

平成26年3月18日

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業 研究実績報告書

課題番号：2302

採卵鶏農場におけるサルモネラ汚染低減技術の確立

研究期間：平成23年度～平成25年度（3年間）

研究総括者名：中村 政幸

試験研究機関名：一般財団法人生物科学安全研究所

I. 全体計画

1. 研究目的

国内に複数の採卵鶏農場を有する鶏卵生産者の協力により、農場レベルでのサルモネラワクチンの効果、鶏舎におけるサルモネラ低減対策の効果、鶏舎構造等の生産方式の相違とサルモネラ汚染の関連性等を明らかにし、各種ガイドライン、手引書等の改訂に資することを目的とする。

2. 研究内容

(1) 中課題1：サルモネラワクチンの免疫持続期間等の評価

採卵鶏の多くは、育成期（100日齢未満）にサルモネラ不活化ワクチンが接種されており、免疫持続期間は接種後約1年と考えられている。その一方で、多くの採卵鶏農場では、420～450日齢で産卵数・卵質改善のため、換羽誘導（IM）を実施しているが、この換羽誘導がサルモネラに対する感受性を高め、排菌数を増大させると指摘する研究報告は数多い。国内の採卵鶏農場の多くは、農場内に複数の鶏舎を所有しており、大規模農場では常に換羽誘導期の鶏群が存在することになる。換羽誘導に起因するサルモネラ汚染を防ぐ手段の一つとして、ワクチン接種があるものの、①ワクチンの効果が換羽誘導時期まで持続し得るか、②その際、どの程度の効果が認められるかについて、これまでに農場レベルで検証した報告はない。このため、以下の野外試験を実施する。

1) 小課題1：二価サルモネラ不活化ワクチンの免疫持続期間

サルモネラ陰性の育成鶏を買い上げ、サルモネラ不活化ワクチン接種後、サルモネラ陰性を確認した採卵鶏舎で預託飼育する。ワクチン接種後1ヵ月以降、3ヵ月毎に生物科学安全研究所に搬入し、2年間にわたり、ワクチン接種鶏、非接種対照鶏を用いた以下の評価試験を実施する。

① 供試ワクチン(*Salmonella* Enteritidis(SE)及び *Salmonella* Typhimurium(ST)を含む二価ワクチン2種類)

ワクチン A

ワクチン B

② 供試鶏

育成鶏を買い上げ、この小課題では協力農場の接種方法に従ってそれぞれのワクチンを0.5ドーズ(※)接種し(V群)、サルモネラ陰性採卵養鶏場で対照群(C群)とともに預託飼育する。(※ワクチンが用法・用量に従って接種されない場合には、期待される免疫効果が得られない可能性がある。)

③ ワクチン接種

2011年8月にワクチンを接種し、試験を開始する。

④ SE 及び ST 抗体測定試験及び SE 及び ST 攻撃試験

供試鶏は 1 群 10 羽とし、預託農場から生物科学安全研究所に搬入後、SE 及び ST 抗体を測定（エライザ法）する。SE 及び ST 攻撃試験は、両菌とも 10^9 CFU/ml の菌を 1 羽当たり 1 ml で経口攻撃する。攻撃 5 日後に盲腸便、肝臓及び脾臓を採取し、定量培養を行う。攻撃試験については、試験成立の確認用として比較対照群（5 週齢、実験用 SPF 鶏）を設定する。

⑤ 評価方法

抗体陽性率の推移及び攻撃試験における排菌数の群間比較から、ワクチン A 及びワクチン B の効果を評価する。

	第 1 群	第 2 群	第 3 群	第 4 群	第 5 群	第 6 群	第 7 群	第 8 群
A			○	○				
B	○	○						
攻撃株	SE	ST	SE	ST	SE	ST	SE	ST

各群 13 羽（試験鶏 10 羽、予備 3 羽）ずつ設定。第 5 群、第 6 群はそれぞれの無処置対照群。第 7 群、第 8 群は試験成立を確認するための比較対照群。○＝投与あり。

※ 小課題 1 の補足試験：ワクチン B の免疫持続期間（24 年度新規追加試験）

当試験は、小課題 1 の補足試験として実施する。小課題 1 と同一のワクチン B を 1 個体あたり 1 ドーズ（指示書どおりの規定接種量）接種後、160、251、377、496 及び 587 日齢に達した鶏を 12 羽ずつ同一農場から同時購入し、生物科学安全研究所に導入する。小課題 1 と同様の方法により SE 抗体測定及び SE 攻撃試験を実施し、効果を評価する。

2) 小課題 2：三価サルモネラ不活化ワクチンにおける *S. Infantis* (SI) 防御免疫の持続期間

SE、ST 及び SI を含む三価サルモネラ不活化ワクチン（以下「ワクチン C」という。）を用い、1) と同じ方法により SI に対する免疫持続期間を調べる。当試験により、SI に対するワクチンの有効性を養鶏現場レベルで明らかにする。

2013 年 3 月にワクチンを 1 ドーズ接種後、2 又は 3 ヶ月毎に生物科学安全研究所に搬入し、SI 抗体測定及び SI 攻撃試験を実施する。可能であれば、0.5 ドーズ接種鶏も導入し、1 ドーズ接種の場合と比較する。

	第1群	第2群	第3群
C	○		
攻撃株	SI	SI	SI

各群12羽（試験鶏10羽、予備2羽）ずつ設定。第2群は無処置対照群。第3群は試験成立を確認するための比較対照群（5週齢、実験用SPF鶏）。○＝投与あり。

（2）中課題2：誘導換羽（IM）によるサルモネラ感染憎悪作用に対するワクチンと換羽代替飼料（市販飼料）の効果

本課題では、誘導換羽時における鶏群からのサルモネラ検出率と排出菌数に対する、誘導換羽用代替飼料、ワクチンA及びBの効果、及び誘導換羽用代替飼料と両ワクチンを同時に使用した場合の効果について検討する。この中課題では、協力農場において、同農場の接種方法に従ってワクチンA又はBを0.5ドーズ接種する。同農場において預託飼育後、450日齢程度に達した鶏を供試する。IM処置は、絶食（S群）、誘導換羽用代替飼料給与（F群）又は通常飼料給与（C群）の3条件とする。誘導換羽用代替飼料は、一般的な配合飼料よりも栄養価が低く設定されている。このため、給餌しながら体重を減少させ、誘導換羽を実施することが可能であり、絶食法に比べ、動物福祉やサルモネラ排菌抑制の面でメリットがあるとされる。

供試鶏群は以下の9群（S群、F群、C群、BS群、BF群、BC群、AS群、AF群、AC群）とし、各群13羽（試験鶏10羽、予備3羽）とする。供試鶏にSEを経口攻撃（ 10^9 CFU/ml）し、その4日後から10日間、IM処置を行う。その後、14日間、約3日間隔で盲腸便のSE定量培養を行う（当初の計画では、絶食期間終了後、2週間隔で10週目までSE定量培養を行うこととなっていたが、上記内容に変更した）。また、SE攻撃前、換羽誘導処置終了時及び試験終了時の3時点について、SE抗体価の推移を調べる（参考データとして新規追加項目）。試験期間終了日に解剖し、材料（肝臓、脾臓、卵巣及び盲腸内容）についてSEの定量を行う。SE生菌数を群間で比較することにより、各ワクチン及び誘導換羽用代替飼料の効果を評価する。

