

## 1 2 ひな白痢検査の非特異反応事例を発端とした農場衛生管理への取組

鳥取県西部家畜保健衛生所 ○朱夏希 長千恵

### 1 背景

サルモネラ (*Salmonella*) 属菌は食品を介した人の感染症の原因菌として公衆衛生分野で問題となる細菌の一つである。人の食の安全を守り、安定した畜産物の供給のために、鶏肉の生産段階の上流に位置する種鶏場では徹底した衛生管理によりサルモネラ属菌の清浄度を保持する必要がある。一方で、サルモネラ属菌はヒトの食中毒原因菌としてだけでなく、家畜や家禽の疾病の原因としても重要である。鶏における重要なサルモネラ感染症の一つとして *Salmonella Pullorum* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Pullorum* : 以下 SP) によるひな白痢が法定伝染病に定められており、感染鶏群の摘発及び清浄性の確認のため、種鶏を対象として全国的サーベイランスが実施されている。ひな白痢保菌鶏の診断には、ひな白痢抗原に対する平板凝集反応 (以下 RST) による抗体検査が一般的である。しかし、この検査は SP 以外のサルモネラ属菌の感染によっても非特異的に陽性を示すことが報告されている。

今回、当家保においてひな白痢 RST 検査の陽性農場が連続する事例に遭遇した。またその事例を発端として、サルモネラ属菌の侵入路となる問題点を改善し、農場衛生管理向上を達成することができたのでその概要を報告する。

### 2 発生概要

#### (1) A農場

A農場はチャンキー種の種鶏採卵場で、約1万羽規模の開放鶏舎(全3棟)であった。発生時は24週齢であり、サルモネラワクチンは未接種であった。平成27年4月22日の定期種鶏検査において1および2号棟でひな白痢 RST 検査陽性を示し(1分以内の強い凝集反応)、その陽性率は46%(60検体中28検体陽性)であった。これら陽性血清に対し寒天ゲル内沈降反応を実施したところすべて陰性であったため、ひな白痢は否定された。また同時に実施した糞便検査で *Salmonella Schwarzengrund* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Schwarzengrund* : 以下 SS) が分離された。SSはひな白痢 RST 検査に交差反応する事例が報告されていたことから、今回の陽性もSSが原因による非特異反応であると判断した。薬剤感受性試験の結果に基づき同鶏群にコリスチンを投与したところ、翌月に RST 検査は陰転した。

#### (2) B農場

B農場はチャンキー種の種鶏採卵場で、約1万羽規模の開放鶏舎(全3棟)であった。発生時は25週齢であり、サルモネラワクチンは未接種であった。平成27年7月27日の定期種鶏検査において1および2号棟でひな白痢検査陽性を示し、その陽性率は50%であった(60検体中30検体陽性)。(1)の事例と同様に寒天ゲル内沈降反応によりひな白痢は

否定したが、糞便検査においてサルモネラ属菌は検出されなかった。原因菌が特定されなかったため投薬を行わなかったところ、翌月も RST 検査陽性が遷延した。

A 農場に続いて B 農場にもサルモネラ属菌の侵入が疑われたことで、今後もさらに続発する可能性が有り、また発生農場に対する投薬などの事後対応では汚染拡大を抑制できないと考えられた。侵入路の清浄化など根本的解決が必要であると判断し、原因究明のため疫学状況調査および、鶏舎環境等の関連ヶ所におけるサルモネラ属菌の定性検査（以下環境検査）を実施した。

### 3 疫学状況調査

種鶏場管理者および同会社に対し発生状況について聞き取りを行い、発生要因の分析を行った。

#### (1) 地理的状況

同会社は種鶏場を鳥取県西部地域に 7ヶ所保有し、A, B, C, D および E 農場の 5ヶ所が採卵場、F および G 農場の 2ヶ所が育成場であった（図 1）。種鶏は育成場に入雛し、21 週齢前後に採卵場へ同会社所有のトラックにより移動していた。各種鶏場における飼養衛生管理は遵守されており、部外者に対して立ち入り簿の記帳、逆性石けんによる車両消毒が行われていた。今回発生があった A 農場と B 農場はそれぞれ別の地域にあり（直線距離にして約 50km）、飼養者の交差は無かった。また A 農場は F 育成場から、B 農場は G 育成場から移動してきており、育成場段階での関連は無かった。



