

14. ひな白痢検査で摘発された*S. Schwarzengrund*とその清浄化への取り組み

宇佐家畜保健衛生所

○ (病鑑) 長岡 健朗、病鑑 滝澤 亮、甲斐 千佳子、(病鑑) 泉 修平

1. はじめに

サルモネラ属菌は、動物の腸炎や人の食中毒等の原因として家畜衛生および公衆衛生上重要な細菌である。今回、管内1農場においてひな白痢急速凝集反応(RST)陽性を示す事例に遭遇し、*Salmonella Schwarzengrund* (SS) が分離された。その概要と清浄化への取り組みを報告する。

1. 菌分離の経緯

当該A農場はチャンキー種鶏を約1万羽飼養する開放鶏舎の農場である。

平成23年4月21日に定期のひな白痢検査を実施したところ、約2割が陽性を示し、さらに4日後に農場において再検査を実施したところ、約3割が陽性を示した。そこで鶏卵のサルモネラ総合対策指針に基づき、抗体陽性鶏25羽についてサルモネラ保菌鶏の検査を実施した(表1)。細菌分離検査では、臓器では脾臓および肝臓からSSが分離され、25検体中11検体で分離陽性であった。盲腸内容物を検査した16検体では7検体が分離陽性であり、総計25検体中17検体で分離陽性であった(表2)。SSは09型であるひな白痢菌とは異なる04型のサルモネラであるが共通の抗原因子を持つため交差反応が生じたものと思われた。

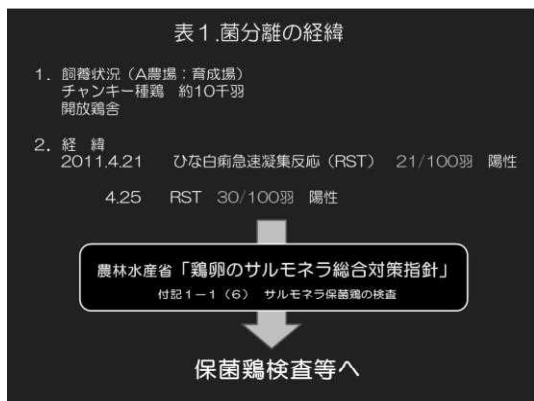


表2. 菌分離検査成績 ■: *S. Schwarzengrund* 分離

検体 No.	鶏舎番号	総合	盲腸内容物	臓器	直接培養				増菌培養				
					心臓	肝臓	脾臓	腎臓	心臓	肝臓	脾臓	腎臓	
1	3号	+	N/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2		+	N/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		+	N/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4		+	N/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5		-	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6		-	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7		+	N/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8		+	N/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		+	N/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
分離率		17/25	7/16	11/25									

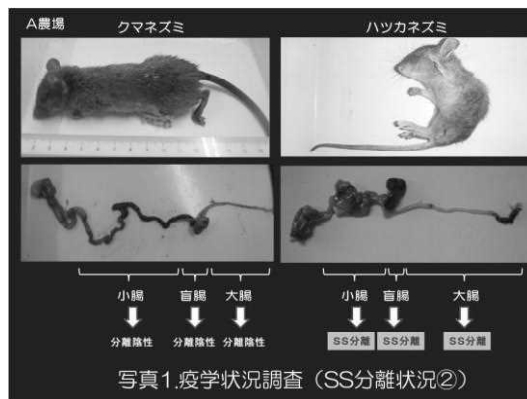
2. 清浄化への取り組み

(1) 疫学状況調査: A農場は育成場であり、当該鶏群はひな白痢検査後、B農場に移動された。移動後のB農場における鶏舎環境の検査では24検体中6検体でSSが分離された。A農場の近隣農場であるC農場(直線距離約500m)およびD農場(直線距離約300m)での検査ではB、C、D各農場の環境からSSが分離された(表3)。

また、A農場で捕獲したクマネズミ、ハツカネズミそれぞれ1匹からサルモネラの分離を試みたところ、クマネズミからはサルモネラは分離されなかったが、ハツカネズミでは、消化管の各部位（小腸、盲腸および大腸）からSSが分離された（写真1）。

