参考にし、産卵開始前後のリンパ球の動態をフローサイトメトリーにより検討した。さらに、このようなストレスの影響を市販の複合ビタミン剤で緩和ないしは減弱させることが可能か否かについても検討した。

材 料 と 方 法

1. 供試菌株

1989 年に英国から輸入された検疫中のプロイラー種鶏ひなから分離された *Salmonella Enteritidis* (SE) をリファンピシン耐性にした SE HY-1 rif 株を使用した⁹。本菌がリファンピシン耐性付与により、毒力が低下していないことは鶏を用いた感染実験で確認されている⁹。

2. 供試鶏

白色レグホン系のコマーシャル採卵鶏 16 週齢 20 羽、15 週齢 24 羽を用いた。北里大学感染施設搬入直後にそれぞれ 10 羽の盲腸便を検査し、サルモネラ陰性であることを確かめた。

3. 細菌学的検査

盲腸便：早朝に排泄された盲腸便約 1g を秤量し 9 倍

1997 年 5 月 13 日受付

鶏病研報 33 巻 3 号, 160~165 (1997)

量のハートテトラチオン酸塩培地 (HTT: 栄研) を加え、これを原液として 10 倍階段希釈を行い、それぞれの希釈液 0.025 ml をリファンピシン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加 DHL 寒天平板 (rif DHL 平板) に塗抹し、生菌数を算出するとともに、原液を 41.5°C、24 時間増菌培養した。分離培養には rif DHL 平板を用い、37°C、24 時間培養した。SE HY-1 rif 株のコロニー性状と一致したコロニーを TSI 培地 (栄研)、SIM 培地 (栄研)、リジン脱炭酸塩試験用培地 (栄研) を用いてサルモネラ同定試験を実施した。さらに、遅延二次増菌培養 (Delayed Secondary Enrichment: DSE) も実施した。DSE とは、鶏腸管内容物にはサルモネラの増殖を抑制する因子が含まれていることがあるのでその影響を避けるために、サルモネラ陰性となった増菌培地 (本実験では HTT 培地) を室温 (20~25°C) に 5~7 日間放置後、その 0.5 ml を新鮮な HTT 培地に接種する方法であり¹⁴⁾、これにより抑制因子の作用が消失し分離率が向上する。なお、本方法は米国内でも公定書に掲載されている¹⁾。検体中の生菌数の多少によって一概には言えないが、著者のこれまでの経験から約 30~50% 程度の分離率の上昇が認められている (未発表)。

臓器: すべての実験が終了した後、肝臓と脾臓を 9 倍量のハートインフュージョン液体培地 (HIB: 栄研) で 37°C、24 時間増菌培養後、rif DHL 平板を用い、37°C、24 時間培養し判定した。臓器についても室温に 5~7 日間放置後、その 0.5 ml を新鮮な HIB 培地に接種する DSE も実施した。

なお、著者らは盲腸便、臓器を問わず検出限界を 400 CFU/g に設定しており、もし検出限界以下で 1 日増菌培養で陽性になれば、100 CFU/g、DSE で陽性になれば 10 CFU/g、陰性ならば 0 CFU/g と暫定的に決め生菌数を算出している。

4. フローサイトメトリー

採取したヘパリン加血液に 0.4425 w/v トリプトースホスフェイトブロス加ハンクス液 (ハンクス液: ソルベイヂュファ) を等量加え、さらに血液量と等量のリンホブレップ (NYCOMED) を加え 400 g で 20 分間遠心し、白血球層を採取し、ハンクス液で 2 回洗浄し、細胞数を $1 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した。この浮遊液 50 μml に抗鶏 CD4 あるいは CD8 モノクローナルマウス抗体 (家畜衛生試験場、磯部 尚室長より分与) 50 μml を混合し 20 分間氷冷後、再びハンクス液で 2 回洗浄した。その後、FITC ラベル抗マウス IgG+IgM (H+L) 兔血清 (イムノリサーチ) 50 μml を混合し 20 分間氷冷後、再びハンクス液で 2 回洗浄し、ファックスフロー液 (Becton