#### (2) 時期的状況

A および B 農場の鶏群は育成場段階から毎月検査を行っており、その結果を平成 27 年 2 月から 8 月まで図 2 に示した。A 農場の鶏群は 3 月末に、B 農場の鶏群は 6 月末に育成場から採卵場へ移動していた。ひな白痢 RST 検査が陽性を示したのは A 農場が 4 月、B 農場が 7 月と違ったが、それらは共に移動後初めての検査であることが共通していた。移動には同一のトラックが用いられており、移動と検査陽転のタイミングの一致することから、この移動トラックを発生要因として疑った。



### (3) 鶏移動用トラックについて

同会社が所有するトラックは種鶏移動用トラック（以下 T1）とブロイラー出荷専用トラック（以下 T2）の 2 種類あった。トラックは農場に出入りする際にタイヤ周りを中心に逆性石けんにより消毒されていた。また全てのトラックは業務終了後は水道水で洗車されたのち、同会社の野外駐車場で保管されていた。

## 4 環境検査

同会社が所有する種鶏場とその移動用トラックについて、サルモネラ属菌汚染の有無を確認するため「鶏卵のサルモネラ総合対策指針」に基づき環境検査を実施した。

### (1) 方法

種鶏場では、全 7 農場に対して鶏舎外周および鶏舎床の拭き取り（牽引スワブ法）、ネスト床と鶏移動用カゴの拭き取り（ガーゼパッド法）を行った。また敷料、塵埃、盲腸便の採取と、淘汰鶏の剖検および主要臓器採取を行った。トラックは T1（全 3 台中 3 台）、T2（全 9 台中 2 台）の荷台、タイヤ周り、運転席フロアマットに対するガーゼパッドによる拭き取り検査を行った。各検体は緩衝ペプトン水で 1 晩 37℃で培養した後（一次増菌）、増菌後のペプトン水 1mL に対してハーナテトラチオン酸液体培地（以下 HTT）9mL を加えさらに 1 晩 42℃で培養した（二次増菌）。増菌後の HTT から 1 白金耳すくい、ノボビオシン添加 DHL 培地（以下 N-DHL）に塗布し、1 晩 37℃で培養した。N-DHL 上に発育した黒色目玉焼き状定型コロニーに対して、性状確認検査（TSI 培地、LIM 培地、シモンズクエン酸培地）および診断用免疫血清によるためし凝集でサルモネラ属菌であることを確定した。サルモネラ属菌が検出されなかったサンプルについては、最初に増菌した HTT を 1mL 採取し新たな 9mL の HTT に加え、さらに 7～10 日間の遅延二次培養を行った。得られたサルモネラ属菌についてはサルモネラ免疫血清[デンカ生研]により O 群別および H 型別の同定を行った。また SS であった菌株については薬剤感受性試験（以下薬感）と、パルスフィールドゲル電気泳動法（以下 PFGE）による比較を行った。

### (2) 結果

環境検査によるサルモネラ属菌分離状況を表 1（種鶏場）および表 2（トラック）に示した。種鶏場の環境検査では、移動カゴは育成場である F および G 農場にのみ保管していた。D および G 農場は空舎であったため、可能であった部位のみ検査を行った。表 1 に示すとおり、B 農場の 2 号棟の敷料および塵埃から SS が分離された。また D 農場の鶏舎外周および 3 号棟のネストから *Salmonella* Seftenberg が分離された。B 農場の敷料から分離された SS を生食で濃厚に溶解し抗原液を作製し、7 月の B 農場の RST 陽性血清に対して直接凝集試験および寒天ゲル内沈降反応検査を行ったところ共に強い陽性を示した。トラックの拭き取り検査では、表 2 に示すとおり T1・T2 とともに運転席フロアマットやタイヤ周りから SS が分離され、SS 以外にも O8 群のサルモネラ属菌も分離された。