（3）中課題3：採卵鶏農場におけるサルモネラ低減対策（野外試験）

1）小課題1：三価サルモネラ不活化ワクチンによる鶏舎のサルモネラ汚染の低減化（野外試験）

O7群サルモネラは、O4群、O9群とともに養鶏場で多発しており、同群に属する*S. Infantis* (SI)などは、人の食中毒菌として重視されている。当課題では、SI抗原を含有した三価サルモネラ不活化ワクチン（以下「ワクチンC」という。）を使用し、サルモネラ汚染採卵鶏舎（特にSI汚染）の清浄化に効果があるか検証

することを目的とする。

試験開始前に、供試候補鶏舎内の糞便（四隅及び中央付近）と塵埃検体（排気ファン付近）を調査し、サルモネラ汚染が確認された鶏舎を供試汚染鶏舎とする。供試汚染鶏舎に被験ワクチン接種鶏を導入後、①塵埃及び落下鶏糞を材料とした定期的検査（1ヶ月毎）、及び②生物科学安全研究所導入後の鶏糞検査（個体別、2～3ヶ月毎）により、鶏舎のサルモネラ汚染状況をモニタリングする。②については、ワクチン接種鶏によるサルモネラの排菌があるかについて検討するものである。サルモネラ汚染が認められた場合、鶏舎内のワクチン接種鶏群及びワクチン無接種鶏について、サルモネラ汚染度を経時的に比較調査する。また、試験期間中の一定期間、ワクチン無接種群を含む全個体を対象に、ギ酸を主成分とする資材を給与し、サルモネラ汚染に対する三価ワクチンとの相乗効果についても検討する予定である。

2) 小課題2：二価サルモネラ不活化ワクチンによる鶏舎のSE汚染の低減化（野外試験）

平成24年、卵及び卵加工品によるサルモネラ食中毒は6件（263人）発生しており、採卵鶏農場においてSE汚染を未然防止することがキーポイントといえる。当課題では、SE汚染農場において二価サルモネラワクチンを使用することによる汚染低減について検証することを目的とする。

試験開始前に、養鶏関係者の協力により、採卵鶏農場についてSE検査を実施する。その結果、SE汚染が認められた農場と交渉し、供試汚染農場として協力体制を構築する。協力が得られ次第、当ワクチンを接種した鶏を導入する。その後、定期的に鶏舎のSE汚染度を調査することにより、SE汚染鶏舎の汚染低減について検証する。

(4) 中課題4：鶏舎構造等の生産方式の相違がサルモネラ汚染低減に及ぼす影響（野外試験を含む）

ウインドウレス鶏舎と開放鶏舎、飼育密度の違い、新築鶏舎と旧式鶏舎、サービスルームの有無など、構造的に異なるペア鶏舎のサルモネラ検査を実施し、サルモネラ汚染に関与する要素を明らかにする。また、汚染鶏舎に対し、一般衛生管理の改善、ワクチン接種、ギ酸を主成分とする資材の給与等を実施し、これらによるサルモネラ汚染鶏舎の汚染低減について検証する。

1) ギ酸を主成分とする資材によるサルモネラ汚染低減効果の検証

当試験は、当初計画にはなかったが、当該事業の進行中に実施課題運営チームとの協議の上、実施することとなった。協力農場においてサルモネラの事前調査を実施し、サルモネラ汚染が確認された農場との協力体制を構築する。汚染鶏舎

にギ酸を主成分とする資材の一つを飼料に添加し約 3 ヶ月間給与した後、定期的にサルモネラ検査を実施し、サルモネラ汚染低減効果を検証する。鶏舎 No.、試験区、検査時期は表 2 を参照のこと。

2) 鶏舎排気システムの相違によるサルモネラ汚染防止効果の比較検証

① 排気システムが異なる鶏舎間におけるサルモネラ汚染調査

協力農場との交渉の結果、異なる鶏舎排気システムについて、それぞれサルモネラ汚染効果の検証が可能である。すなわち、一般的な排気方式（鶏舎内から鶏舎外へファンにより排気）をとる鶏舎（一般型排気鶏舎）及び糞便輸送ベルトにフードを被せて 4 日間送風し、その空気を鶏舎外に排出させて換気を行っている鶏舎（フード型排気鶏舎）について、サルモネラ汚染の比較調査を実施する。サルモネラ検査材料は、鶏舎の 4 隅、中央付近から採材した鶏糞及び鶏舎の排気ファン付近に付着した塵埃とする。上記の比較試験の結果、サルモネラ汚染低減に関してフード型排気鶏舎の優位性が示唆された場合には、原因を明らかにするため、以下の 2 試験を実施する（25 年度新規追加試験）。

② サルモネラ汚染鶏舎における浮遊サルモネラ捕捉試験

一般型排気鶏舎においてサルモネラ汚染が起これば、鶏舎内の気流によって鶏糞表面のサルモネラが剥離し、鶏舎空中に浮遊することが予想され、SE において気道感染は証明されている。したがって、一般型排気システムにおいて実際にサルモネラの浮遊が証明されれば、フード型排気システムにおいてサルモネラが検出されないことの間接的証明となり得る。現在、鶏舎内のサルモネラ浮遊を実証した報告は見当たらないため、本事業において実施する。なお、ガーゼを用いた当サルモネラ捕捉試験は、以下の観点から鶏舎内サルモネラモニタリング方法として有用であると考えられる。①排出後の鶏糞は、一定時間内に清掃除去されるため、牽引スワブ法では検出できない可能性があるが、ガーゼ法では汚染が蓄積されるため、そのおそれがない。②ガーゼ法では、鶏舎全体の蓄積汚染度が反映されるため、定量的な扱いが可能である。

現在までに、サルモネラ汚染が確認されている鶏舎を複数確保しており、実施可能である。検査方法は以下のとおりである。金属製の枠（30センチ四方）に局方ガーゼを張ったものをサルモネラ捕捉器材とし、これを鶏舎内の稼動ファン前面に一定期間設置する。試験終了後、枠からガーゼを取り外し、検体とする。また、作業衣を着用した状態でサルモネラ捕捉器材を手に持ち、鶏舎内を一定時間歩行後、回収した作業衣及びガーゼについても検体とする。作業衣については、作業衣表面を湿らせたガーゼで拭い、これを検体とする。これらの検体をペプトン緩衝液に浸漬し、よく混和する。得られた溶液について、最確数（MPN）法によりサルモネラ検査を実施する。

③ 鶏糞の乾燥過程における鶏糞中サルモネラ消長試験

フード型排気システムの説明書及び当施設担当者の情報によれば、当システムでは、フード内に比較的強い気流が保たれており、鶏糞は運搬ベルト上を移動しながら、3日後には含水率が20%以下となる。

当過程における鶏糞の乾燥が鶏糞中のサルモネラの生存に影響している可能性が考えられるため、以下の試験を実験室レベルで実施し、検証する。SE及びSTをそれぞれ10羽の成鶏に経口投与し、別々の飼育室で飼育し、5日後にそれぞれ10羽から回収した各汚染糞便を検体とする。菌濃度が均一となるよう検体をよく混和後、8gの塊に成形し、適量の乾燥用シリカゲルとともに密閉容器に収容する。鶏糞の乾燥条件は、①急激乾燥（3日間で鶏糞含水率が20%以下に低下、当システムの乾燥過程に相当）、②緩慢乾燥（14日間で鶏糞含水率が20%以下に低下、参考試験）、③密閉状態（鶏糞含水率一定、対照試験）の3条件とする。これらの検体を各条件にて23℃で静置し、経時的に生菌数を測定する。試験期間中の鶏糞乾燥率とサルモネラ生菌数の推移を経時的に調べ、鶏糞の乾燥がサルモネラの消長に関与しているか検討する。この成績をもとに、サルモネラ汚染低減におけるフード型排気鶏舎の優位性を検証する。

