

5 種類の市販 Salmonella Enteritidis(SE) 不活化ワクチンの 採卵鶏における有効性評価

村野多可子

Evaluation of The Efficacy of Trials of Five Commercial Salmonella
Enteritidis(SE) Inactivated Vaccines for Laying Hens

Takako MURANO

要 約

国内で市販されている Salmonella Enteritidis (SE) 不活化油性アジュバントワクチン (SEOEV) 4 種類 (A、B、D、E) と、SE 不活化アルミニウムゲルアジュバントワクチン (SEKV) 1 種類 (C) の計 5 種類の SE 不活化ワクチンを用い、採卵鶏の腸管における SE 定着軽減効果に及ぼす影響について検討した。接種回数が異なる 5 種類の SE 不活化ワクチンをワクチン最終接種日が同一日齢となるように設定し、その 3 カ月後にリファンピシン耐性 SE ZK-2a x 株を経口接種により攻撃した。試験は同一方法で 2 回実施した。その結果、盲腸内容物からの分離菌数は試験 1 では A、D、E 群が、試験 2 では A、B 群が無接種群より明らかに低い値を示した ($p < 0.05$)。臓器中からの分離菌数は、肝臓は試験 1 で A、B 群が無接種群より明らかに低い値を示した ($p < 0.05$) が、試験 2 では有意な差はみられなかった。脾臓は肝臓と同様の成績を示した。卵巣、卵管漏斗部、卵管子宮部は試験 1、2 とも有意な差はみられなかった。

緒 言

Salmonella Enteritidis (SE) 汚染に起因する食中毒は、1989 年以降公衆衛生上大きな問題として取り上げられ、養鶏場においても徹底した衛生管理、SE ワクチンの使用、競合排除 (competitive exclusion : CE) 法、生菌剤の利用など様々な対策がとられ、ここ数年減少傾向にある。しかし、鶏卵を市販する店舗からの要望もあり、SE ワクチン接種率は増加している。現在、鶏用 SE 不活化ワクチンは 5 種類 (混合ワクチンを 1 種類含む) が市販化されている。これらワクチンは、アジュバント、接種方法、接種回数、接種部位なども異なる¹⁾。今回、この 5 種類のワクチンを用量・用法通り使用し、腸管における SE の定着軽減効果を検討した。

材料及び方法

1. 供試鶏とワクチン

白玉卵産出雌鶏のジュリア 84 羽を、2 回の試験にそれぞれ 42 羽用いた。

供試ワクチンは国内で市販されている Salmonella Enteritidis (SE) 不活化油性アジュバントワクチン (OEV) 4 種類 (A、B、D、E) と、SE 不活化アルミニウムゲルアジュバントワクチン (KV) 1 種類 (C) の計 5 種類を用いた。但し、OEV-E は SE と Salmonella Typhimurium (ST) の混合ワクチンである。42 羽の鶏を 7 羽ずつの 6 群に分け、5 種類の SE 不活化ワクチンを最終ワクチン接種日が同一日齢となるように接種した。試験 1 では、OEV-A を 173 日齢と 202 日齢に 0.5ml/羽 肩部皮下、OEV-B を 202 日齢に 0.5ml/羽 肩部皮下、KV-C を 173 日齢と 202 日齢に 0.5ml/羽 脚部筋肉内、OEV-D は 202 日齢に 0.3ml/羽 頸部中央部皮下、OEV-E は 202 日齢に 0.5ml/羽 頸部中央部皮下に接種し、残りの鶏群は無接種群とした。試験 2 では試験 1 と同様のワクチン回数、接種量、接種部位であったが、

接種した日齢はOEV-AとKV-Cは312日齢と340日齢、他のワクチンは340日齢であった。

2. 血清抗体価

SE攻撃前と解剖時に全ての試験鶏を対象に血清を採取した。採取した血清について直ちにひな白痢急速診断用菌液による平板凝集反応(RST)を実施した。また、採取した血清は-30℃に凍結保存し、試験終了時に今井ら²⁾の方法に準じたELISAにより抗体価を測定した。RSTの反応速度を数値として表現するため、スコア化した。すなわち、血清と診断液を混合した瞬間に凝集したものを4、15秒以内を3、16～30秒以内を2、31～60秒以内を1、61秒以上を0とした。また、ELISA(E)値は0.3以上を陽性とした。