表3.疫学状況調査（SS分離状況①）

農場名	鶏舎番号	分離結果
B農場 (当該鶏群が移動)	1	2/12
	2	4/12
	計	6/24
C農場 (A農場近隣500m)	1	1/4
	2	0/4
	3	0/4
	計	1/12
D農場（休止中） (A農場近隣300m)	1	0/2
	2	0/2
	3	0/2
	4	1/2
計	1/8	



各農場で分離されたSSの性状を比較する目的で薬剤感受性試験を実施した。各株とも類似した薬剤感受性パターンを示したが、C農場で分離された株のみアンピシリン耐性であり、他の農場で分離された株とは異なった（表4）。

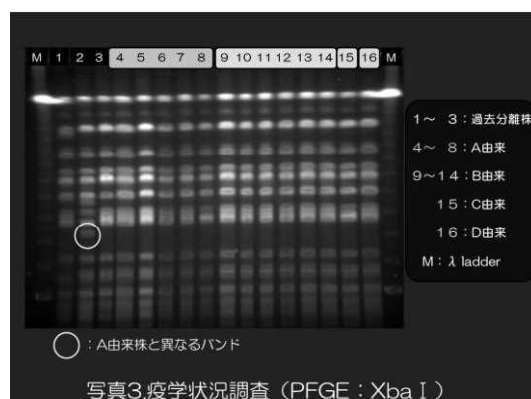
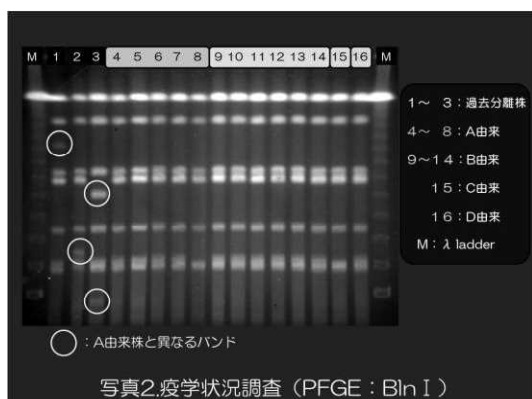
表4.疫学状況調査（抗生物質感受性試験）

農場・菌株名	ABPC	AMPC	CEZ	KM	SM	EM	OTC	OFLX	NFLX	CP	CL	NA	LCM	SMX/TMP
A	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
B	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
C	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
D	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
2009株	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
2010株-1	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S
2010株-2	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S

※S：感受性、I：中感受性、R：耐性

次にこれら各農場からの分離株をパルスフィールド電気泳動法（PFGE）で比較した。制限酵素Bln I を用いた切断パターンを比較すると過去に別の事例で分離されたSSでは、株毎に特徴的なバンドが見られたが、今回の分離株はすべて同じパターンを示した（写真2）。制限酵素Xba I を用いた切断パターンを比較すると対照株の2010年-1株（レーン2）で他とは異なるバンドが見られたが、他の菌ではいずれも同じパターン

を示した（写真3）。



薬剤感受性パターンおよびPFGEパターンを総括するとA農場、B農場およびD農場由来株は、いずれの検査でも差異が認められなかった（表5）。D農場はA農場から距離も近く、またA農場でのひな白痢検査実施約1か月前に経営を休止しているため、D農場からネズミ等の移動があり菌が持ち込まれた可能性も考えられた。

表5.疫学状況調査まとめ

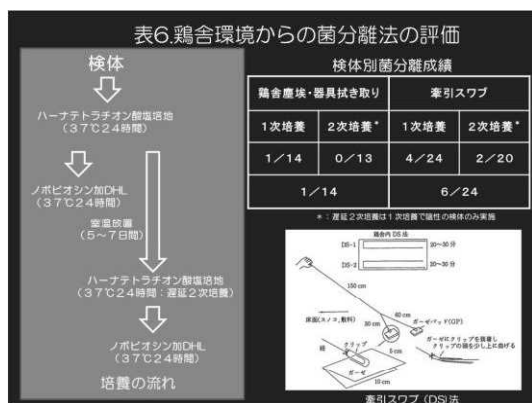
農場・菌株名	薬感パターン	PFGE型	
		Bln I	Xba I
A	I	1	a
B	I	1	a
C	II	1	a
D	I	1	a
2009株	I	2	a
2010株-1	I	3	b
2010株-2	III	4	a