3. 年次計画

項目	平成23年度	平成24年度	平成25年度
1. サルモネラワクチンの免疫持続期間等の有効性評価			
(1) 二価サルモネラ不活化ワクチンの免疫持続期間	接種後の経時的観察、抗体価測定、攻撃試験 (一財) 生物科学安全研究所		
(2) 三価サルモネラ不活化ワクチンにおける SI 防御免疫の持続期間		接種後の経時的観察、抗体価測定、攻撃試験 (一財) 生物科学安全研究所	
2. 誘導換羽 (IM) によるサルモネラ感染憎悪作用に対するワクチンと換羽代替飼料 (市販飼料) の効果		二価ワクチンによる効果試験、代替資料での効果試験 (一財) 生物科学安全研究所	
3. 採卵鶏農場におけるサルモネラ低減対策 (野外試験)			
(1) 三価サルモネラ不活化ワクチンによる鶏舎の SI 汚染の低減化 (野外試験)	サルモネラ汚染農場を発見し、協力を依頼、汚染調査開始、対策資材による試験開始、三価ワクチン接種による清浄化試験 (一財) 生物科学安全研究所		
(2) 二価サルモネラ不活化ワクチンによる鶏舎の SE 汚染の低減化 (野外試験)	SE 汚染農場を発見し、協力を依頼、汚染調査開始、二価ワクチン接種による清浄化試験 (一財) 生物科学安全研究所		
4. 鶏舎構造等の生産方式の相違がサルモネラ汚染低減に及ぼす影響 (野外試験を含む)	清浄農場、汚染農場の調査、対策資材 (サルキル) 投与、空中浮遊菌のリアルタイム定量的測定試験開始、鶏糞乾燥におけるサルモネラの消長試験 (一財) 生物科学安全研究所		
所要経費 (合計)	12,000 千円	12,000 千円	10,200 千円

4. 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者		エフォート (%)
研究総括者	(一財)生物科学 安全研究所	中村 政幸		50
1. サルモネラワクチンの免疫 持続期間等の有効性評価	同上	○	白石 力也	16
(1) 二価サルモネラ不活化ワ クチンの免疫持続期間	同上	△	江寄 英剛 (2011年4月 ～2012年1 月) 白石 力也 (2012年2月 ～)	前出
(2) 三価サルモネラ不活化ワ クチンにおける SI 防御免疫の 持続期間	同上	△	江寄 英剛 (2011年4月 ～2012年1 月) 白石 力也 (2012年2月 ～)	前出
2. 誘導換羽 (IM) によるサ ルモネラ感染憎悪作用に対す るワクチンと換羽代替飼料 (市 販飼料) の効果	同上	○	江寄 英剛 (2011年4月 ～2012年6 月) 白石 力也 (2012年7月 ～)	前出
3. 採卵鶏農場におけるサルモ ネラ低減対策 (野外試験)	同上	○	白石 力也	前出
(1) 三価サルモネラ不活化ワ クチンによる鶏舎の SI 汚染の 低減化 (野外試験)	同上	△	白石 力也	前出
(2) 二価サルモネラ不活化ワ クチンによる鶏舎の SE 汚染の 低減化 (野外試験)	同上	△	江寄 英剛 (2011年4月 ～2012年6 月) 白石 力也 (2012年7月 ～)	前出
4. 鶏舎構造等の生産方式の相 違がサルモネラ汚染低減に及 ぼす影響 (野外試験を含む)	同上	○	白石 力也	前出

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

Ⅱ. 研究実績報告

1. 中課題1：サルモネラワクチンの免疫持続期間等の有効性評価

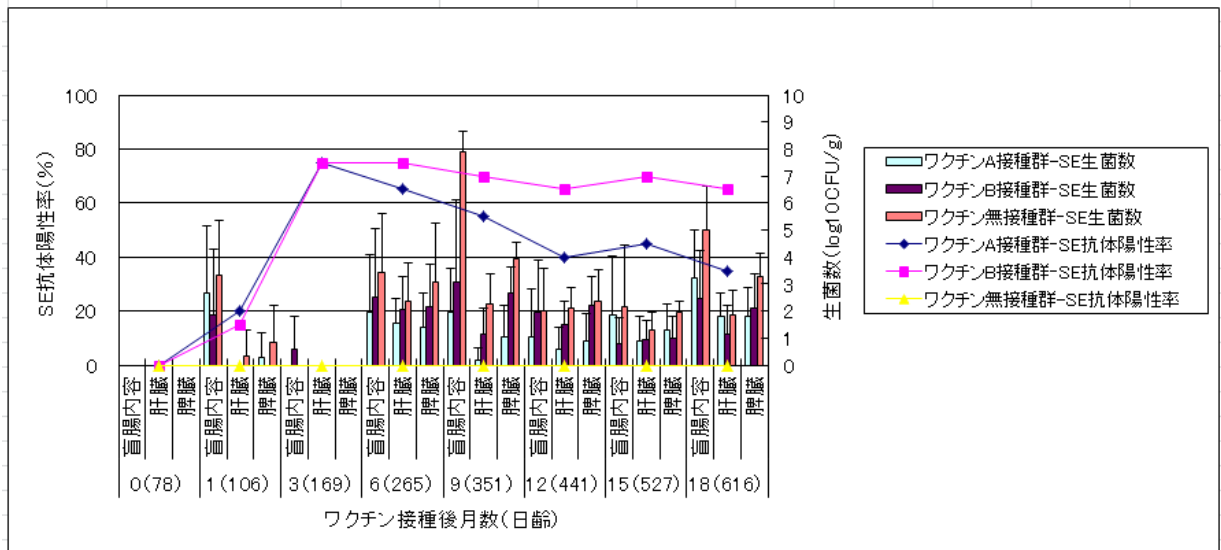
(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
2種類の二価サルモネラ不活化ワクチン（ワクチン A 及び B）接種鶏における抗体応答及びサルモネラ攻撃試験等の成績をもとに、当該ワクチンの免疫持続期間及びその有効性を農場レベルで評価（小課題1 関連）。（平成23年度～25年度）	試験成績を図1（SE）、図2（ST）にそれぞれ示す。 ワクチン A：協力農場の接種方法に従い、本ワクチンを0.5ドーズ接種した。攻撃試験では、接種後18ヶ月後まで、各組織材料ともにワクチン無接種対照群と較べて検出菌数が少ない傾向が認められ、ワクチン接種の排菌抑制効果（SE 及び ST）が示された。一方、抗体価では、SE 抗体は、接種後6ヶ月までは陽性率70%程度で維持されたが、9ヶ月目には免疫成立の目安である70%を下回り、以降は低下し続けた。また、ST 抗体はすべての調査時点で陽性率20%以下となった。なお、ワクチン非接種対照群においてはすべて抗体陰性であった。以上のように、攻撃試験の結果から、抗体価測定に用いた抗原がワクチン株と異なること、又はワクチンが用量どおりに接種されていなかったことが低い抗体価に影響したと考えられた。<u>（平成23年度～25年度）</u>。 ワクチン B：協力農場の接種方法に従い、本ワクチンを0.5ドーズ接種した。SE 抗体、ST 抗体とも、接種後18ヶ月まで、陽性率約70%を維持した。攻撃試験では、接種後18ヶ月後まで、各組織材料ともにワクチン接種の排菌抑制効果（SE 及び ST）が示された。なお、抗体価測定に使用した抗原は、ワクチン株と同一株であった。<u>（平成23年度～25年度）</u>。 以上より、ワクチン A 及び B ともに、攻撃試験の結果から、排菌数を抑制することが示された。

