

## 輸入ひなからのSalmonella Enteritidis分離例

誌名	鶏病研究会報
ISSN	0285709X
著者	柳本, 淳子 柏原, 裕 小城, 俊雄
巻/号	34巻3号
掲載ページ	p. 164-168
発行年月	1998年11月

## 輸入ひなからの *Salmonella* Enteritidis 分離例

柳本淳子<sup>1)</sup>・柏原 裕・小城俊雄<sup>2)</sup>

奈良県家畜保健衛生所，〒639-2204 奈良県御所市南十三 152-1

<sup>1)</sup> 現：奈良県畜産試験場，〒633-2113 奈良県宇陀郡大宇陀町下竹

<sup>2)</sup> 現：奈良県農林部畜産課，〒630-8501 奈良県奈良市登大路町

### 要 約

当所管内輸入ひな検査場所に係留中のブロイラー種鶏のひな（生産地フランス，雄 110 羽，雌 1,099 羽）の肝臓から，*Salmonella* Enteritidis (SE) を分離した。係留中の死亡ひな 10 羽中 2 羽に肝被膜炎，心外膜炎，気嚢炎を認めたが，群全体の活力は良好で，増体も順調であり，死亡率は 0.8% にとどまった。解放を延期し，16 日目に鑑定殺ひな 3 羽の主要臓器とクロアカスワブ，飼養環境由来試料を培養したところ，肝臓，脾臓，肺，腎臓，クロアカスワブ，敷料，使用中の餌から SE を分離したので，20 日目に全羽自衛殺とした。保菌状況をみるため，淘汰ひな 110 羽の肝臓および盲腸を培養したところ，肝臓については 25 羽，盲腸については 10 羽から SE が分離された。分離株は 55 Kb のプラスミドを保有し，ファージ型は 4 型であった。自然感染した初生ひなでの，ほとんど無症状に経過した興味深い症例であった。

キーワード：ファージ型 4, *Salmonella* Enteritidis, 輸入検査ひな

### 緒 言

SE による食中毒は世界的に急増しており，社会的に大きな関心を集めている。また，原因食品として，鶏卵，鶏肉の関与が指摘され養鶏業界に深刻な影響を与えた。*Salmonella* Enteritidis (SE) は，ひな白痢菌や *S.* Typhimurium (ST) とならんで，組織への侵襲性が強く卵巣や卵管へ侵入し卵卵感染を生じる<sup>3)</sup>。それゆえに SE の感染を防ぐため保菌種鶏群の摘発淘汰を徹底することが重要で，原種鶏や種鶏群の大部分を海外に依存しているわが国では，輸入ひなの検査を強化し，海外からの汚染鶏の導入を阻止しなければならない。輸入ひなは 2 週間の検査期間を経て国内に導入される。1988～1989 年に英国からの輸入ひなの検査中に SE 感染症が発生し，投薬治療後，解放されたが，その後，これらの種鶏群から生産されたコマーシャルひなにも SE 感染症の発生が報告された<sup>1)</sup>。このような状況から，農林水産省は，1991 年 11 月にひなの輸入検査強化を図り，係留中に SE や ST などのサルモネラが検出されたひなは淘汰あるいは返却処分することとした<sup>2)</sup>。

以下，1996 年 11 月に当所管内検査場所に到着した輸入ひなから SE が分離され，自衛殺処分を行った経過の

1998 年 3 月 2 日受付

鶏病研報 34 巻 3 号，164～168 (1998)

概要を報告する。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 検査材料

検査材料は，フランスより輸入されたブロイラー種鶏の初生ひなで，1,209 (雄 110 羽，雌 1,099 羽) が，1996 年 11 月 30 日に検査場所に到着した。

3 日目までの死亡ひなの細菌検査は，肝臓，心臓，胆汁，卵黄嚢を用いた。各臓器は，2 日目までの死亡ひな 5 羽分，3 日目の死亡ひな 5 羽分をそれぞれ 1 プールとした。