3. 攻撃日と攻撃菌株

攻撃は2回の試験とも最終ワクチン接種3カ月後とした。用いた菌株はリファンピシン(rif)耐性SE ZK-2ax株(全農家畜衛生研究所より分与)で、試験は 2.4×10^8 CFU/0.5ml/羽、試験は 3.6×10^8 CFU/0.5ml/羽経口接種した。

4. 細菌学的検査

SE攻撃4日後の盲腸便、7日後には全羽数殺処分し菌分離を試みた。

(1) 盲腸便

SE攻撃4日後の早朝に排泄された盲腸便を個別に全羽数より採取し秤量後9倍量の滅菌生理食塩液を加え十分に混和した。これを原液として10倍段階希釈

を行い、それぞれの段階希釈液0.1mlをrif 50 µg/ml加DHL寒天培地(rif DHL)にコンラージ棒で塗抹し、生菌数を算出する(検出限界は100CFU/盲腸便1g)とともに、原液に9倍量の2倍濃度のハーナテトラチオン酸塩基礎培地(HTT,栄研)を加え、41.5℃、24時間増菌培養した。分離培地にはrifDHLを用い、37℃、24時間培養し、その結果コロニーの発育が認められた検体の菌数を100CFU/盲腸便1gとした。さらに遅延二次増菌³⁾(delayed secondary enrichment : DSE)を行い、コロニーの発育が認められた検体の菌数を10CFU/盲腸便1gとした⁴⁾。なお、発育コロニーは定法⁵⁾に従いサルモネラと同定した。

(2) 盲腸内容物

盲腸を無菌的に採取し、内容物をしごき出し秤量後、盲腸便と同様の方法で菌数の測定を実施した。

(3) 臓器

肝臓、脾臓、卵巣、卵管漏斗部、卵管子宮部を無菌的に採取し、9倍量のトリプトソイブイオン(TSB, ニッスイ)を加えた⁵⁾。その後は盲腸便と同様に菌数計算、24時間増菌培養、DSEを行った。24時間培養には9倍量のTSBを用いた。検出限界は盲腸便と同様にした。

5. 統計処理

SE分離菌数、ELISA抗体価については一元配置分散分析法、RSTによる抗体価、SE陽性率についてはFisherの直接確立計算法を用い処理した⁶⁾。

表1. 各SE不活化ワクチン接種群と無接種群におけるSE攻撃前・後のひな白痢凝集反応平均指数

ワクチン名	1回目		2回目	
	攻撃前	攻撃後	攻撃前	攻撃後
OEV-A	4 ^{a)}	2.86 ± 0.90 ^{a)}	3.14 ± 0.38 ^{a)}	4 ^{a)}
OEV-B	4 ^{a)}	2.86 ± 0.90 ^{a)}	3.14 ± 0.38 ^{a)}	3.57 ± 0.53 ^{a)}
KV-C	3.71 ± 0.49 ^{a)}	2.71 ± 0.76 ^{a)}	2.00 ± 0.82 ^{b)}	2.86 ± 0.90 ^{b)}
OEV-D	4 ^{a)}	2.50 ± 0.55 ^{a)}	3 ^{a)}	4 ^{a)}
OEV-E	3.67 ± 0.52 ^{a)}	2.50 ± 0.55 ^{a)}	3 ^{a)}	2.57 ± 0.79 ^{b)}
無接種	0 ^{b)}	1.43 ± 1.40 ^{b)}	0 ^{c)}	0.71 ± 1.25 ^{c)}