Dickinson) に浮遊し、ファックスキャン (Becton Dickinson) により取込細胞数を 3,000 個とし、CD4、CD8 陽性リンパ球数を算出した。なお、全リンパ球数を求めるため、リンパ球に対するモノクローナル抗体 K-55 (米国農務省 Lillehoj 博士より分与) を用いて同様に処理し、全リンパ球数を求め、全リンパ球に対する CD4、CD8 陽性細胞の比率 (%) を算出した。

5. 経口感染、気管内感染実験

3 時間振盪培養した SE HY-1 Rif を 1 群 5 羽からなる 16 週齢鶏 4 群のそれぞれに 1.2×10^9 CFU/1 ml, 1.2×10^6 CFU/1 ml ずつを経口接種, 1.2×10^6 CFU/0.1 ml, 1.2×10^3 CFU/0.1 ml ずつを気管内接種し、42 週齢まで毎週細菌学的検査を行なった。また、産卵数を毎日調べた。さらに、29~30 週齢時に強制換羽のため 9 日間断餌を行なった。42 週齢時に剖検し、肝臓と脾臓の細菌学的検査を行なった。

6. 産卵ストレスに対する複合ビタミン剤の影響

15 週齢鶏 12 羽に毎日複合ビタミン剤 (パントテン酸カルシウム、ビタミン B2、ビタミン B6、ニコチン酸アミドを含む合剤) を 5 g/ml になるように飲料水に溶解し、自由飲水させた。15 週齢の鶏は 1 日平均 105 ml を飲水したので、複合ビタミン剤を毎日約 0.5 g 飲水投与したことに相当する。また、比較として 12 羽は複合ビタミン剤を投与しない対照群とした。複合ビタミン剤投与から 5 日後、3 時間振盪培養した SE HY-1 Rif を試験群、対照群のそれぞれに 3.1×10^9 CFU/ml ずつを経口接種した。毎週 1 回 27 週齢まで盲腸便の細菌学的検査を実施し、その際、19 週齢までは菌数計算も行なった。その後、21 週齢から 27 週齢までは毎日盲腸便を採取し、細菌学的検査を行なった。また、産卵数についても毎日調べた。

成 績

1. 経口、気管内感染実験

10^9 CFU 経口感染群の排菌羽数と産卵数との関係を図 1 に示す。接種 4 週後頃から排菌羽数が減少し、5 週後には 1 羽のみとなった。しかし、産卵が開始されると排菌羽数も増加した。排菌羽数の増加した期間は 2 週間程度である。さらに、29~30 週齢時に 9 日間断餌を行ったところ、その 2 週後の再び産卵が開始された時期とほぼ一致して排菌羽数の増加が認められた。

このようなパターンは 10^6 CFU 経口感染群、 10^6 CFU、 10^3 CFU 気管内感染群においても同様に認められた。そこで、これらの 4 群をまとめて図 2 に示す。接種 3 週目までは 20 羽近くが排菌していたが、接種 5 週後の 21 週

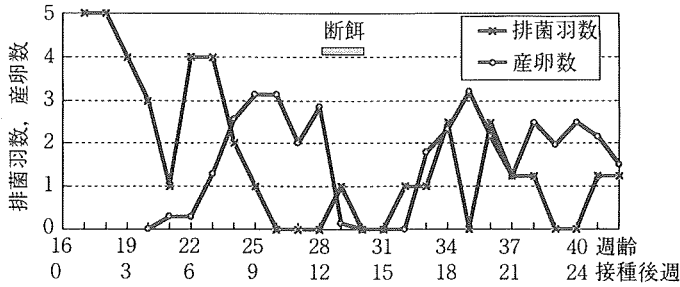


図 1. 排菌羽数と産卵数との関係 (10⁹ CFU 経口感染群)
(産卵数はそれぞれ 1 週間における 1 日 1 羽当りの平均産卵数)