16 日目に解放を延期し，各ブルーダー（雌群 1，雌群 2，雄群）それぞれ 1 羽のひなの主要臓器（脳，気管，肺，心臓，そ嚢，筋胃，肝臓，脾臓，盲腸，腎臓）とクロアカスワブ，敷料，飲料水，使用中の餌，未使用の餌について培養検査を行った。クロアカスワブは各雌群より 20 羽，雄群より 10 羽を採材しそれぞれ 10 羽分を 1 プールとした。また，ブルーダーごとに敷料，飲料水，および使用，未使用の餌についてもそれぞれ 25 g ずつ供試した。

20 日目の自衛殺ひなでは，各雌群より 50 羽，雄群より 10 羽の肝臓，盲腸について保菌状況を調査した(表 1)。

#### 2. 細菌学的検査

ひなの臓器など試料の約 10 倍量のハーナテトラチオ

表 1. 検 査 材 料

到着後日数		供試材料										
到着日	死亡ひな	(雌) 2羽	}	心臓	肝臓	胆汁	卵黄囊					
1日目	死亡ひな	(雌) 1羽										
2日目	死亡ひな	(雌) 2羽										
3日目	死亡ひな	(雌) 4羽 (雄) 1羽		心臓	肝臓	胆汁	卵黄囊					
16日目	鑑定殺ひな	(雌群1) 1羽	脳	気管	肺	心臓	嚙嚢	筋胃	肝臓	脾臓	盲腸	腎臓
		(雌群2) 1羽	脳	気管	肺	心臓	嚙嚢	筋胃	肝臓	脾臓	盲腸	腎臓
		(雄) 1羽	脳	気管	肺	心臓	嚙嚢	筋胃	肝臓	脾臓	盲腸	腎臓
		クロアカスワブ (雌群1) 10羽×2検体 (雌群2) 10羽×2検体 (雄) 10羽×1検体										
	敷料, 飲料水, 使用中餌, 未使用餌	(雌群1) 25g (雌群2) 25g (雄) 25g										
20日目	自衛殺ひな	(雌群1) 50羽		肝臓	盲腸							
		(雌群2) 50羽		肝臓	盲腸							
		(雄) 10羽		肝臓	盲腸							

ネット培地 (HTT) (日水) に接種し 42°C 24 時間増菌培養した。また、敷料、飲料水および餌は、それぞれ 25g を約 9 倍量の EEM ブイヨン培地 (日水) に接種し、ストマッカーで乳剤とした。37°C 24 時間前増菌培養後、その 1ml を HTT 10ml に接種し、42°C 24 時間培養した。分離培養は、増菌培養終了後の HTT の 1 白金耳を 20  $\mu\text{g/ml}$  ノボピオシン加 DHL 寒天培地 (日水) に接種し、37°C 24 時間培養した。サルモネラの同定は TSI 培地 (日水)、LIM 培地 (日水) で行い、血清型別にはサルモネラ診断用免疫血清 (デンカ生研) を使用した。O 免疫血清によるスライド凝集反応を行い O 抗原を決定し、H 免疫血清による試験管凝集反応を行い H 抗原を決定した<sup>3)</sup>。

分離菌の薬剤感受性試験は、一濃度ディスク法によりアミノベンジルペニシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、トリメトプリム・スルファメトキサザール (ST)、オフロキサシン (OFLX)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM) について実施し、感受性、中間、耐性の 3 段階評価した。

プラスミドプロファイルテストは Kado と Liu の変法に準じて行った<sup>2)</sup>。分離サルモネラを、ハートインフュージョン寒天培地 (日水) で 37°C 24 時間培養した後、DNA を抽出し、0.7% アガロースゲル中で電気泳動を行った。また、フェージ型別は、国立感染症研究所に依頼した。

### 3. 病理学的検査

20 日目のひなについて、肝臓を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し常法に従って、包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、鏡検した。また免疫組織学的検査はヒストファイン SAB キット (ニチレイ) およびサルモネラ O9 免疫血清 (デンカ生研) を用いて実施した。