* 異符号間に有意差あり (p<0.05) ** 値は7羽の平均値を示す

表2. 各SE不活化ワクチン接種群と無接種群におけるSE攻撃前・後の平均ELISA値

ワクチン名	1回目		2回目	
	攻撃前	攻撃後	攻撃前	攻撃後
OEV-A	2.331 ± 0.093 ^{a)}	2.279 ± 0.115 ^{a)}	2.246 ± 0.281 ^{a)}	2.151 ± 0.288 ^{a)}
OEV-B	2.174 ± 0.252 ^{a)}	2.131 ± 0.310 ^{a)}	2.359 ± 0.182 ^{a)}	2.165 ± 0.255 ^{a)}
KV-C	0.831 ± 0.790 ^{b)}	0.721 ± 0.706 ^{b)}	0.567 ± 0.549 ^{b)}	1.113 ± 0.798 ^{b)}
OEV-D	2.132 ± 0.354 ^{a)}	1.950 ± 0.402 ^{a)}	0.690 ± 0.534 ^{b)}	0.946 ± 0.554 ^{b)}
OEV-E	2.218 ± 0.166 ^{a)}	2.036 ± 0.206 ^{a)}	2.343 ± 0.154 ^{a)}	2.132 ± 0.173 ^{a)}
無接種	0.129 ± 0.147 ^{c)}	0.846 ± 0.399 ^{b)}	0.107 ± 0.102 ^{c)}	0.371 ± 0.420 ^{c)}

* 異符号間に有意差あり (p<0.05) ** 値は7羽の平均値を示す

表3. 各SE不活化ワクチン接種群と無接種群におけるSE攻撃4日後の盲腸便からの排菌数と7日後の盲腸内容物と臓器からのSE分離平均菌数(logCFU/g)(試験)

ワクチン名	盲腸(4日目)	盲腸(7日目)	肝臓	脾臓	卵巣	卵管上部	子宮部
OEV-A	1.74 ± 0.74 ^{a)}	0.85 ± 0.64 ^{a)}	0 ^{a)}	0 ^{a)}	0.29 ± 0.45	0	0.29 ± 0.45
OEV-B	1.76 ± 0.72 ^{a)}	1.33 ± 0.53 ^{ab)}	0.14 ± 0.35 ^{b)}	0.29 ± 0.70 ^{ab)}	0	0.14 ± 0.35	0.43 ± 0.49
KV-C	2.07 ± 0.86 ^{ab)}	1.14 ± 0.35 ^{ab)}	1.14 ± 0.99 ^{c)}	1.14 ± 0.99 ^{bc)}	0.29 ± 0.70	0	0.29 ± 0.45
OEV-D	1.71 ± 0.45 ^{a)}	1.00 ^{a)}	1.43 ± 0.73 ^{c)}	1.14 ± 0.99 ^{bc)}	0	0.14 ± 0.35	0.14 ± 0.35
OEV-E	1.50 ± 0.5 ^{a)}	1.00 ± 0.58 ^{a)}	1.33 ± 0.75 ^{c)}	1.33 ± 0.94 ^{c)}	0.33 ± 0.75	0	0.17 ± 0.38
無接種	2.64 ± 0.50 ^{b)}	1.64 ± 0.58 ^{b)}	1.47 ± 0.55 ^{c)}	1.43 ± 0.90 ^{c)}	0	0	0.29 ± 0.70

* 異符号間に有意差あり (p<0.05) ** 値は7羽の平均値を示す

表 4 . 各 SE 不活化ワクチン接種群と無接種群における SE 攻撃 4 日後の盲腸便、7 日後の盲腸内容物と臓器からの SE 分離陽性菌数 (陽性羽数 / 検査羽数) (試験)

ワクチン名	盲腸 (4 日目)	盲腸 (7 日目)	肝臓	脾臓	卵巣	卵管上部	子宮部
OEV-A	7/7	5/7	0/7 ^{a)}	0/7 ^{a)}	2/7	0/7	2/7
OEV-B	7/7	7/7	1/7 ^{ab)}	1/7 ^{ab)}	0/7	1/7	3/7
KV-C	7/7	7/7	4/7 ^{bc)}	4/7 ^{bc)}	1/7	0/7	2/7
OEV-D	7/7	7/7	6/7 ^{bc)}	4/7 ^{bc)}	0/7	1/7	0/7
OEV-E	6/6	5/6	6/7 ^{bc)}	4/7 ^{bc)}	1/7	0/7	1/7
無接種	7/7	7/7	7/7 ^{c)}	5/7 ^{c)}	0/7	0/7	1/7