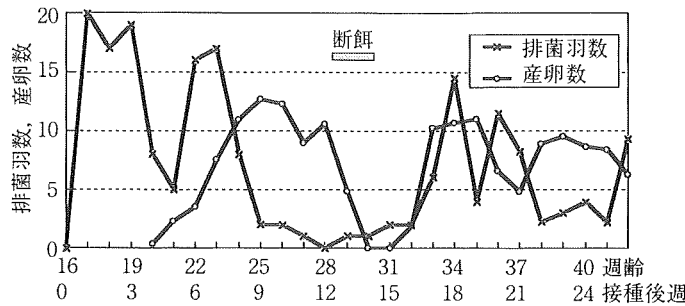


図 2. 排菌羽数と産卵数との関係 (まとめ)
(産卵数はそれぞれ 1 週間における 1 日 1 羽当りの平均産卵数)

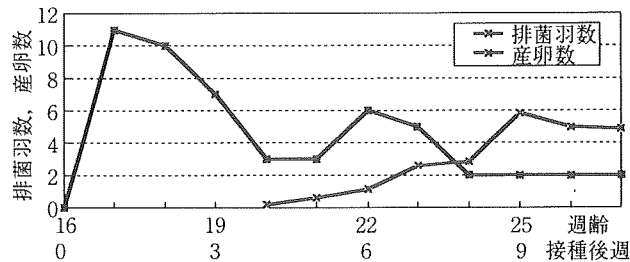


図 3. 複合ビタミン剤投与群における排菌羽数と産卵数との関係 (週 1 回検査)
(産卵数はそれぞれ 1 週間における 1 日 1 羽当りの平均産卵数)

齢時には 5 羽までに減少した。その後の産卵開始と一致して 22, 23 週齢時には排菌羽数は 16~17 羽にまで増加し, 29~30 週齢時に断餌を行ったところ, 産卵は断餌 2 週後から再開されたが, それとともに排菌羽数も増加し, 34 週齢では 14 羽に達した。産卵開始時と断餌後の排菌状態を比べると, 産卵開始では 2 週間程度排菌羽数が増加したが, その直後に減少したのに比べ, 断餌では多少の変動はあるものの約 5 週間排菌羽数が増加した。なお, 接種方法の相違は産卵開始時期における排菌羽数

にあまり影響を与えなかった。一方, 断餌では経口感染群と比べて気管内感染群における陽性羽数が多い傾向を示した。また, 剖検後の細菌学的検査で, 盲腸内容は DSE によって 10³ CFU 気管感染群 1 羽が陽性, 肝臓は DSE によって 10⁶ CFU 経口感染群 1 羽, 脾臓は DSE によって 10⁶ CFU 経口感染群, 10³ CFU 気管内感染群のそれぞれ 1 羽づつ計 2 羽が陽性となった。

2. 複合ビタミン剤の排菌に及ぼす影響

複合ビタミン剤投与群 (図 3) では接種 3 週後頃から

排菌羽数が減少し、4 週後である 20 週齢には 3 羽のみとなった。しかし、20 週齢頃から産卵を開始すると排菌羽数は増加し、その後 24 週齢には 2 羽へと減少した。複合ビタミン剤非投与の対照群も同様な経過を示した。両群における排菌羽数に有意な差はなく、排菌菌数を比較しても有意の差は認められなかった。

以上は毎週 1 回の成績であり、排菌羽数と産卵数の関係をさらに詳しく検討するために毎日検査した成績を図 4、5 に示す。両群において、産卵数が多い日は排菌羽数も多く、逆に産卵数が少ない日は排菌羽数が少なくなっており、この関係は特に産卵が開始された 8 月 20 頃から 9 月初旬までにおいて顕著であった。以上の成績より、産卵羽数と排菌羽数は密接な関係にあること、さらに複合ビタミン剤は排菌羽数の減少にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。

3. 産卵開始前後における CD4, CD8 陽性細胞の変動

複合ビタミン剤投与群および非投与群からそれぞれ 5 羽ずつを選び、CD4, CD8 陽性細胞の変動を調べた。両群の排菌羽数、産卵数に差がなく、これらのリンパ球の変動にも差がなかったため、両群の成績をまとめて図 6