## 成 績

### 1. 発生状況

検査場所内では、各ブルーダーは、高さ約 45 cm の金属板で囲われていた。また雄と雌の間は高さ約 90 cm の金網で仕切られていた。9 日目には、雌群 1 と雌群 2 は、板を飛び越え行き来していた。

虚弱死亡ひなは到着後 3 日目までの計 10 羽であり (表 2)、目立った臨床症状は呈していなかったが、「輸入初生ひなのサルモネラ検査要領」の規定に従い、20 日目に自衛殺処分を行った。係留期間中のひなの活力は順調で、過去 3 年間当検査場所で検疫をうけ、解放された他のブロイラーのひな 5 群の成績と比べると、1 日増体重は 3 番目に良好であった。また、死亡率は 0.8% で過去 3 年間の成績の中では最も低かった (表 3)。

### 2. 剖検所見

3 日目に死亡したひな 5 羽のうち、雌 2 羽において肝被膜炎、心外膜炎、気嚢炎を認めたが、2 日目までの死亡ひな、および 16 日以降の鑑定殺、自衛殺ひなについては、特に異常は認めなかった。

表 2. 発生経過

成績	到着後日数						
	到着日	1	2	3 …	16 … 20		
死亡数	雌	2	1	2	4	2	全羽自衛殺 3 (鑑定殺)
	雄	0	0	0	1	1	
	計	2	1	2	5	3	
病理所見	特異所見なし			肝被膜炎 心外膜炎 気嚢炎	特異所見なし		
SE分離	心臓	—	—	—	—	—	NT
	肝臓	—	—	+	+	+	+
	胆汁	—	—	—	—	NT	NT
	卵黄嚢	—	—	—	—	NT	NT

表 3. ブロイラーの育すう成績 (到着～14日)

入すう年月	1日増体重(g/日)	死亡率(%)
1994. 9	12.0	1.4
1994. 11	12.6	1.4
1995. 5	10.8	2.1
1995. 7	14.1	1.1
1996. 6	16.3	2.2
1996. 11 (本事例)	13.5	0.8

3. 細菌学的検査

2日目までの死亡ひな5羽分の肝臓、心臓、胆汁および卵黄嚢からサルモネラは分離されなかった。3日目に死亡したひなの肝臓からサルモネラが分離され、サルモネラ免疫血清によりO抗原は9群、H抗原は1相性でGとmに凝集したので分離菌をSEと同定した。16日目の検査では、陽性は雌群2に限られ、肺、肝臓、脾臓、腎臓、クロアカスワブ、敷料および使用中の餌からSEを分離した(表4)。20日目の自衛殺ひなについては、雌群2のブルーダーで最も多く分離され、盲腸(8/50)よりも肝臓(23/50)において分離率が高かった。雌群1のブルーダーでは盲腸、肝臓ともに50羽中2羽から分離された。また雄群からは分離されなかった(表5)。

4. 病理組織所見

SEが肝臓から分離された20日目のひな4羽の肝臓の病理組織検査では、特に異常は認めなかったが、SAB染色による免疫組織検査では、4羽ともO9群抗血清に対する陽性抗原を肝細胞質内に多数認めた(写真1)。

表 4. SE分離成績(16日目)

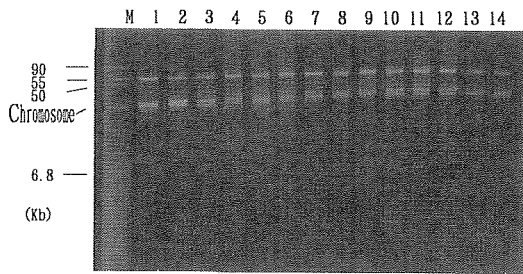
検体	雌群1	雌群2	雄群
脳	—	—	—
気管	—	—	—
肺	—	+	—
心臓	—	—	—
嚙嚢	—	—	—
筋胃	—	—	—
肝臓	—	+	—
脾臓	—	+	—
盲腸	—	—	—
腎臓	—	+	—
クロアカスワブ	0/2	1/2	0/1
敷料	—	+	—
飲料水	—	—	—
使用中餌	—	+	—
未使用餌	—	—	—