* 異符号間に有意差あり (p<0.05)

表 5 . 各 SE 不活化ワクチン接種群と無接種群における SE 攻撃 4 日後の盲腸便からの排菌数と 7 日後の盲腸内容物と臓器からの SE 分離平均菌数 (logCFU/g) (試験)

ワクチン名	盲腸 (4 日目)	盲腸 (7 日目)	肝臓	脾臓	卵巣	卵管上部	子宮部
OEV-A	2.42 ± 1.56 ^{ab)}	0 ^{a)}	0.90 ± 1.04	0.61 ± 0.97	0	0	0
OEV-B	3.27 ± 0.64 ^{bc)}	1.19 ± 1.03 ^{ab)}	1.87 ± 1.28	1.99 ± 1.53	0.57 ± 0.90	0	0
KV-C	4.13 ± 0.44 ^{c)}	1.76 ± 1.33 ^{bc)}	1.71 ± 0.70	1.54 ± 0.99	0	0	0
OEV-D	3.22 ± 0.89 ^{bc)}	1.67 ± 0.82 ^{bc)}	1.51 ± 1.43	1.55 ± 1.96	0	0	0.14 ± 0.35
OEV-E	1.81 ± 1.10 ^{a)}	1.41 ± 1.57 ^{bc)}	1.51 ± 1.13	1.56 ± 1.14	0.29 ± 0.70	0	0.14 ± 0.35
無接種	3.36 ± 1.64 ^{bc)}	2.41 ± 0.81 ^{c)}	1.14 ± 0.99	2.20 ± 1.35	0.29 ± 0.70	0	0

* 異符号間に有意差あり (p<0.05) ** 値は 7 羽の平均値を示す

表 6 . 各 SE 不活化ワクチン接種群と無接種群における SE 攻撃 4 日後の盲腸便、7 日後の盲腸内容物と臓器からの SE 分離陽性菌数 (陽性羽数 / 検査羽数) (試験)

ワクチン名	盲腸 (4 日目)	盲腸 (7 日目)	肝臓	脾臓	卵巣	卵管上部	子宮部
OEV-A	5/7	0/7 ^{a)}	3/7	2/7 ^{a)}	0/7	0/7	0/7
OEV-B	7/7	4/7 ^{b)}	5/7	5/7 ^{ab)}	2/7	0/7	0/7
KV-C	7/7	6/7 ^{bc)}	6/7	5/7 ^{ab)}	0/7	0/7	0/7
OEV-D	6/7	6/7 ^{bc)}	4/7	3/7 ^{ab)}	0/7	0/7	1/7
OEV-E	5/7	3/7 ^{b)}	4/7	4/7 ^{ab)}	1/7	0/7	1/7
無接種	7/7	7/7 ^{c)}	5/7	6/7 ^{b)}	1/7	0/7	0/7

* 異符号間に有意差あり (p<0.05) ** 値は 7 羽の平均値を示す

結 果

1 . 血清抗体価

RST のスコア値は、試験 ではすべてのワクチン接種群が攻撃後下降し、無接種群のみが上昇した。試験 ではすべての群で上昇した (表 1)。E 値は試験 ではすべてのワクチン接種群が攻撃後若干下降し、無接種群では上昇し、RST と同様の結果を示した。試験 では、A、B、E 群は 1 回目の試験の E 値と同様の推移を示したが、C、D、無接種群では攻撃後上昇した (表 2)。

2 . 盲腸便と盲腸内容物中の SE

試験 では攻撃 4 日後の盲腸便からの分離菌数は、OEV 接種の 4 群が無接種群より明らかに低い値を示した (p<0.05) が、菌はすべての鶏から分離された。盲腸内容物からの分離菌数は、A、D、E 群が無接種群より明らかに低い値を示した (p<0.05) (表 3)。菌分離陽性羽数に群間の差はみられなかった (表 4)。