表1. 種鶏場の環境検査結果

農場	鶏舎	部位							
		鶏舎外	鶏舎床	ネスト	敷料	塵埃	盲腸便	移動カゴ	淘汰鶏
A	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
B	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	+(*)	+(*)	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
C	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
D (空舎)	1	+(*)	—	—	—	—	—	—	—
	2	+(*)	—	—	—	—	—	—	—
	3	+(*)	—	+(*)	—	—	—	—	—
E	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
F	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—
G (空舎)	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—

表2. トラックの拭き取り検査結果

部位	T1-1	T1-2	T1-3	T2-1	T2-2
運転席	+(*)	+(*)	—	+(*)、(*)	+(*)
タイヤ周り	—	+(*)	+(*)	+(*)	+(*)
荷台	—	—	—	+(*)	—

(+はサルモネラ属菌陽性を、—は陰性を、空欄は未実施をそれぞれ示す。分離されたサルモネラ属菌の血清型は次のとおり。(\*) O4 : d : 1,7 [*Salmonella* Schwarzengrund]、(\*) O1,3,9 : g,s,t : - [*Salmonella* Seftenberg]、(\*) O8 : b : H 型別未実施 )

薬感では A 農場の糞便、環境検査の B 農場、T1 および T2 トラックから分離された S S を比較した (表 3)。

ペニシリン系は A 農場の全株と、T2 の一株が耐性を示した。カナマイシン、オキシテトラサイクリン、ST 合剤ではほとんどの菌株が耐性を示し、ニューキノロン系の結果はばらつきが大きかった。コリスチンは全ての菌株で感受性を示した。

表3 SSの薬剤感受性試験

	AMPC	ABPC	CL	KM	OTC	ST	ERFX	OFLX
A	R	R	S	R	R	R	I	I
	R	R	S	R	R	R	I	R
	R	R	S	R	R	R	I	R
B	S	S	S	R	R	R	I	R
	S	S	S	R	R	R	I	R
T1	S	S	S	R	R	R	S	S
	S	S	S	R	R	R	I	I
T2	R	R	S	R	R	R	S	S
	S	S	S	R	S	I	S	I
	S	S	S	R	S	R	S	I

またこれらの菌株を PFGE の電気泳動型別で比較した結果を以下の図 3 (制限酵素 Bln I 処理) および図 4 (制限酵素 Xba I 処理) に示した。A 農場の 3 株は全て同じパターンを示し、また T2 トラック由来の 9, 10 番は同じパターンを示した。その他の株ではパターンの多様性が多く見られたが、B 農場由来の株 (4 番) と T1 トラック由来の株 (6 番) で高い相同性が見られた。

図3 PFGEパターン① (Bln I 処理)

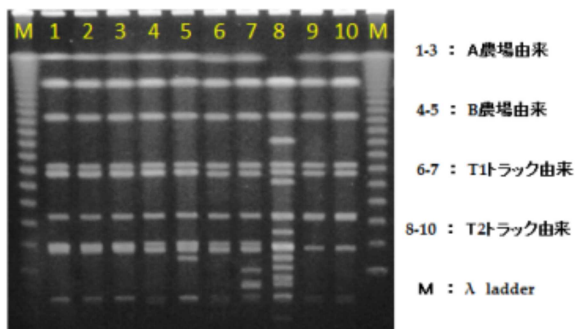
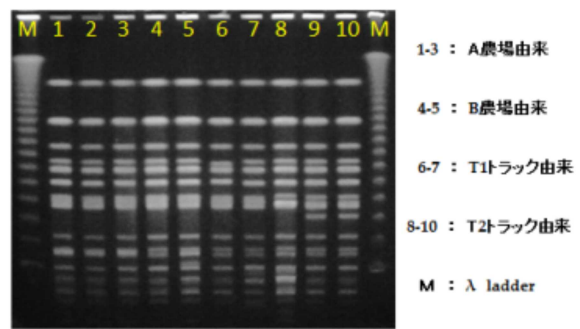