↓ 三価サルモネラ不活化ワクチンに対する抗体応答及びサルモネラ攻撃試験等の成績をもとに、当該ワクチンの免疫持続期間及びその有効性を農場レベルで評価（小課題 2 関連）。（平成 23 年度～25 年度）	上記の捕捉試験として、ワクチン B を 1 ドーズ接種したコマーシャル鶏について、同様の試験を実施したが、攻撃用サルモネラの定着性が悪く、評価することができなかった（平成 24 年度）（図表省略）。 【追】当試験において、ワクチン接種後 1 ヶ月時点の抗体産生が低いことが示唆され、接種日齢がその原因である可能性が指摘された。従って、当初計画にはなかったが、上記ワクチン B - SE 攻撃試験を実施し、ワクチン接種時期、接種量と免疫獲得時期の関連性を調べた（図 3）。その結果、ワクチン接種の週齢が高いほど、免疫獲得に必要な期間が短くなる可能性が示された。なお、週齢が若い場合でも、時間の経過とともに免疫が増強された。また、本調査期間における抗体陽性率は、必ずしもワクチン効果を反映しないことが示唆された（平成 25 年度）。 ↓ ワクチン C 接種後（1 ドーズ）、少なくとも 9 ヶ月まで、SI 抗体の陽性率は 90 % 以上の水準で推移した（図 4）。また、SI 攻撃（ワクチン接種後 11 ヶ月）に対し、1 及び 0.5 ドーズ接種ともに十分なワクチン効果が示された。ただし、誘導換羽（絶食法）を実施した場合には、1 ドーズ接種でも効果はみられなかった（図 5）（平成 25 年度）。
成果目標：サルモネラワクチンの有効性を農場レベルで明らかにすることにより、各種ガイドブック、手引書等の改訂に資することを目的とする。	

＜成果の概要の補足＞

図1 SE に対する二価サルモネラ不活化ワクチンの免疫持続性

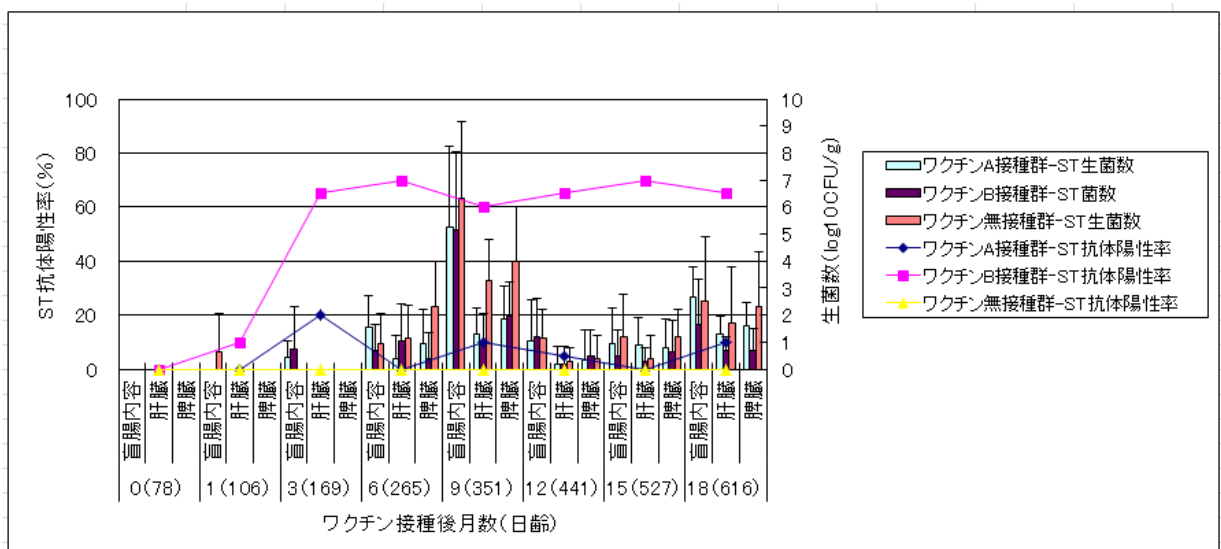


統計学的有意差 (t 検定) (vs. ワクチン無処置群)

P<0.05: 肝臓(AV) (9 ヶ月), 肝臓, 脾臓(AV)(6 ヶ月), 肝臓, 脾臓(AV)(12 ヶ月), 盲腸内容, 脾臓(OV)(18 ヶ月)

P<0.01: 肝臓(AV), 盲腸内容, 脾臓(AV, OV)(9 ヶ月), 脾臓(OV)(15 ヶ月), 盲腸内容(OV)(18 ヶ月)

図2 ST に対する二価サルモネラ不活化ワクチンの免疫持続性



統計学的有意差 (t 検定) (vs. ワクチン無処置群)

P<0.05: 肝臓(AV) (6 ヶ月), 脾臓(AV, OV)(6 ヶ月), 肝臓, 脾臓(AV, OV)(9 ヶ月)

P<0.01: 肝臓(OV)(9 ヶ月)

試験区	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
ワクチン接種時週齢	11	11	11	11	11	11	14	14	14	14	14	14
ワクチン接種コース ^a	1	0.5	0	1	0.5	0	1	0.5	0	1	0.5	0
SE攻撃時週齢	15	15	15	18	18	18	18	18	18	20	20	20

統計学的有意差 (SE排菌数、Tukey法)
 $P < 0.05$: A vs. B, A vs. D, A vs. F, A vs. K, A vs. L, C vs. I, E vs. I, E vs. J, J vs. K
 $P < 0.01$: A vs. G, A vs. H, B vs. E, D vs. I, E vs. F, E vs. L
 $P < 0.001$: A vs. C, B vs. D, C vs. E, D vs. F, D vs. L, F vs. K, G vs. I, H vs. I, I vs. K
 $P < 0.0001$: A vs. J, B vs. G, B vs. H, B vs. J, B vs. K, C vs. D, C vs. G, C vs. H, C vs. J, C vs. K, F vs. G, F vs. H, F vs. J, G vs. L, H vs. L, I vs. J, K vs. L, J vs. L

13

図4 SI に対する三価サルモネラ不活化ワクチンの免疫持続性 (SI 抗体価の推移)