試験 では攻撃 4 日目の盲腸便からの分離菌数は、E 群が A 群を除く残りの群、A 群が C 群より明らかに低い値を示した (p<0.05) が、菌分離陽性羽数に群間の差はみられなかった。盲腸内容物からの分離菌数は、A 群が B 群を除く残りの群、B 群が無接種群より明らかに低い値を示した (p<0.05) (表 5)。菌分離陽性羽数は A 群が他の群より、B、E 群が無接種群より明らかに低い値を示した (p<0.05) (表 6)。

3 . 臓器中の SE

各臓器からの分離菌数を表 3、5、菌分離陽性羽数を表 4、6 に示した。

肝臓からの分離菌数は、試験 では A 群が他の群より、B 群が A 群を除く残りの群より明らかに低い値を示した (p<0.05)。菌分離陽性羽数は A 群が B 群を除く他の群より、B、C 群が残りの群より明らかに低い値を示した (p<0.05)。試験 では分離菌数、菌分離陽性羽数に各群間で有意な差はみられなかった。

脾臓からの分離菌数は、試験 では A 群が B 群を除く残りの群より、B 群が E、無接種群より明らかに低い値を示した (p<0.05)。菌分離陽性羽数は A 群が B 群を除く残りの群より、B 群が無接種群より明らかに低い値を示した (p<0.05)。試験 では分離菌数は各群間に有意な差はみられなかったが、菌分離陽性羽数は A 群が無接種群より明らかに低い値を示した (p<0.05)。

卵巣、卵管漏斗部、卵管子宮部からの分離菌数および菌分離陽性羽数は、各群とも差はみられなかった。

考 察

OEV-A、OEV-B、KV-C の 3 種類の SE ワクチン接種後の採卵鶏における SE 定着軽減効果はアジュバントが油性の方が、さらに 2 回接種の OEV-A が 1 回接種の OEV-B より良好な結果を示したことは以前に報告⁷⁾した。今回、さらに 2 種類の SEOEV を追加し、5 種類の

ワクチンを用いて2回試験を実施したが、前記と同様OEV-Aは他のワクチンより良好な成績を示す傾向がみられた。他のワクチン接種群も無接種群に比べて盲腸からの排菌数、盲腸内容物からの分離菌数は少ない傾向にはあり、その傾向はOEVの方が強かったが、必ずしも無接種群と明らかな差がみられるとは限らず、SEワクチン接種により、SEを完全に防御することは困難であることが再確認された。また、OEV-Aが他のOEVに比べて良好な成績を示したのは、接種回数が大きく関与したことが考えられる。SEワクチン接種による副反応と盲腸におけるSE定着軽減効果は相反する傾向がみられたことを以前に報告⁷⁾したが、SEワクチンの使用にあたっては、個々の農場におけるワクチンの使用目的を明らかにして、ワクチンを選択すべきである。今回の成績はSE不活化ワクチンの選択時の参考になると考えられる。

- 3) 中村政幸・作田麻里・佐藤寛子・竹原一明(1998) 鶏病研報 33(4): 143 - 151
- 4) 山田果林・竹原一明・中村政幸(1999) 鶏病研報 35(1): 13 - 21
- 5) 鶏病研究会編(1998) 鶏卵・鶏肉サルモネラ全書、日本畜産振興会: 130 - 136
- 6) 吉田実・阿部猛夫(1984) 畜産における統計的方法(第二版) 中央畜産会: 38 - 61
- 7) 村野多可子・青木ふき乃・松本友紀子・石原克己・椎名幸一(2003) 鶏病研報 39(4): 181 - 189

引用文献

- 1) 鶏病研究会編(2006) 鳥の病気、鶏病研究会: 219 - 222
- 2) 今井康雄・並松孝憲・佐藤静夫(2004) 鶏病研報 40(4): 213 - 221