

Salmonella Enteritidis(SE)不活化油性アジュバントワクチン接種後の抗体価レベルによるSE排菌抑制効果

村野多可子

Effect of Antibody Responses Level of *Salmonella* Enteritidis (SE) Inactivated , Oil-ajuvant Vaccine on shedding of SE in Laying Hens

Takako MURANO

要 約

Salmonella Enteritidis(SE)不活化油性アジュバントワクチン (OEV) 接種後のELISAによる血清抗体価とSE排菌抑制効果の関連について調査した。SEOEV接種後2か月と1年の鶏群をELISA (E) 値により区分し、SE攻撃をした。その結果、E値の高低と排菌抑制効果には関連性はみられなかった。排菌抑制効果に関与する要因は、SEOEV接種の有無、回数、接種後日数であることが考えられた。

結 言

平成10年に国内で始めて市販された*Salmonella* Enteritidis (SE)不活化油性アジュバントワクチン(OEV)¹⁾は米国からの輸入ワクチンであり、米国では12週齢と16週齢の2回接種とされている²⁾が、わが国での使用法は12週齢以上で産卵開始前までの1回接種となっている¹⁾。このため、発売当初、このワクチンに対する情報は少なく、また高額であることから、養鶏農家は使用に際して躊躇していた。しかし、現在に至っては、このワクチンに対する幾つかのデータ^{3~8)}が報告され、また他社のSEワクチンも市販されるなど、徐々にSEOEVを接種する農場が増加してきた。疾病に対する防御手段の判断方法の一つとして、ワクチン接種後の抗体価が重要視されている。しかし、SEOEV接種後のELISAによる抗体価は、SEの排菌抑制効果とは相関が見られないとする幾つかの報告^{3,9,10)}がある。そこで今回、採卵鶏にSEOEVを接種し、接種後のELISA値により鶏を区分けし、それら鶏でのSEの排菌抑制効果を検討した。

材料および方法

1. 供試鶏とワクチン

平成16年8月31日受付

採卵雌鶏のジュリア200羽を用い、50羽に88日齢と116日齢の2回、50羽に104日齢の1回、市販のSEOEV(D社)を0.5ml/羽肩部皮下に接種した。また残りの50羽にはSEの抗体価を高めるために、SEOEV、ニューカッスル病(ND)・伝染性気管支炎2価・伝染性コリーザA型・C型の5種混合不活化アルミニウムアジュバントワクチン(N社)とマイコプラズマ・ガリセプチカム感染症OEV(N社)を混合したものを、104日齢に1.5ml/羽脚部筋肉内に1回接種した。50羽は無接種対照群とした。

2. 区分け

SEOEV接種後2か月と1年後に、血清を採取して、今井ら¹¹⁾の方法に準じ、ELISAを実施した。検出されたELISA値(E値)によって、区分けをおこなった。接種後2か月における区分けは、SEOEV2回接種群の中でE値が2.4~2.5のものを5羽(1区)、SE混合ワクチン接種群の中でE値が2.4~2.5のものを5羽(2区)、SEOEV1回接種群の中でE値が2.4~2.5のものを5羽(3区)、E値が2.1~2.2のものを5羽(4区)、E値が2.0未満のものを5羽(5区)、無接種対照群から5羽(6区)とした。

接種後1年における区分けはE値が高い群としてSE混合ワクチン接種群を選び、8羽を用いた(A区)。これらの平均E値は2.1であった。また低~中程度群として、SEOEV1回接種群を選び、6羽を用いた(B区)。これらの平均E値は0.99であった。無接種対照群からは5羽を用いた(C区)。

3. SE攻撃

(1)攻撃菌株

SE ZK-2a株のリファンピシシ(rif)耐性株(全農家畜衛生研究所より分与)を、SEOEV接種後2か月鶏群には 3.8×10^8 CFU/0.5ml/羽、1年後鶏群には 8.8×10^8 CFU/0.5ml/羽経口接種した。

(2) 抗体価

攻撃5日前と解剖時の血清を全羽より採取し、ELISAにより測定した。

(3) 細菌学的検査

ア. 盲腸便

SEOEV接種後2か月の鶏群では攻撃4、7日後、接種後1年の鶏群では攻撃4、7、11日後の早朝に排泄された盲腸便を個別別に全羽より採取し、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 μ g/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400CFU/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¹²⁾(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¹⁰⁾。なお、発育コロニーは定法¹³⁾に従いサルモネラと同定した。

イ. 臓器

SEOEV接種後2か月の鶏群では攻撃11日後、接種後1年の鶏群では攻撃14日後に全羽殺処分し、肝臓、脾臓、卵巣、卵管を無菌的に採取し、10倍量のトリプトソイオン(TSB,ニッスイ)を加えた⁷⁾。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10倍量のTSBを用いた。検出限界は盲腸便と同様にした。