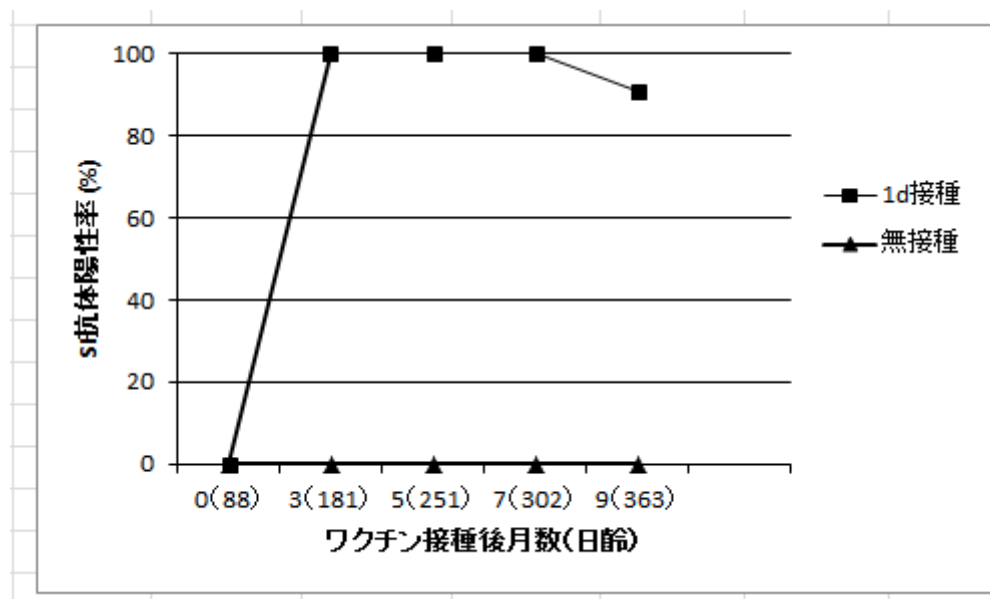
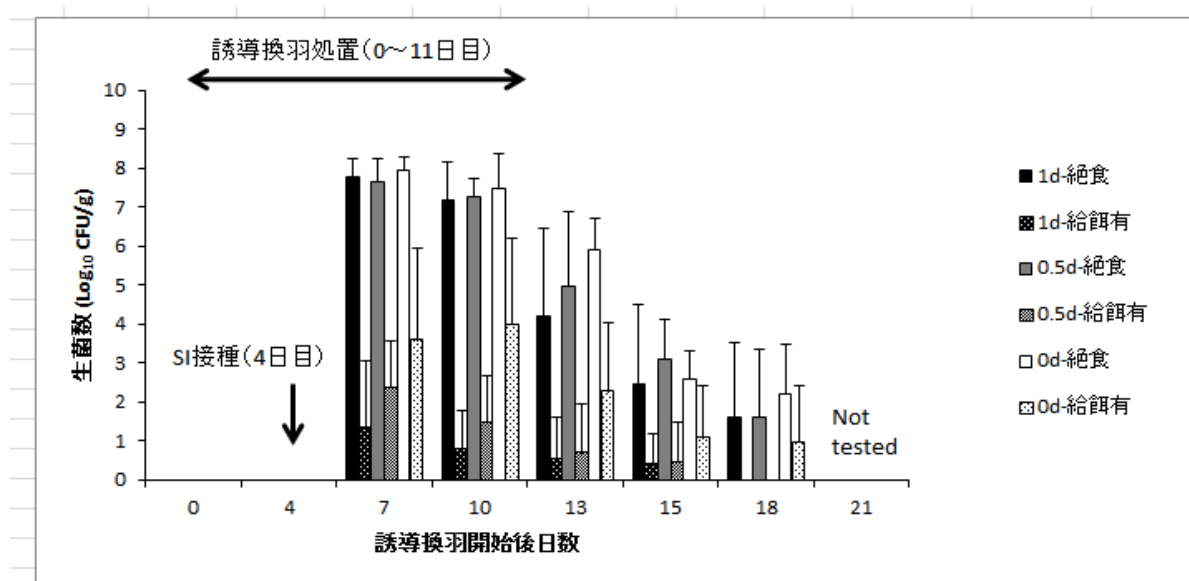


図5 SI に対する三価サルモネラ不活化ワクチンの免疫持続性 (SI 攻撃試験)



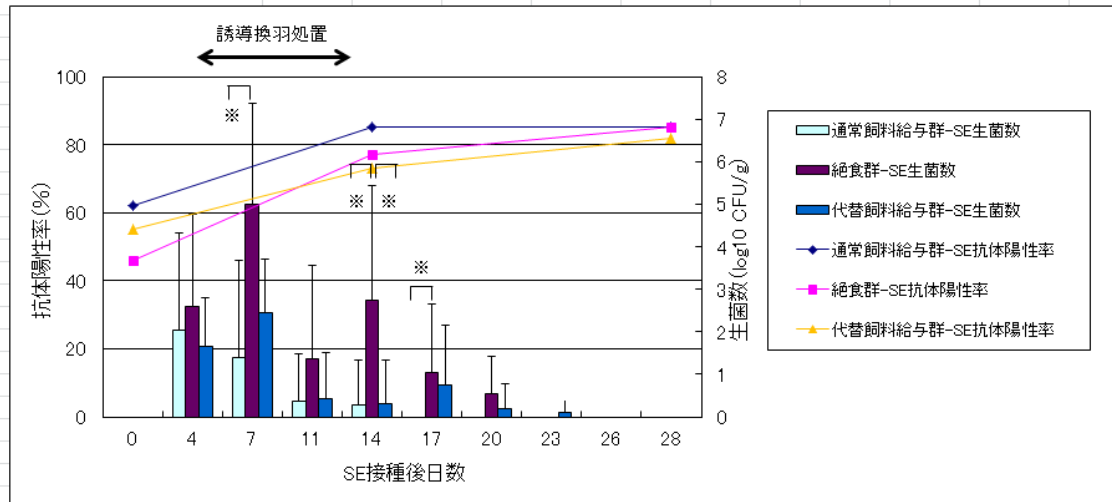
2. 中課題2：誘導換羽（IM）によるサルモネラ感染憎悪作用に対するワクチンと換羽代替飼料（市販飼料）の効果

（1）成果の概要

工程表	進捗状況・成果
誘導換羽（IM）によるサルモネラ感染憎悪作用に対するワクチン及び誘導換羽用代替飼料の効果を解明し、農場レベルでの対策方法を確立（平成23～24年度）。	サルモネラ不活化2価ワクチンを78日齢で接種後、農場にて預託飼育した供試鶏を生物科学安全研究所に導入し（463日齢）、SE攻撃後4～13日目に誘導換羽（絶食法又は代替飼料給与法）を実施した。体重及び産卵率の推移から、誘導換羽の成立を確認した（図表省略）。なお、通常飼料を給与した群をコントロール群とした。ワクチンA接種、ワクチンB接種及びワクチン無接種ともに、誘導換羽時（絶食法）においてはサルモネラ抑制効果が低く、抗体陽性率のみではワクチン効果が判断できないことが示された（図6～8）。一方、誘導換羽用代替飼料は、糞便中のサルモネラの菌量が絶食法よりも低く、通常飼料給与群の排菌数と同程度であった。このため、誘導換羽期のサルモネラ汚染に効果があることが示唆された（平成24年度）。
成果目標： 誘導換羽時におけるサルモネラ感染性の程度及びサルモネラワクチン及び換羽代替飼料の効果を農場レベルで明らかにすることにより、各種ガイドブック、手引書等の改訂に資することを目的とする。	