に示す。産卵開始 1 週前から CD4, CD8 陽性リンパ球が減少し、産卵開始 1 週後に最も低い値となり、2 週後から回復に向かう傾向が認められた。

以上の成績により、複合ビタミン剤投与、非投与群における CD4, CD8 陽性リンパ球の動態に、特に差はみられず、両群とも産卵開始により両リンパ球が減少する

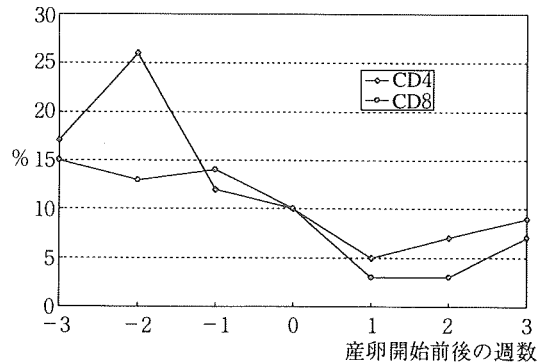


図 6. 産卵開始前後における CD4, CD8 陽性リンパ球の変動

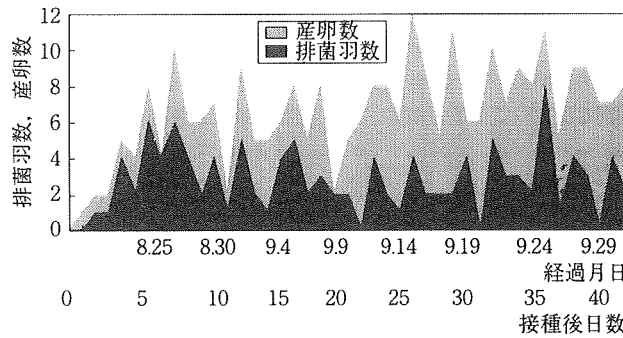


図 4. 複合ビタミン剤投与群における排菌羽数と産卵数との関係 (毎日検査)

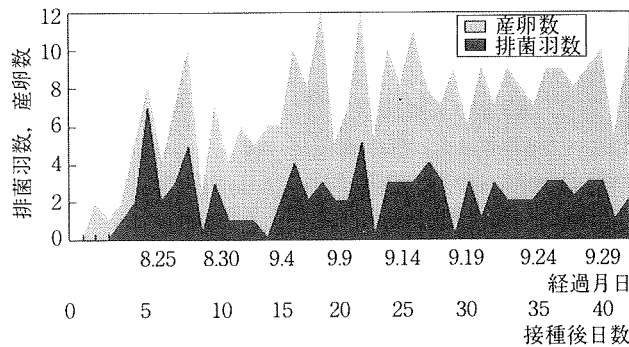


図 5. 複合ビタミン剤非投与群における排菌羽数と産卵数との関係 (毎日検査)

ことが明らかになった。

考 察

1992年にJones⁷⁾が高温飼育の鶏群においてサルモネラの分離率が高くなることを報告して以来、鶏におけるサルモネラ感染に及ぼすストレスの影響についての関心が非常に高まった。それらのストレスには先に述べたように多くの種類が報告されているが、その中でも強制換羽が最も影響の大きいストレスとして考えられている⁴⁻⁶⁾。

今回、この強制換羽のため9日間の断餌を実施したが、断餌後の排菌羽数は経口感染群より気管内感染群において多い傾向が見られた。気管内感染においては、接種されたSEが直ちに血流を介して体内に分布すること²⁾、気道感染においては経口感染よりも、生殖器、実質臓器における本菌の分離率が高く、また経口感染よりも排菌期間が長くなることは明らかにされている¹¹⁾。これらを考えると、経口感染群と気管内感染群の断餌による影響は同程度としても、気管内感染群において排菌羽数が多くなったことは推察できる。