ウ. 盲腸内容物

臓器採取時と同時に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した。

4. 統計処理

SE数については一元配置分散分析法を用いて処理した¹⁴⁾。

結 果

1. SEOEV接種後2か月鶏群の成績

表3 SEワクチン接種後2か月鶏群におけるSE攻撃後の臓器からのSE分離平均菌数(logCFU/g)の推移

区	ワクチン接種	臓 器			
		肝 臓	脾 臓	卵 巣	卵 管
1	2回	0	0 ^b	0	0
2	1回	0	0 ^b	0	0
3	1回	0	0 ^b	0	0
4	1回	0	0.42 ± 0.82 ^{ab}	0	0
5	1回	0	0 ^b	0	0
6	無	0.42 ± 0.79	0.82 ± 0.96 ^a	0	0

*異符号間に有意差あり (p<0.05)

SE攻撃前の平均E値が2.2以上あった鶏群では、攻撃11日後のE値は低下した。しかし、攻撃前の平均E値が1.5であった鶏群では横ばい状態、また陰性値であったSEOEV無接種対照群では、攻撃11日後には平均E値は1.3と上昇した(表1)。

表1 SEワクチン接種後2か月鶏群におけるSE攻撃前・後の平均ELISA値

区	ワクチン接種	攻 撃	
		5日前	11日後
1	2回	2.458 ± 0.035 ^a	2.028 ± 0.239 ^{ab}
2	1回	2.468 ± 0.034 ^a	1.962 ± 0.363 ^{ab}
3	1回	2.463 ± 0.047 ^a	2.201 ± 0.056 ^a
4	1回	2.209 ± 0.034 ^b	1.837 ± 0.034 ^{ab}
5	1回	1.577 ± 0.232 ^c	1.580 ± 0.346 ^{bc}
6	無	0.065 ± 0.053 ^d	1.274 ± 0.616 ^c

*異符号間に有意差あり (p<0.05)

SE攻撃後の盲腸便からのSE分離は、SEOEV2回接種群が調査期間を通して皆無であった。この群とSE攻撃前、同レベルの平均E値を示していたSEOEV1回接種群では、SE単味接種群が攻撃7日後に僅かに菌が分離できたが、2回接種群との有意な差は認められなかった。しかし、混合接種群では調査期間を通して菌が分離され、攻撃4日、7日後は明らかに2回接種群より菌数は多かった(p<0.05)。攻撃前の平均E値が2.1~2.2、または2.0以下の鶏群においても調査期間を通して菌が分離され、攻撃4日後では混合接種群と同様な菌数を示し、また7日目においては2.0以下の鶏群が菌数が少ない傾向にあったが、攻撃11日後には接種群による明らかな差は認められなかった。無接種対照群は調査期間を通して、SEOEV接種群より明らかに高い菌数で推移した(p<0.05)(表2)。

表2 SEワクチン接種後2か月鶏群におけるSE攻撃後の盲腸便からのSE分離平均菌数(logCFU/g)の推移

区	ワクチン接種	攻撃後日数		
		4日	7日	11日
1	2回	0 ^{c)}	0 ^{c)}	0 ^{b)}
2	1回	1.54 ± 1.40 ^{b)}	9.04 ± 1.81 ^{b)}	0.57 ± 1.14 ^{b)}
3	1回	0 ^{c)}	2.30 ± 0.46 ^{bc)}	0 ^{b)}
4	1回	1.20 ± 0.98 ^{bc)}	4.95 ± 0.99 ^{bc)}	0.86 ± 1.06 ^{b)}
5	1回	1.26 ± 1.03 ^{bc)}	0.40 ± 0.80 ^{c)}	0.92 ± 1.13 ^{b)}
6	無	4.36 ± 1.50 ^{a)}	3.63 ± 1.09 ^{a)}	2.32 ± 1.25 ^{a)}

*異符号間に有意差あり (p<0.05)

SE攻撃後の臓器からのSEは、肝臓では無接種対照群、脾臓で平均E値が2.1~2.2の鶏群と無接種対照群で分離されたが、肝臓では明らかな差は見られず、脾臓において無接種対照群が明らかに高い値を示した(p<0.05)(表3)。

表4 SEワクチン接種後1年鶏群におけるSE攻撃前・後の平均ELISA値

区	ワクチン接種	攻 撃	
		5 日前	14 日後
A	1 回	2.117 ± 0.309 ^{a)}	1.695 ± 0.338 ^{a)}
B	1 回	0.988 ± 0.615 ^{b)}	1.079 ± 0.387 ^{b)}
C	無	0.100 ± 0.050 ^{c)}	0.662 ± 0.527 ^{b)}

*異符号間に有意差あり (p<0.05)