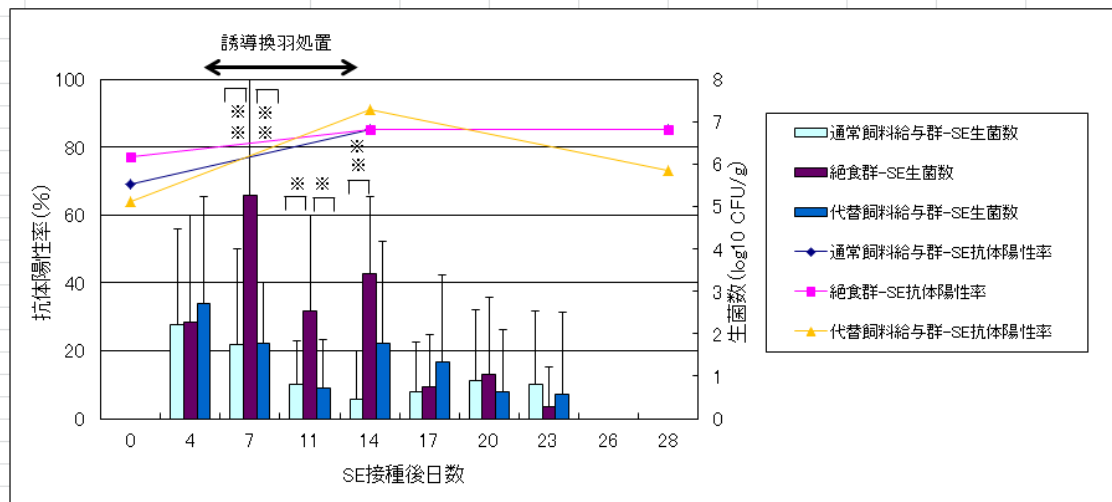
＜成果の概要の補足＞

図6 誘導換羽時の SE 感染に対する二価サルモネラ不活化ワクチンの効果
(ワクチン A)



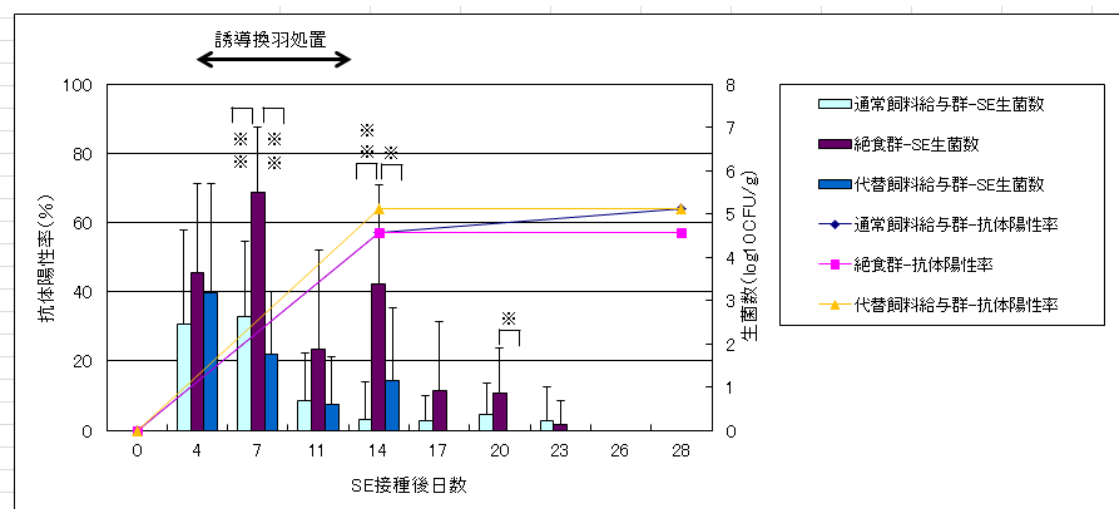
4～13日目に誘導換羽を実施した。※: $P < 0.05$ 、※※: $P < 0.01$

図7 誘導換羽時の SE 感染に対する二価サルモネラ不活化ワクチンの効果
(ワクチン B)



4～13日目に誘導換羽を実施した。※: $P < 0.05$ 、※※: $P < 0.01$

図8 誘導換羽時の SE 感染に対する二価サルモネラ不活化ワクチンの効果
(ワクチン無接種)



4～13日目に誘導換羽を実施した。※: $P<0.05$ 、※※: $P<0.01$

3. 中課題3：採卵鶏農場におけるサルモネラ低減対策

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
三価サルモネラ不活化ワクチンによるサルモネラ汚染採卵鶏舎の清浄化を農場レベルで検討し、サルモネラ対策効果を検証（小課題1関連）。（平成23～25年度） ↓ 二価サルモネラ不活化ワクチンによるSE汚染採卵鶏舎の清浄化を農場レベルで検討しSE対策効果を検証（小課題2関連）。（平成23～25年度）	サルモネラ O7 群汚染農場において、2013年3月にワクチン C を接種後、1ヶ月ごとに鶏舎のサルモネラ（O7 群）の汚染状況を調査した（表1）。2013年6月から8月にかけて検出率が上昇し、その後も検出が続いたことから、当ワクチンの接種と鶏舎内汚染の低減について判断するには至らなかった（平成25年度）。 ↓ SE 汚染農場の確保に至らず、未着手。
成果目標：サルモネラワクチン等の対策資材による SI 及び SE を対象とした汚染低減技術を農場レベルで確立することにより、各種ガイドブック、手引書等の改訂に資することを目的とする。	

<成果の概要の補足>

表1 サルモネラ O7 群汚染農場における三価サルモネラ不活化ワクチンの接種効果

材料	サルモネラ検出成績									
	2013年 3月上旬	2013年 4月上旬	2013年 5月上旬	2013年 6月上旬	2013年 7月上旬	2013年 8月中旬	2013年 9月上旬	2013年 10月上旬	2013年 11月上旬	2013年 12月上旬
塵埃	1/2	1/2	1/2	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1
糞便	0/5	0/5	0/5	3/5	4/5	4/4	2/4	1/4	0/4	1/4
検出検体数/検査検体数										

4. 中課題4：鶏舎構造等の生産方式の相違がサルモネラ汚染低減に及ぼす影響（野外試験を含む）

（1）成果の概要

工程表	進捗状況・成果
1) ギ酸を主成分とする資材によるサルモネラ汚染低減効果の検証 ↓ 2) 鶏舎排気方式の違いとサルモネラ汚染度の相関確認試験（平成23～25年度） ① 鶏舎内浮遊サルモネラの実証とその定量化（平成24～25年度）	2012年1月から、対象鶏舎においてサルモネラの出現状況をモニタリングしたが、試験終了時までサルモネラ汚染が発生しなかった（表2）。この間、2012年4月～6月の3ヶ月間、ギ酸を主成分とする資材を給与したが、その後、無給与対照群においてもサルモネラが検出されず、評価ができなかった。なお、モニタリング開始以降、対象鶏舎の衛生対策が若干変更されていたことから（踏み込み消毒槽の交換回数の増加）、このような些細な衛生対策が影響した可能性がある（平成23～25年度）。 ↓ フード型排気及び一般型排気を有する各鶏舎を確保し、3ヶ月毎に計5回サルモネラ検査を実施した。その結果、一般型排気に比べ、フード型排気での検出率が低いことが示された（表3）（平成23～24年度）。このため、一般型排気鶏舎において、実際にサルモネラの浮遊が起こり得ることを証明するため、コマーシャル農場においてサルモネラの捕捉調査を実施した。その結果、捕捉期間を8週間とした場合でもサルモネラは検出されなかった（図表省略）。ただし、実験室レベルでの試行試験では、サルモネラ、大腸菌群、一般生菌ともに浮遊が確認されたことから（図表省略）、当該コマーシャル鶏舎においてサルモネラの浮遊がなかったものと結論された（平成23～24年度）。鶏舎内のサルモネラ浮遊状況についてさらに調査するため、鶏舎排気ファンの付着塵埃

