

称号及び氏名	博士(獣医学) 朴 貞子
学位授与の日付	平成20年3月31日
論文名	「産卵鶏の強制換羽時における <i>Salmonella</i> Enteritidis 感染助長と <i>S. Enteritidis</i> ワクチンおよび <i>Lactobacillus</i> による汚染リスク抑制効果」
論文審査委員	主査 馬場 栄一郎 副査 小崎 俊司 副査 児玉 洋 副査 笹井 和美

論文要旨

はじめに

鶏卵を汚染して食中毒の原因となる *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (SE)の防遏は、食品衛生における重要な課題である。日本では、1990年以降、SEによる急性胃腸炎患者数が増加し、常に細菌性食中毒の上位を占めてきた。SE汚染卵による事例が多いため、農林水産省は安全な鶏卵の生産について注意を喚起してきた。鶏のSE汚染防止対策としては、清掃・消毒・ネズミ駆除をはじめとする衛生対策、抗菌剤、生菌剤、さらに競合排除法などを用いた予防対策をあげている。しかし、効果を明確に証明した研究は少ない。現在期待されている対策の一つは、ワクチンによるSE汚染予防であるが、その効果については必ずしも十分なデータがない。日本では、経済的理由から高齢になって卵質の低下した産卵鶏に強制換羽を負荷することによって卵質を回復させる手法が用いられており、このことがSE汚染リスクを増大させているといわれている。ヒナにSEワクチンを接種した後、強制換羽を実施する時期まで感染防御に十分な抗体が維持されているかどうか、さらに、絶餌ストレスによるサルモネラ感染助長を防止することができるかどうかは疑問である。ワクチン接種鶏において強制換羽時の抗体の保有量や、SE感染後の抗体量の変動についてはデータが少なく、これらの疑問点を解決するためには、実験的に野外の条件を再現して調べる必要があると考えられる。強制換羽ストレスを緩和する方法として野外では *Lactobacillus* の生菌投与が検討されているが、強制換羽時の腸内フローラ全体の変動を解析しなければ、SE感染助長とそれを抑制する生菌投与の効果は判明しないと考えられる。

本研究では、野外の養鶏場で飼育されているワクチン接種鶏と非接種鶏を導入し、SE 攻撃後に食餌を制限して、両群間で SE の感染レベルをクロアカスワブでの定量培養と、血清中の SE 抗体価の推移から評価した。また、強制換羽時の SE 感染レベルの変動を解析するために腸内フローラを調べた。さらに、*Lactobacillus* 生菌を投与した鶏における腸内フローラと SE 感染レベルに与える影響を解析した。

第 1 章：絶餌ストレスによる産卵鶏の SE 感染助長に対するワクチンの効果

一般養鶏場で飼育されている約 60 週齢のホワイトレグホン種産卵鶏を用いた。SE 不活化ワクチン接種鶏と非接種鶏を導入して、SE を攻撃した後に絶餌による強制換羽を模倣し、SE 感染レベルの変化を調べた。これにより、不活化ワクチンが感染の消長に与える影響を、絶餌期間を変えて実施した 3 回の試験によって評価した。経時的にクロアカスワブと産出卵について SE の検出を行い、剖検時の臓器についても調べた。また、血清中の SE 菌体抗体および鞭毛抗体を ELISA により測定した。

SE 攻撃後、クロアカスワブにおいて両群ともに高い SE 検出率がみられ、その後低下したが、いずれの試験でも、SE ワクチン接種群の検出率は非接種群より低かった。クロアカスワブへの SE 排菌数をみるとワクチン非接種群では絶餌開始後、SE 検出菌数が有意に上昇し、一方で SE ワクチン接種群では排菌の抑制効果が認められた。ワクチン非接種群では卵殻および卵内容から SE が多く分離される傾向にあり、再給餌後に SE が再検出される例も見られた。

ワクチン接種群では、SE 攻撃前の菌体抗体価および鞭毛抗体価はともに高く、SE 攻撃後は両者ともにさらに上昇した。一方、ワクチン非接種群では SE 攻撃後に菌体抗体価が上昇したものの、鞭毛抗体価はほとんど上昇せず、ワクチン接種群と大きく異なっていた。クロアカから SE が検出された例について、菌体抗体と鞭毛抗体に分けて、菌数と抗体価の相関をみたところ、両抗体の間に明らかな違いがみられ、菌体抗体価が高くても SE 菌数の高い例が多く見られたにも拘わらず、鞭毛抗体価が高い例ではクロアカの菌数が低かった。

以上の成績から、産卵鶏に絶餌ストレスを与えると、消化管の SE 感染や、卵の汚染リスクが高まることが証明された。また、ヒナの時期に接種されたワクチンは強制換羽による産卵鶏への SE 感染や卵汚染リスクを軽減すると推論された。SE ワクチン接種を受けた鶏では SE 感染に対する鞭毛抗体がワクチン接種後の免疫の程度をモニターする手法として期待される。