図4 PFGEパターン② (Xba I 処理)



### (3) 小括

以上の結果をまとめると、7月のひな白痢 RST 検査陽性は、B 農場の鶏群が S S に対する抗体を保有していたため、4月の A 農場と同様に非特異反応を起こしたものと考えられた。また種鶏移動用トラックに重度の SS 汚染があり、PFGE の結果や、疫学状況調査における農場移動と RST 検査陽転のタイミングの一致からも、トラックを介して S S が種鶏場に侵入していると強く疑われた。

## 5 清浄化対策とその結果

表4 清浄化に向けたその後の対応

- (1) B農場にコリスチンの飼料添加
  - 1ヶ月後RST陰性に
- (2) 衛生管理強化に向けた取り組み
  - ① 衛生管理の検討会
  - ② 勉強会
  - ③ 一斉消毒
  - ④ モニタリング

これらの調査結果をふまえて農場および同会社に対して行った対応を表4に示した。B農場のRST検査陽性の原因菌であると考えられたSSの清浄化のため、コリスチンを飼料添加したところ、翌月にRST検査は陰転した。また今回明らかとなったトラックの汚染清浄化のための衛生管理強化に向けた取り組みとして、①衛生管理に関する検討会②勉強会③一斉消毒④サルモネラ属菌のモニタリング検査を実施した。

図5 ①衛生管理の検討会



トラック運用の問題点	指導による改善
×種鶏専用ではない	△(すぐには難しい)
×車内消毒が不十分	○車内も実施 フロアマットも
×トラック専用長靴無し	○トラック専用長靴設置
×運転手が靴を替えずに 鶏舎まで入る etc...	○運転手の靴の履き替え orソーニングを徹底

図6 ②スタッフに対する勉強会



勉強会の様子

図7 ③家保立ち会いのもと一斉消毒



一斉消毒の様子

図8 ④モニタリング

SS分離陽性率の推移(種鶏移動トラック)

部位	9月	11月	12月
荷台	0/3	2/3	0/2
タイヤ周り	2/3	3/3	0/2
フロアマット	1/3	2/3	0/2



### ①衛生管理の検討会 (図5)

農場管理者と日頃のトラックの運用方法について検討を行った。日頃のトラックの洗浄消毒だけでは車内消毒が行えていないことや、種鶏移動用トラック(T1)が種鶏以外の農場に出入りすることがあること、運転手の長靴の管理が不十分であることが分かり、そ

れぞれ図 5 に示すように指導し改善を行った。

#### ②勉強会（図 6）

検討会で得られた改善点を全てのスタッフに浸透させるため家保職員による勉強会を行い、衛生管理区域や車両消毒の重要性について啓発した。

#### ③一斉消毒（図 7）

消毒方法の確認と汚染状況の初期化のため行ったでは、家保職員と農場スタッフが共同でタイヤ回りや運転席周りの消毒作業を行った（次ページ図 7）。また手指や靴の消毒のため車内にアルコールスプレーを設置した。

#### ④サルモネラ属菌のモニタリング検査（図 8）

改善指導の効果判定のため、種鶏移動トラックについて拭き取り検査を定期的に行った。9 月、11 月の検査ではトラックから SS が分離されていたが、12 月の一斉消毒後の検査では SS が分離陰性となった。また運転席フロアマットの改善や、定期的な洗浄消毒により、見た目にも清潔さが保たれていた。

これらの衛生指導を行った結果、12 月に G 育成場から C 採卵場へ移動のあった鶏群について 1 月に種鶏検査を行ったところ、すべてひな白痢 RST 検査は陰性となった。種鶏移動用トラックの汚染という農場外の原因にまで指導を広げることで、今回問題となっていた SS の種鶏場への侵入が続発することに成功し、清浄化できたと考えられた。