	を検体としたサルモネラ汚染度の定量化を試みた。その結果、サルモネラ、大腸菌群、一般生菌ともに捕捉、定量することができ、本法を用いることで、一定期間を対象とした鶏舎サルモネラ汚染度の定量化が可能であると結論された（表 4：サルモネラ、表 5：大腸菌群、一般生菌）。ただし、フード型排気鶏舎と一般型排気鶏舎の間で、捕捉菌数に差がみられなかったことから、フード型排気によるサルモネラ浮遊抑制効果は判断できなかった（平成 25 年度）。
↓ ②フード型排気による鶏糞中のサルモネラ低減効果の検証	↓ フード型排気鶏舎（3 鶏舎）から乾燥過程の鶏糞を採材し、その含水率とサルモネラ、大腸菌群、一般生菌数を調べたところ、含水率と各生菌数の間に相関性が認められた（図 9～11）。従って、フード型排気には、排出鶏糞中のサルモネラ増殖を抑制させる効果があるものと結論された（平成 25 年度）。追加試験として、排出鶏糞の含水率とサルモネラの消長を実験室レベルで調べた。含水率推移の推移は以下(a)～(e)の 5 条件とした。 (a) 23℃で 4 日間かけ含水率 15%まで低下、(b) 37℃で 4 日間かけ含水率 15%まで低下、(c) 23℃で 35 日間かけ含水率 15%まで低下、(d) 開始以降の 35 日間、含水率 70%で維持、(e) 開始以降の 35 日間、当初の含水率を維持。その結果、①鶏糞を急激に強制乾燥させると増殖できず、②気温が 23℃以上であれば一定期間増殖可能なことが明らかとなった（図 12）。このことから、フード型排気によるサルモネラ増殖抑制効果は、鶏糞の迅速乾燥によって得られる可能性があること示された（平成 24～25 年度）。また、鶏舎内で排出された鶏糞を出

	来るだけ速やかに除去することが、サルモネラの汚染低減に効果があると考えられた。
成果目標：鶏舎構造等の生産方式の相違がサルモネラ汚染低減に及ぼす影響を農場レベルで解明することにより、各種ガイドブック、手引書等の改訂に資することを目的とする。	

<成果の概要の補足>

表2 サルモネラ汚染農場におけるギ酸を主成分とする資材の効果

材料	鶏舎No.	試験区	サルモネラ検出成績							
			2011年 8月中旬	2012年 1月下旬	2012年 2月下旬	2012年 3月下旬	2012年 4月中旬	2012年 5月中旬	2012年 6月中旬	2012年 7月中旬
糞便	7-1	ワクチン接種区	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
糞便	7-1	無処置区	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
糞便	7-2	資材給与区	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
塵埃	7-1	ワクチン接種区	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
塵埃	7-1	無処置区	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
塵埃	7-2	資材給与区	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
卵殻	7-1	ワクチン接種区	NT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
卵殻	7-1	無処置区	NT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
卵殻	7-2	資材給与区	NT	NT	ND	ND	ND	ND	ND	ND

材料	鶏舎No.	試験区	サルモネラ検出成績								
			2012年 8月上旬	2012年 9月上旬	2012年 10月上旬	2012年 11月上旬	2012年 12月上旬	2012年 12月下旬	2013年 1月下旬	2013年 2月下旬	2013年 6月上旬
糞便	7-1	ワクチン接種区	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
糞便	7-1	無処置区	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
糞便	7-2	資材給与区	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
塵埃	7-1	ワクチン接種区	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
塵埃	7-1	無処置区	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
塵埃	7-2	資材給与区	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
卵殻	7-1	ワクチン接種区	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
卵殻	7-1	無処置区	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
卵殻	7-2	資材給与区	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2012年4月から2012年6月までの3ヶ月間、資材を投与した(オレンジで塗った箇所)。											
+: サルモネラが検出されたことを示す。											
ND: 検出されず											
NT: 検査せず											

表3 鶏舎排気方式の違いとサルモネラ汚染度

換気方式	材料	サルモネラ検出結果				
		2011年 8月	2011年 11月	2012年 2月	2012年 5月	2012年 8月
フード型排気	塵埃	0/2 ^a	0/2	0/2	1/2	0/2
	糞便	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
一般型排気	塵埃	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2
	糞便	2/5	2/5	0/5	3/5	5/5
a: 陽性検体数/調査検体数						

表4 鶏舎排気方式の違いとサルモネラ汚染度（定量試験）

鶏舎換気方式	陽性管数(3本法)			MPN/10g
	10g	1g	0.1g	
フード型-1	3	3	3	≥2400
フード型-2	3	2	0	93
フード型-3	0	0	0	<3
一般型-1	2	0	0	9
一般型-2	3	1	0	43
一般型-3	3	0	1	39

表5 鶏舎排気方式の違いと大腸菌群、一般生菌による汚染度（定量試験）

鶏舎排気方式	一般生菌	大腸菌群	サルモネラ
フード型-1	7.87	6.24	ND
フード型-2	7.01	4.96	ND
フード型-3	6.74	4.39	ND
鶏舎平均	7.21	5.20	0.00
一般型-1	6.63	5.35	ND
一般型-2	6.80	5.43	ND
一般型-3	6.60	5.21	ND
鶏舎平均	6.68	5.33	0.00
ND: Not detected			