第 2 章：産卵鶏における絶餌ストレスによる腸内フローラの変化

各種のストレスが腸内フローラの構成を変化させることは古くから知られている。しかし、産卵鶏の強制換羽時における腸内フローラの変化については報告がみられない。前章で述べた絶餌ストレスによる SE 感染レベルの変化を解析するために、ストレス時の腸内フローラの変化を調べた。

産卵鶏を用い、絶餌ストレスを負荷した時の経時的变化をみるために、クロアカスワブで得られる材料についてフローラの検索を行った。光岡らの方法を基本にして改良を加え、

嫌気性総菌数と好気性総菌数の測定にそれぞれ非選択培地を用い、主なフローラ構成菌種には選択培地6種類を供試した。

絶餌開始後、嫌気性総菌数と好気性総菌数はともに減少し、給餌を再開すると再び絶餌開始以前の値に戻った。これまで腸管環境が変化したときの腸内フローラに関する報告では総菌数は変化しないと述べられており、今回の総菌数の有意な減少は栄養源の不足によるものと推定された。

構成菌種についてみると、嫌気性菌では絶餌開始後に *Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* が一様に減少し、再開後に復帰した。特に、*Lactobacillus* の減少と復帰の変化は大きかった。一方、好気性菌種では *Streptococcus* が絶餌開始後に減少し、再開後に復帰したが、*Enterobacteriaceae* と *Staphylococcus* には絶餌ストレスによる変化がほとんどみられなかった。特に、*Enterobacteriaceae* の菌数は絶餌期間中ほぼ好気性総菌数に一致する現象が見られた。絶餌開始後、ほとんどの菌種の菌数が減少する中で、*Enterobacteriaceae* の菌数が維持される現象から考察して、絶餌ストレス時には *Enterobacteriaceae* の一員である SE の菌数も高く維持される可能性が考えられる。

第3章：産卵鶏の強制換羽時における SE 感染助長に対する *Lactobacillus* 生菌投与の効果

産卵鶏において、強制換羽ストレスを緩和する目的で *Lactobacillus* 生菌投与が検討され、一部市販されている。しかし、その根拠となる成績は報告されていない。前章の成績から、絶餌ストレス下では、*Lactobacillus* が大きく減少し、*Enterobacteriaceae* は相対的に優勢になる傾向がみられた。そこで、本章では、産卵鶏に SE を感染させて絶餌ストレスを負荷し、*Lactobacillus* を投与することで SE 感染を抑制できるかどうかを試験した。

導入した産卵鶏に SE を与えた後、絶餌ストレス負荷と同時に、健康鶏から分離した4菌株の *Lactobacillus* 生菌混合液を連日投与した。SE 感染レベルと腸内フローラの変化に対する *Lactobacillus* 投与の効果を、前章までと同様の方法で比較検討した。

Lactobacillus 生菌投与群では、SE 攻撃後、絶餌期間中および給餌再開後にわたり、対照群と比較して *Lactobacillus* 投与による SE 排菌の抑制効果は認められなかった。サルモネラ汚染リスクは給餌再開後に高まるといわれているので、給餌再開後に回数を増やして採材したが、この時期における SE 検出レベルやフローラには特徴的な変化は見られなかった。

腸内フローラについてみると、絶餌開始後、嫌気性総菌数と好気性総菌数はともに減少し、給餌を再開すると再び絶餌開始以前の値に戻った。*Lactobacillus* と *Streptococcus* は絶餌開始後に著しく減少し、給餌再開後には速やかに復帰した。*Enterobacteriaceae* の菌数の変動は試験期間を通じて小さかった。これらの結果は第2章と一致した。しかし、フローラ中の *Lactobacillus* の菌数は *Lactobacillus* 生菌投与群と非投与群の間で差がなかった。

以上の成績から、強制換羽時期のストレス緩和剤として健康鶏から分離した *Lactobacillus* を用いた SE 感染助長の抑制効果は認められなかった。

まとめ

- 1) ヒナの時期に接種した SE 不活化ワクチンは強制換羽による産卵鶏への SE 感染や卵汚

染リスクを軽減すると考えられる。

2) 鞭毛に含まれるタンパク質が鶏の SE 感染防御用抗原として利用できる可能性が示唆された。

3) 絶餌ストレスは腸内フローラを著しく変化させた。絶餌期間中には総菌数が低下し、*Lactobacillus* などを中心にした多くの菌種の菌数が減少したが、*Enterobacteriaceae* の菌数は変化しなかった。