表 5. SE分離成績(20日目)

検体	雌群1	雌群2	雄群
肝臓	2/50	23/50	0/10
盲腸	2/50	8/50	0/10
計	3/50	28/50	0/50

5. 薬剤感受性試験成績

薬剤感受性試験では、ABPC、CEZ、OTC、CP、ST、OFLXに対して感受性であり、KM、SMに対しては中間であった。



1: 肺由来 2~5: 肝臓由来 6: 脾臓由来 7: 腎臓由来 8: クロアカスワブ由来 9: 敷料由来 10: 使用中餌由来 11~14: 盲腸由来 M: SE (55 Kb), ST (90 Kb), SC (50, 6.8 Kb) 混合

図 1. プラスミドプロファイル

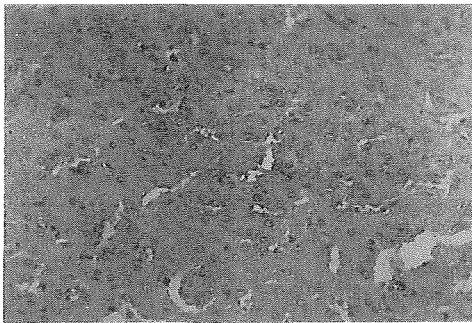


写真 1. SAB 染色  
肝細胞質内にサルモネラ O9 群の抗原を認める

6. プラスミドプロファイルテストおよびファージ型  
プラスミドマーカーとして SE, ST, *Salmonella* *Choreraesuis* の混合試料と比較したところ, 55 Kb の位置にバンドを認めた (図 1)。

また, ファージ型は 4 型であった。

### 考 察

SE は, 食中毒の原因として公衆衛生上重要な問題となっている。鶏に対する病原性はひな白痢菌ほど強くなく, いわゆる鶏パラチフスの原因のひとつとして位置づけられている。成鶏に感染すると不顕性に経過することが多いが, 幼ひなが自然感染すると下痢や敗血症を起こし, 死産率 2~3%, 発育不良などが認められている<sup>8)</sup>。しかし, 本症例では, 当検査場所で検疫した他のプロイラーひなと比較すると, 死亡率は 0.8% と低く, 増体重

も順調であった。また, 肝臓の病理検査では, 免疫染色で肝細胞質内にサルモネラ O9 抗原を多数認めたにもかかわらず, 病理学的には特に異常は認めなかった。これらのことから, 今回分離された SE はひなに対して病原性が低いことが示唆された。

SE の気道感染の可能性は以前から示されている<sup>6)</sup>。16 日目の陽性ひなでは, そ嚢や筋胃, 盲腸からは分離されずに肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓から分離された。また, 20 日目の雌群 2 では盲腸より肝臓で多く SE が分離された。これらのことから, ブルーダー内での広がり気道感染による可能性が示唆される。北川らや富田らの報告にも同様に, 盲腸よりも肝臓での分離率が高かったという成績がある<sup>4,10)</sup>。盲腸での菌分離率の低い症例の存在を考慮した検査部位の選択や検査試料数の選択が必要と思われる。

従来からサルモネラに介卵感染したひなの多くは 7 日齢頃までに死亡することが認められている<sup>1,5,8)</sup>。今回は到着後 3 日目に死亡し, サルモネラ感染にしばしば認められる肝被膜炎, 心外膜炎などの病変を示しているひなの肝臓から SE が分離されているので, 介卵感染が強く疑われる症例と思われる。しかし, 2 日目までの死亡ひなからは SE が分離されなかったことから, 今後の輸入ひなの検査には, 盲腸や糞便などにおける少数菌の分離方法として, 遅延二次増菌培養法が有用であると思われる<sup>7)</sup>。また, ひな発送前における抗菌剤など投与により菌検査が妨害されることも考慮し, 検査材料について抗菌剤などの存在を調べることも必要と思われる。このことについては WHO のサルモネラ検査ガイドラインにおける種鶏初生ひなの検査方法の項でも指摘されている<sup>11)</sup>。