図9 フード型排気鶏舎の排出鶏糞中における各菌数の推移（鶏舎 - 1）

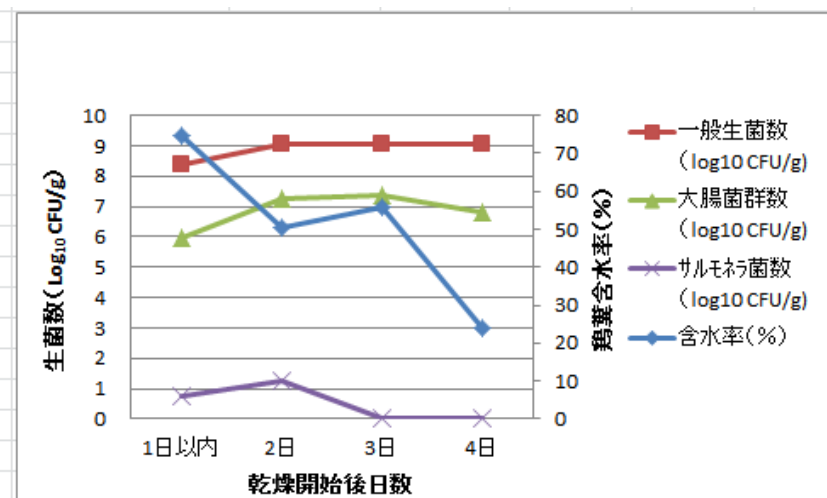


図10 フード型排気鶏舎の排出鶏糞中における各菌数の推移（鶏舎 - 2）

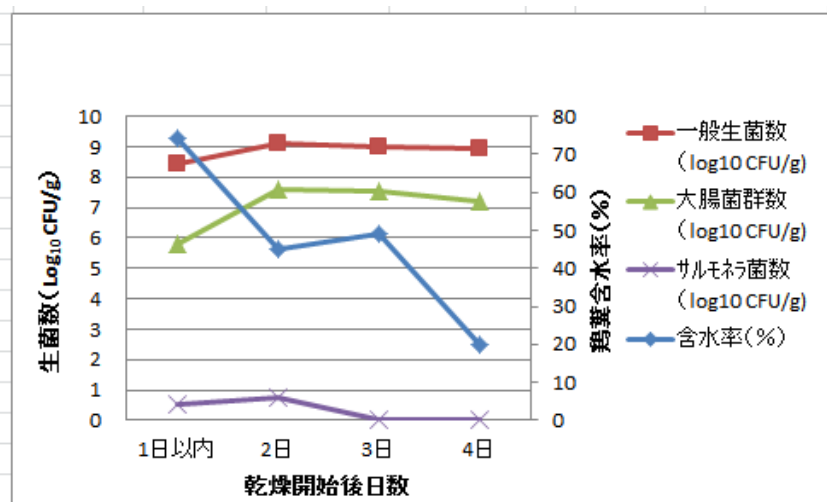


図1 1 フード型排気鶏舎の排出鶏糞中における各菌数の推移（鶏舎 - 3）

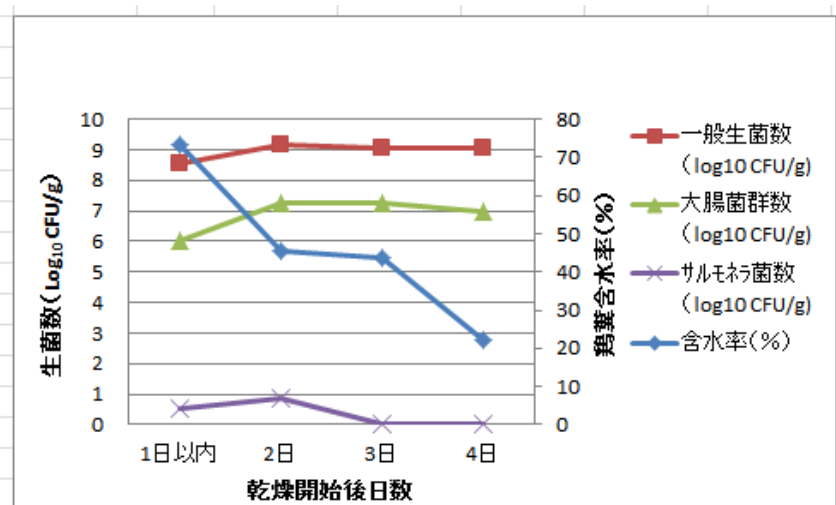
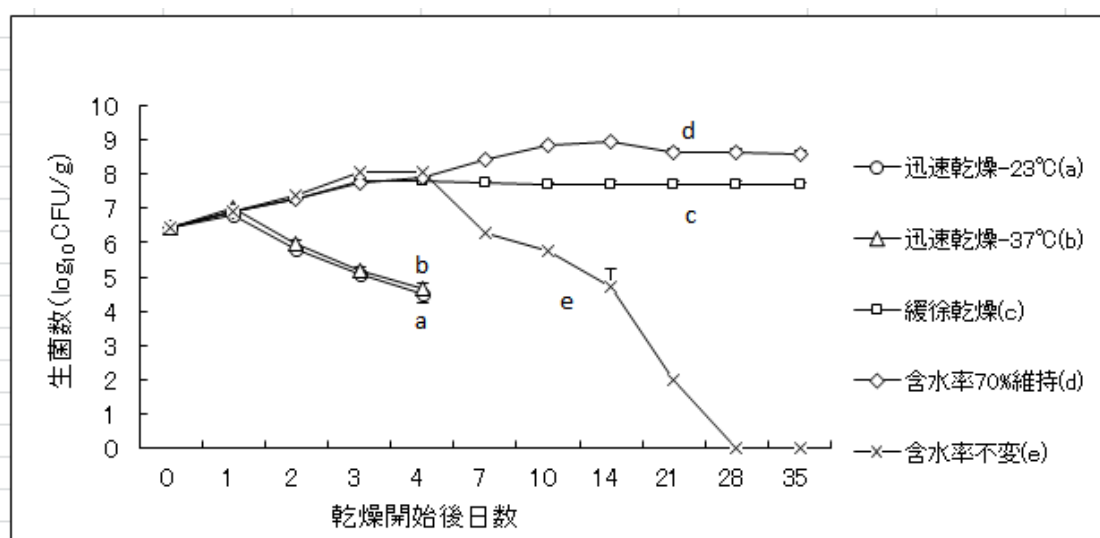


図1 2 様々な鶏糞乾燥パターンに伴うサルモネラ増殖性の比較



Ⅲ. 主要な成果

1. 成果の内容

- 1) 農場レベルにおける市販サルモネラ不活化ワクチン効果の評価（平成25年度）
市販のサルモネラ不活化ワクチン（2銘柄）について、少なくとも誘導換羽期までSE、ST及びSIに対する免疫効果の持続が、農場レベルで明らかにされた（p10）。
- 2) ワクチン接種方法（接種時期、接種量）と免疫獲得時期の関係解明（平成25年度）
サルモネラ不活化ワクチンの接種時期、接種量と免疫獲得時期の関係を明らかにしたことにより、育成農場から採卵農場への最適な移動時期を検討するための基礎情報が得られた（p11）。
- 3) 誘導換羽時のサルモネラ感染に対する市販サルモネラ不活化ワクチンと誘導換羽用代替飼料の効果の評価（平成24、25年度）
市販のサルモネラ不活化ワクチン（2銘柄）について、換羽誘導時における排出菌数の低下が、農場レベルで明らかにされた（p11、15）。
- 4) 鶏舎サルモネラ汚染度の定量化（平成25年度）
鶏舎排気ファン付着塵埃中のサルモネラ菌数の定量が実証されたことから、この方法により、一定期間における鶏舎サルモネラ汚染度の定量化が可能となった（p20）。
- 5) 鶏糞乾燥処理型鶏舎（フード型排気鶏舎）におけるサルモネラ汚染軽減効果の実証（平成25年度）
鶏糞の迅速乾燥工程中に、サルモネラの増殖抑制又は死滅効果がもたらされることが実証された（p20）。
- 6) 鶏舎内残存鶏糞におけるサルモネラ汚染拡大リスクの評価（平成25年度）
サルモネラ汚染鶏糞を様々な乾燥条件下に静置し、その消長を調べたところ、少なくとも気温23～37℃、鶏糞含水率70%以上の条件において一定期間増殖する可能性があることが認められた。このことから、鶏舎内に排出された鶏糞は可能な限り速やかに除去する必要性が明らかとなった（p20）。

2. 成果の活用

現時点では、活用実績なし

IV. 論文、特許等の実績等

別紙のとおり

論文、特許等の実績等

学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
タイトル:採卵鶏農場における誘導換羽とサルモネラ不活化ワクチンの効果持続 発表者名:○中村政幸、山崎裕子、白石力也 学会名:第156回日本獣医学会 発表年月:2013年9月	生物科学安全研究所
タイトル:誘導換羽期のサルモネラ感染に対するサルモネラ不活化ワクチン効果 発表者名:○白石力也、山崎裕子、中村政幸 学会名:第156回日本獣医学会 発表年月:2013年9月	生物科学安全研究所

出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名