このような断餌による影響のメカニズムとして、Holt⁵⁾は強制換羽におけるTリンパ球の減少を指摘した。すなわち、ストレスの影響にはTリンパ球が関与していると考えられる。本実験ではこのことを考慮し、生理的現象である産卵開始をストレスとして考え、そのメカニズムの一部を解明することを企図し、リンパ球の動態も調べた。

本実験において通常ストレス等の刺激がなければこれまでの本菌を用いた多数の実験成績から、本菌の排菌期間は1カ月程度なので^{10,11)}、以後分離されなくなるはずである。しかし、減少していた排菌羽数が産卵開始とともに再び増加し、産卵開始がかなりのストレスになることが明らかになった。このようなストレスの作用メカニズムについては、先に述べた強制換羽と同様リンパ球の関与を考え、フローサイトメトリー法を用いて検討した。Holt⁵⁾は強制換羽初期に末梢血のCD4陽性リンパ球が減少することを明らかにしており、本実験でも産卵開始の約1週間前からCD4およびCD8陽性リンパ球の減少が認められた。したがって、何十年にもわたる遺伝的な改良によって、確かに産卵数を飛躍的に増加させることに関して大いに貢献したが、そのいっぽうでは本来生理的である産卵開始がリンパ球をも減少させるほどの影響を生体に与えたと推察される。リンパ球が減少すれば免疫機能が低下し、体内に存在していたSEが再び増殖するであろうし、感受性が増加し周囲環境からの伝播を

受け易くなることは容易に考えられる。その結果、排菌羽数が増加したと推察された。著者らは数年前の実験で、SEを感染させてから排菌が終息した鶏に免疫抑制剤であるデキサメサゾンを経口投与し、接種群では5羽中3羽において排菌が認められたが、対照群では排菌は認められなかったことを報告した¹⁰⁾。このデキサメサゾンの実験も上述のことを支持するものと考えられる。

このように産卵開始はストレスとなり、リンパ球が減少し、その結果排菌羽数が増加したことには一応の解釈が得られたが、産卵行為そのものと排菌との関係では、産卵数が多ければ排菌羽数も多く、逆に産卵数が少なければ排菌羽数も減少することも明らかになった。このことは産卵行為そのものがストレスとなり、CD4およびCD8陽性リンパ球が減少した結果、排菌羽数が増加するという著者らの主張をさらに支持するものである。もとより本研究は現象を明らかにしたもので、その背後のメカニズムにはリンパ球の動態を調べた程度でほとんど立ち入っていない。今後は高橋¹²⁾が述べているようにストレスと免疫応答との関係等に関する詳細な実験が必要であろう。

なお、対策の一助と考え、複合ビタミン剤を使用したのがその効果は認められなかった。今回用いた複合ビタミン剤はそれなりの効能・効果は認められているものではあるが、本実験のような言わば新しいタイプのストレスには有効ではないと考えられる。

これまで報告されているストレス^{3,4,6-8,10,11,13)}の多くは人為的なもので、暑熱・寒冷ストレスを含めて設備投資は必要なものの不可避なものではない。しかし、産卵開始に関しては今のところ不可避である。したがって、対策としては産卵開始前にサルモネラ、特にSEフリーにしておくことが必須条件となる。

以上のように、産卵開始は鶏にとってかなりのストレスとなりSEの汚染を拡大させ、環境を汚染させ、SEの伝播を容易に生じさせる可能性がある。このことはサルモネラだけに限らず他の細菌やウイルスなどの病原体の場合にもあてはまるものと考えられる。このような産卵開始の影響を明らかにしたことは鶏病対策上有益と考えられる。

謝 辞

抗鶏CD4、CD8モノクローナルマウス抗体を分与して頂き、K-55モノクローナル抗体を米国農務省のHynn S. Lillehoj博士から分与頂くにあたり、仲介の労をとって下さった、農林水産省 家畜衛生試験場の磯辺尚室長に深謝致します。