原種鶏や種鶏を海外からの輸入に依存しているわが国では, サルモネラを保菌した種鶏が一旦国内に入ると, 感染鶏は元の 30 倍以上に拡大するといわれている。本症例のように死亡率が低く, ほとんど無症状のひなであっても保菌していることがあり, 水際での慎重な対応が必要であることを痛感した。

稿を終えるにあたり, ファージテストを実施していただいた国立感染症研究所寺島淳先生に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 市原 譲ら: 輸入ひなの検疫と *Salmonella choleraesuis* subs. *choleraesuis*, serovar Enteritidis (S. Enteritidis) 感染症の発生例. 鶏病研報 27 (増刊号), 7-12 (1991)
- 2) Kado, C, L and Liu, S, T: Rapid procedure for detection and small plasmids. J. Bacteriol. 145, 1365-1373 (1981)

- 3) 鶏病研究会： *Salmonella* と *Campylobacter jejuni* の検査法。鶏病研報 28, 55-66 (1992)
- 4) 北川 久, 松馬定子：ウインドウレス鶏舎におけるサルモネラ汚染事例。鶏病研報 32 (増刊号), 15-21 (1996)
- 5) 中村政幸：鶏のサルモネラ症—特にサルモネラ・エンテリティディス感染について—。動生協学会報 24, 1-12 (1991)
- 6) 中村政幸：鶏のサルモネラ感染と環境要因。鶏病研報 30 (増刊号), 15-23 (1994)
- 7) 中村政幸ら：盲腸内容からのサルモネラ分離培養法の検討。鶏病研報 33, 143-151 (1997)
- 8) 佐藤静夫：鶏のサルモネラ症 (Avian Salmonellosis)。鶏病研報 29, 240-241 (1994)
- 9) 佐藤静夫：安全な鶏卵の生産・流通をめぐる内外の情勢。鶏病研報 32 (増刊号), 1-8 (1996)
- 10) 富田文博ら：ブロイラーに発生した *Salmonella* Enteritidis 感染例。鶏病研報 21, 22-26 (1993)
- 11) WHO: 2.2 *Salmonella* monitoring in breeder (parent) flocks. p. 9, In. Guidelines on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference to *Salmonella* Enteritidis. (Wray, C. and Davies, R.H. eds), Report of WHO consultation strategies for detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks. Graz, Austria, 11-15 April 1994, WHO/Zoon./94. 173, (1994)

---

## Isolation of *Salmonella* Enteritidis from Imported Chickens

Atsuko Yanagimoto<sup>1)</sup>, Yutaka Kashiwara and Toshio Kojo<sup>2)</sup>

Nara Prefectural Livestock Hygiene Service Center,  
152-1 Minamijuso, Gose, Nara 639-2204

<sup>1)</sup> Present address : Nara Prefectural Livestock Experiment Station,  
Shimotake, Ouda, Uda, Nara 633-2113

<sup>2)</sup> Present address : Livestock Division of Nara Prefectural Government,  
Noboriojicho, Nara, 630-8501

### Summary

*Salmonella* Enteritidis (SE) was isolated from the liver of imported chickens (produced at France, male ; 110, female ; 1,099) in the quarantine concerned. Periphepatitis, pericarditis and airsacculitis were observed from 2 of 10 chickens died, but other chickens showed normal growing and death rate was only 0.8%. The release of chicken was postponed and on the 16th day main organs of 3 chickens, cloaca swab, and environment samples were cultured. SE was isolated from liver, spleen, lung, kidney, cloaca swab, litter, and feed. On the 20th day all chickens were killed. In bacteriological test of the liver and cecum of 110 chickens. SE was isolated from 25 liver and 10 cecum. SE had a 55 kb plasmid and phage type was 4 type. Almost no symptom of salmonellosis was observed in this case of young chickens.

(J. Jpn. Soc. Poult. Dis., 34, 164-168, 1998)

Key words : *Salmonella* Enteritidis, Imported chickens, SE phage type 4