## 6 考察

今回、種鶏場でひな白痢 RST 検査陽性を呈する事例が続発した。糞便や鶏舎環境から SS を分離したことや、SS 抗原液を用いた検査により、それらは SS による非特異反応であると判断することが出来た。血清型による区分では SS は O4 群であり、SP は O9 群のサルモネラ属菌である。しかしそれぞれの群別の中にさらに細かい抗原因子が存在し、SS と SP ではそのような抗原因子に共通なものを持つ。鶏が SS に感染した際、それらの抗原因子をエピトープとして産生された抗体は、ひな白痢 RST 検査で用いる SP 抗原に対しても凝集能を有するため、非特異的な陽性として現れたと考えられる。

課題としては、今回汚染源として特定されたトラックがそもそもどこで汚染したか、またトラックからどのように鶏に感染したかは特定できなかった。凝集反応において迅速で大きな凝集塊を作る抗体は IgM であり、IgG はその抗原結合基の数や距離の特徴から IgM による凝集塊よりも小さいか、もしくは凝集が起りにくい。今回の事例で認められた凝集反応は迅速かつ大きな凝集塊を示すものであったことから IgM によるものと考えられるが、IgM は感染後 1～2 週間でピークを迎えた後減少する。A 農場、B 農場の事例においていずれもトラックによる移動から検査まで 1 ヶ月弱の間隔があること、B 農場ではさらに 1 ヶ月後にも陽性が遷延したこと、トラック接触時のみに感染があったのではなく、その後も移動先の農場において新たな感染が起こっていたと考えら

れる。そのような感染が起こる様式として、[1]トラックで感染した鶏からSSが排菌され他の鶏に広がっていった[2]移動時に鶏舎内に直接SSが何らかのルートで持ち込まれた（トラック運転手の長靴を介して）などが考えられるが、今回それらを特定するには至らなかった。サルモネラ属菌を媒介する要因としてネズミ類の小動物が挙げられるが、今回それらを十分数捕獲することが出来ず、検査を行えなかった。それらネズミ等から排菌が鶏群内のSS感染を維持していた可能性も考えられる。

口蹄疫や高病原性鶏インフルエンザなど社会的影響力の大きい疾病の防疫にも車両消毒の重要性が論じられているが、今回実際に車両が病原体に汚染されたことで農場内に問題が発生する状況を目の当たりにし、その重要性を再認識した。PEDや口蹄疫では運転席など車両内部の汚染が起こることが報告されているが、他の一般的な疾病についてはまだ汚染拡大防止に重要な消毒方法や部位に具体的な言及が少なく、今回のような車内汚染の可能性も含めて、効果的な消毒方法の検討が必要であることが示唆された。

今回疫学状況調査から種鶏移動用トラックを侵入路と疑い、検査の結果トラックのSS汚染を証明することが出来た。このようにひな白痢RST検査の原因としてトラックの汚染を摘発した例はこの報告が初めてであり、それにより具体的な改善および根本的な解決を為し得た。これらは定期種鶏検査という日頃のルーチンワークを発端としていたが、そのような検査の結果にも問題意識を持ち、一步踏み出して包括的な指導を行うことが重要であると感じた。

## 8 参考文献および発表

- ・ 渡邊理, 畑一志, 三木隆広ら(2000) 鶏病研究会報 36 巻 1 号 p.22-27  
「Salmonella Enteritidis 汚染が疑われた採卵鶏育成鶏群におけるひな白痢急速平板凝集反応の診断的活用」
- ・ 武平有里子, 前田寛之 (2007)  
「ひな白痢急速診断用菌液を用いたSE感染鶏の発見と検査方法の検討」
- ・ 長岡健朗, 滝沢亮, 甲斐千佳子, 泉修平(2011)  
「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」
- ・ 阿南華奈子, 渡邊拓一郎 (2014)  
「ひな白痢平板凝集反応検査で認められた非特異反応事例」
- ・ 鶏卵のサルモネラ総合対策指針  
(平成17年1月26日付け第8441号農林水産省消費・安全局衛生管理課長通知)