4) *Lactobacillus* による強制換羽時の SE 感染助長の抑制効果は認められなかった。

審査結果の要旨

サルモネラ汚染鶏卵を原因食材とするヒトの急性胃腸炎が 1990 年代以降増加し、中でも *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) による事例が最も多く発生して来た。農林水産省では、安全な鶏卵生産のための鶏 SE 汚染防止対策として、一般的な衛生管理に加えて、競合排除法やネズミ駆除などによる対策を推奨してきた。現在対策の一つとして、鶏の SE ワクチン接種に力を入れているが、その効果は必ずしも十分に検証されていない。一方、日本の養鶏産業では経済的理由から、卵質の低下した高齢産卵鶏に強制換羽処置による卵質回復法を行っており、この処置が SE 汚染リスクを増大させる可能性を含んでいる。ヒナに接種した SE ワクチンが、強制換羽を実施する時期まで十分な抗体を維持させ、絶餌ストレス時のサルモネラ感染助長を防止できるとすれば、SE 汚染防止策として大いに期待できる。そこで申請者は、養鶏場からワクチン接種鶏と非接種鶏を導入し、SE 攻撃後に強制換羽を模した絶餌ストレスを負荷して、両群間で SE の感染レベルを比較した。また、強制換羽時の SE 感染レベルの変動を解析するために腸内フローラを調べ、さらに、*Lactobacillus* 生菌を投与した鶏における腸内フローラと SE 感染レベルに与える影響を解析した。

第 1 章では、SE を攻撃した後に絶餌期間を変えて 3 回の試験を実施し、経時的にクロアカスワブと産出卵について SE の検出を行い、血清中の SE 菌体抗体および鞭毛抗体を ELISA により測定した。SE 攻撃後、SE ワクチン非接種群の検出率は接種群より高かった。特に絶餌後の SE 排菌数はワクチン接種群よりも有意に上昇した。非接種群では卵殻および卵内容からも SE が多く分離される傾向にあり、再給餌後に SE が再び検出される例も見られた。ワクチン接種群では、SE 攻撃前の菌体抗体価および鞭毛抗体価はともに高く、SE 攻撃後は両者ともにさらに上昇した。一方、ワクチン非接種群では SE 攻撃後に菌体抗体価が上昇したものの、鞭毛抗体価はほとんど上昇せず、ワクチン接種群と大きく異なっていた。菌体抗体価が高くても SE 菌数の高い例が多く見られたにもかかわらず、鞭毛抗体価が高い例ではクロアカの菌数が低かった。以上の成績から、産卵鶏に絶餌ストレスを与えると、消化管の SE 感染や、卵の汚染リスクが高まることが証明され、ヒナの時期に接種されたワクチンは産卵鶏の SE 感染や卵汚染リスクを軽減すると考えられる。さらに、鞭毛に含まれるタンパク質が鶏の SE 感染防御用抗原として利用できる可能性が示唆された。

第2章では、絶餌ストレス負荷による腸管内細菌フローラの経時的变化をみるために、クローカスワブを用いて検査した。絶餌開始後、嫌気性および好気性総菌数はともに減少し、給餌を再開すると再び絶餌開始以前の値に復帰した。総菌数の有意な減少は細菌の栄養源不足によるものと推定された。嫌気性菌では絶餌開始後に *Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* が一様に減少し、再開後に復帰した。特に、*Lactobacillus* の減少と復帰の変化は大きかった。好気性菌種では *Streptococcus* が絶餌開始後に減少し、再開後に復帰したが、*Enterobacteriaceae* と *Staphylococcus* には絶餌ストレスによる変化がほとんどみられなかった。特に、*Enterobacteriaceae* の菌数は絶餌期間中ほぼ好気性総菌数に一致する現象が見られた。絶餌開始後、ほとんどの菌種の菌数が減少する中で、*Enterobacteriaceae* の菌数が維持される現象から、絶餌ストレス時には *Enterobacteriaceae* の一員である SE の菌数が同様のメカニズムによって高く維持される可能性が示唆された。

第3章では、産卵鶏に SE を与えた後、絶餌ストレス負荷と同時に、健康鶏から分離した *Lactobacillus* 生菌を連日投与し、SE 感染レベルと腸内フローラの変化を検討した。腸内フローラの変化は前章と同様の変化を示したが、*Lactobacillus* の菌数は *Lactobacillus* 生菌投与群と非投与群の間で差が認められなかった。以上の成績から、健康鶏から分離した *Lactobacillus* を用いたプロバイオティクス法では強制換羽時期のストレス緩和剤として SE 感染助長を抑制する効果は認められなかった。

以上の結果は、SE ワクチンが産卵鶏の強制換羽時における鶏卵の SE 汚染リスク軽減に効果があることを示すものであり、産卵養鶏場の SE 対策としての的確な手法であることを証明した。一方で、ストレス下の腸管で SE が増殖するメカニズムの解明に重要な示唆を与えるものであり、微生物学、獣医衛生学、獣医公衆衛生学に寄与するところが大きい。したがって、本論文の審査および最終試験の結果とあわせて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。