2. SEOEV接種後1年鶏群の成績

SE攻撃前の平均E値が2.1であった鶏群では、攻撃14日後のE値は低下した。しかし、攻撃前の平均E値が1.0であった鶏群では横ばい状態、また陰性値であったSEOEV無接種対照群では、攻撃14日後には平均E値は0.7と上昇した(表4)。

SE攻撃後の盲腸便からのSE分離は、4日目では攻撃前のE値が高かった鶏群、7日目ではSEOEV接種の両群、11日目、14日目では攻撃前のE値が低かった鶏群が明らかに低い値を示し(p<0.05)、E値の高低による一定の傾向はみられなかった(表5)。

SE攻撃後の臓器からのSE分離菌数に、E値の高低、SEOEV接種の有無による関連性はみられなかった(表6)。

考 察

ELISAによる血清抗体価はSEOEV接種後4~6週でピークとなり、その後漸次減少する³⁾。鶏の疾病においてワクチン接種後の抗体価は、感染防御の指針となるため、養鶏経営者にとっても関心の深い所である。代表的な例としてはND-HI抗体価が16倍以上あれば80%以上のND感染防御率が得られる¹⁵⁾という報告もある。しかし、SE排菌抑制効果に必要な抗体価の報告はなく、反対にSEOEV接種後のELISAによる血清抗体価は、SEの排菌抑制効果とは相関が見られないとする幾つかの報告^{4,8,9)}がある。今回、E値の高低によ

りSE攻撃試験を実施したが、従来の報告通り、SE分離菌数に差はみられず、排菌抑制には液性免疫以外の免疫関与物質が考えられる。今回の結果からSE排菌抑制効果に関与するのは、SEOEVの接種の有無、接種回数、接種後日数であることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) 鶏病研究会編(2001)、鳥の病気、鶏病研究会:204-206
- 2) 中村政幸(1998)、鶏卵・鶏肉サルモネラ全書、日本畜産振興会:206-218
- 3) 村野多可子ら(2000)、鶏病研報、Vol 36、No 4:171-180
- 4) 渡邊理ら(2000)、鶏病研報、Vol 36、No 4:188-194
- 5) 渡邊理ら(2001)、鶏病研報、Vol 37、No 3:168-173
- 6) 村野多可子ら(2002)、鶏病研報、Vol 38、No 4:182-188
- 7) 青木ふき乃ら(2003)、鶏病研報、Vol 39、No 1:44-54
- 8) 村野多可子ら(2002)、鶏病研報、Vol 39、No 4:181-189
- 9) Methner, U., Stenbach, G. and Mayer, H. (1994)、*Brel. Muench. Tierartl. Waschr* Vol.107:192-198
- 10) 山田果林・竹原一明・中村政幸(1999)、鶏病研報、Vol 35、No 1:13-21
- 11) 今井康雄・並松孝憲・佐藤静夫(1995)、第120回獣医学会講演要旨集:139
- 12) 中村政幸ら(1998)、鶏病研報、Vol 33、No 4:143-151
- 13) 鶏病研究会(1998)、鶏卵・鶏肉サルモネラ全書、日本畜産振興会:130-136
- 14) 吉田実・阿部猛夫(1984)、畜産における統計的方法、中央畜産会
- 15) 山田進二(1983)、鶏の研究 Vol 58、No 6:31-37

表5 SEワクチン接種後1年鶏群におけるSE攻撃後の盲腸便からのSE分離平均菌数 (logCFU/g) の推移

区	ワクチン接種	攻撃後日数			
		4 日	7 日	11 日	14 日
A	1 回	1.73 ± 1.40 ^{b)}	2.41 ± 1.45 ^{a)}	2.50 ± 0.88 ^{ab)}	1.38 ± 0.48 ^{b)}
B	1 回	3.32 ± 0.98 ^{a)}	1.85 ± 0.66 ^{a)}	1.90 ± 1.34 ^{b)}	0.67 ± 0.47 ^{a)}
C	無	3.97 ± 0.88 ^{a)}	4.48 ± 1.36 ^{b)}	3.17 ± 0.45 ^{a)}	1.17 ± 0.37 ^{ab)}

*異符号間に有意差あり (p<0.05)

表6 SEワクチン接種後1年鶏群におけるSE攻撃後の臓器からのSE分離平均菌数 (logCFU/g) の推移

区	ワクチン接種	攻撃後日数			
		肝臓	脾臓	卵巣	卵管
A	1 回	1.50 ± 0.50 ^{a)}	1.25 ± 0.97 ^{a)}	0	0
B	1 回	0 ^{c)}	0 ^{b)}	0.17 ± 0.37	0
C	無	1 ^{b)}	0.75 ± 1.07 ^{ab)}	0	0

*異符号間に有意差あり (p<0.05)