（2）検査法の検討

SS清浄化を進めていく上で行う検査法を検討した。まず菌分離のための検体採取法を検討した。菌分離はすべて表6左側に示したようにハーナテトラチオン酸塩培地で増菌した後ノボビオシン加DHL寒天培地で行った。最初の培養で菌が分離されなかった検体についてはハーナテトラチオン酸塩培地を5～7日間室温放置した後、遅延二次培養を行った。

検体採取法としては綿棒で鶏舎塵埃や器具を拭き取ったものと牽引スワブ（以下DS法）との比較を行った。DS法の概要は表6右下に示した。

拭き取り法では1/14検体の分離率であったのに対して、DS法では6/24検体で分離された（表6中の表）。このことから、以後、菌分離はDS法によって行うこととした。DS法は鶏舎全面を引いて回るだけであるため、農場従業員等の人でも間違いなく採材でき、今後検査を継続していく上でも有利であると考えられた。

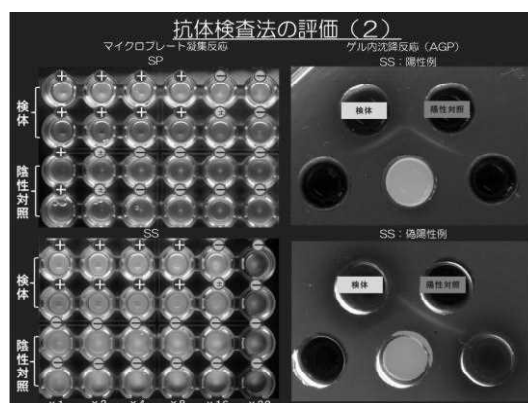


次に個体毎の汚染度を調べるため行う抗体検査法について検討を行った。

検討はRST、RSTと同じく有用とされている試験管凝集反応を簡便化したマイクロプレート法、およびゲル内沈降反応について行った。抗原には市販ひな白痢抗原、および分離SSを同様に処理した抗原を使用し、定量的に感度を調べるため、SS分離陽性鶏の血清12検体を2倍段階希釈し、それぞれの方法で検査した。マイクロプレート法とRSTとでは検体毎に概ね同様な傾向が見られたが、感度はマイクロプレート法の方が8~16倍高かった。一方、ゲル内沈降反応では抗原にSSを用いるとマイクロプレート法に遜色ない感度が得られた(表7)。しかし、マイクロプレート法では陰性対照でも凝集が見られることもあり、またエンドポイントも見にくい傾向にあった(写真4左)。一方、ゲル内沈降反応では陽性コントロールとの沈降線のつながり具合から陽性と偽陽性が区別できるという利点があった(写真4右)。SS抗原を用いたゲル内沈降反応は感度、特異性両面で優れていると考えられたので以後の検査にはSS抗原を用いたゲル内沈降反応を用いることとした。

表7. 抗体検査法の評価 (1)

検体番号	急速凝集反応 (RST)				マイクロプレート凝集反応 (MPA)				ゲル内沈降反応 (AGP)					
	x1	x2	x4	x8	x16	x32	x64	x1	x2	x4	x8	x16	x32	x64
SP	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SS	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



(3) 投薬および検査

表8にSS清浄化のために実際に行った対応を示した。まず、鶏群に対しては抗生物質(アンピシリン30mg/kgB.W.)の投与、通常使用している生菌製剤(サルトーゼ)の増量 および殺鼠剤によるネズミの駆除を行った。

SS汚染状況を把握するためには環境からの菌分離および抗体検査を行い、さらにSS

が分離された時には、アンピシリンの継続使用の可否を判断するために分離菌の薬剤感受性試験を行った。

また、最終生産物であるひなに汚染がないことを確認するために、発生ひなの清浄性確認検査を行った。最初に発生したひなについては商品にならないため、全個体の抗体検査と盲腸内容物からの菌分離を行い、以降に発生したひなについてはロット毎で胎便をプールしたのものについてハーナテトラチオン酸塩培地で増菌した後、DHL寒天培地、SS寒天培地およびESサルモネラⅡ寒天培地に接種して菌分離を行った。