文 献

- 1) Anon. : Code of Federal Regulations. *9 CFR* Ch. 1 (1-1-96 Edition) 147. 11, pp. 736-737 (1996)
- 2) Baskerville, A. *et al.* : Airborne infection of laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Vet. Rec.* **130**, 395-398 (1992)
- 3) Boonchavit, B. *et al.* : Interaction of T-2 toxin with *Salmonella* infection of chickens. *Poult. Sci.* **54**, 1693-1696 (1975)
- 4) Holt, P.S. : Effect of induced molting on the susceptibility of white leghorn hens to a *Salmonella enteritidis* infection. *Avian Dis.* **37**, 412-417 (1993)
- 5) Holt, P.S. : Effect of induced molting on B cell and T cell and CD4 and CD8 T cell numbers in spleen and peripheral blood of white leghorn hens. *Poult. Sci.* **71**, 2027-2034 (1992)
- 6) Holt, P.S. and Porter, Jr, R.E. : Effect of induced molting on the course of infection and transmission of *Salmonella enteritidis* in white leghorn hens of different ages. *Poult. Sci.* **71**, 1842-1848 (1992)
- 7) Jones, F.T. : Breeding flock study shows *Salmonella*-causing factor. *Feed Stuffs* **64**, 1, 22-23 (1992)
- 8) 中村政幸 : 鶏のサルモネラ感染に及ぼすストレスの影響. 鶏病研報 **29**, 136-141 (1993)
- 9) Nakamura, M. *et al.* : The ability of transovarian infection of *Salmonella* Enteritidis isolated from chicks imported from England. *J. Vet. Med. Sci.* **55**, 135-136 (1993)
- 10) Nakamura, M. *et al.* : Horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* and effect of stress on shedding in laying hens. *Avian Dis.* **38**, 282-288 (1994)
- 11) Nakamura, M. *et al.* : Intratracheal infection of chickens with *Salmonella enteritidis* and the effect of feed and water deprivation. *Avian Dis.* **39**, 853-858 (1995)
- 12) 高橋和昭 : 鶏における疾病と栄養. 鶏病研報 **32**, 125-140 (1996)
- 13) Phillips, R.A. and Opitz, H.M. : Pathogenicity and persistence of *Salmonella enteritidis* and egg contamination in normal and infectious bursal disease virus-infected leghorn chicks. *Avian Dis.* **39**, 778-787 (1995)
- 14) Waltman, W.D. *et al.* : Use of delayed secondary enrichment for the isolation of *Salmonella* in poultry and poultry environments. *Avian Dis.* **35**, 88-92 (1991)

The Effect of the Start of Egg-laying on Shedding of *Salmonella* Enteritidis in Experimentally Infected Chickens

Hiroko Sato, Kazuaki Takehara, and Masayuki Nakamura

School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University,
35-1, Higashi 23 Towada Aomori, 034

Summary

The effect of the start of egg-laying on the shedding of *Salmonella* Enteritidis (SE) in experimentally infected chickens was investigated. In Experiment I, twenty 16-week-old White Leghorn chickens were inoculated with SE Hy-1 Rif orally or intratracheally, and when 29 to 30 weeks old feed was withdrawn for nine days. The number of chickens shedding SE decreased after four or five weeks of postinoculation. However, the number increased at the start of egg-laying and this tendency lasted four weeks. Thereafter, the number decreased and three or four weeks after the withdrawal of feed the number increased again. In Experiment 2, twenty-four 15-week-old chickens were divided into two groups, one group treated with vitamin compound (calcium pantothenate, vitamin V 2, vitamin V 6, and nicotinamide) throughout the experiment, the another was kept as a control. Both groups were inoculated with 10^9 CFU of SE Hy-1 Rif orally. The number of chickens shedding SE increased together with the start of egg-laying in both groups, suggesting that vitamin compound was not effective. The decrease in the number of CD 4- and CD 8-positive lymphocytes in peripheral blood was observed one week before and one week after the start of egg-laying in both groups. These findings suggested that stress affected start of egg-laying, and as the number of lymphocytes decreased the number of chickens shedding SE increased

(J. Jpn. Soc. Poult. Dis., **33**, 160-165, 1997)

Key words : laying eggs, *Salmonella*, shedding, stress, vitamin compound