表8.清浄化・清浄性確認のための対応

1. 鶏群に対する措置
 - 1) 抗生物質（アンピシリン）投与（30mg/kg、3日間）
 - 2) 生菌製剤（サルトーゼ）増量
 - 3) ネズミの駆除
2. SS汚染状況の把握
 - 1) 環境からの菌分離および抗体検査
 - 2) 分離菌薬剤感受性試験
3. 発生ひなの清浄性確認
 - 1) 最初発生ひなの抗体検査（SSゲル沈）および盲腸内容物の菌分離（ハーナテトラチオン酸塩培地→N-DHL、5検体ずつプール）
 - 2) 発生ひな各ロットでの菌分離（胎便プール）（ハーナテトラチオン酸塩培地→DHL、SS、ESサルモネラⅡ）

表9に環境からの菌分離および抗体検査の成績を示した。菌分離は、6月1日の検査で8/24例、6月27日の検査で6/24例で陽性であったが、最初の摘発から約4か月後の8月24日での検査ではすべて陰性となった。抗体検査では、最初の摘発から約2か月後の6月27日の時点ですべて陰性であった。同群からの最初発生ひなでの抗体検査では2/185検体で陽性であり、それらひなが卵として産まれた6月中旬では種鶏群も同程度の抗体保有状況であったものと思われた。

表9.環境からの菌分離および抗体検査結果

月 日	4.21	4.25	6.1	(6月中旬)	6.27	8.24	10.13
抗体検査 (SSゲル沈)	46/96 48%	n/a	n/a	2/185 1%	0/40 0%	0/40 0%	0/40 0%
環境菌分離 (DS法)	n/a	n/a	8/24 33%	n/a	6/24 25%	0/24 0%	0/24 0%
備考	SP RST 21/100 陽性	SP RST 30/100 陽性	ひな群内感染による検査 (7月28日発生)				
	A農場			B農場			

各時期に分離されたSSの薬剤感受性を調べたところ調査期間を通じて、薬剤感受性には顕著な変化は認められなかった（表10）。

また、発生ひなの菌分離の成績では、検査したすべての検体でサルモネラ菌は分離されなかった（表11）。

表10.菌分離の薬剤感受性

製剤名	4月25日分離			5月1日分離			5月27日分離		
	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3
ドキシサイクリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
エリスロマイシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
エンロフロキサシン	30	28	28	30	28	28	28	30	28
オキサメシリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
アンピシリン	15	19	14	16	19	19	14	17	15
ゲンタマイシン	18	17	20	20	18	20	18	18	18
リンコマイシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ペニシリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ストレプトマイシン	10	11	11	10	11	10	11	11	11
SXT(5T食期)	12	13	14	20	21	21	19	20	18
オキシテトラサイクリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
テトラサイクリン	7	7	7	7	7	7	7	7	7

感受性 中間 耐性

表11.発生ひなの清浄性検査結果

1. 最初発生ひなによる検査 (H23.7.8発生)
 盲腸内容物からの菌分離 (5検体ずつプール)
 ……37検体すべて陰性
2. 発生ひな各ロットでの菌分離
 H23.7.25発生群から検査開始
 H23.11.11発生群まで28ロットすべて陰性

【まとめおよび考察】

管内1農場でのひな白痢検査で高率に陽性例が見られ、鶏卵のサルモネラ総合対策指針に基づき菌分離等の検査を行ったところ分離されたのは04群のSSだった。09群であるひな白痢菌とは血清型が異なるが、共通の抗原因子による交差反応によりRSTに反応したものと考えられた。ネズミや近隣農場からもSSが分離されており、近隣農場から持ち込まれた可能性も考えられた。抗生剤や生菌剤の投与およびネズミの駆除等の対策を行ったところ、当該鶏群からは約2か月後には抗体が検出されなくなり、約4か月後には、SSも分離されなくなった。

今回分離されたSSは偶然ひな白痢菌と共通抗原を持つためひな白痢検査時に摘発された。また、臓器から菌が分離されており、in egg感染でひなを汚染する懸念があるためサルモネラの清浄化対策を行った。その結果ひなへの汚染は防止でき、サルモネラ感染の早期摘発の重要性が示唆された。RSTのみでなく広くサルモネラを検出できる方法で早期に摘発し、万一サルモネラの侵入があっても早期に対策を行い得る体制を確率・維持することが重要である。従って、今後は当該農場の系列の他農場も含め、定期的にDS法によるサルモネラ検査を行う予定である。