

## 採卵鶏飼養施設で発生した鶏ボツリヌス症

県央家畜保健衛生所

猪瀬 早紀      矢島 真紀子  
伊藤 咲      近内 将記  
小菅 千恵子    仲澤 浩江  
英 俊征

### はじめに

鶏ボツリヌス症は、グラム陽性偏性嫌気性桿菌である*Clostridium botulinum* C型菌（以下、ボツリヌスC型菌）が産生する神経毒素による致死性の高い疾病である。発生にはストレスが影響されるとされ、鶏が経口的に菌を摂取すると、盲腸内に定着して毒素を産生し、その毒素は盲腸および食糞により十二指腸から吸収され、体内に蓄積される。毒素の血中濃度が一定レベルを超えると発症するとされ、呼吸筋の弛緩性麻痺による呼吸困難で死亡する<sup>1)</sup>。急死の他に、脚や翼の麻痺・背部の脱羽が見られ、解剖学的な特徴所見や病変はない。疫学的に平飼いのブロイラーに好発するとされ、血清や消化管内容物等からの毒素を検出することで診断する<sup>2)</sup>。

毒素は抗原性の違いにより、A～Gの7種類の存在が知られているが、ボツリヌスC型菌やD型菌では、一部構造が入れ替わった「モザイク毒素」産生株が報告されており、鳥類のボツリヌス症はボツリヌスC型菌が産生するC/Dモザイク型毒素が主な原因となることが示唆されている<sup>3)</sup>。毒素型別ではC型毒素かD型毒素かを判別するが、C/Dモザイク型毒素は抗D型血清でも中和・一部中和されることがあり、PCR検査によりC/Dモザイク型毒素であることが判明する。

今回、採卵鶏飼養施設において鶏ボツリヌス症を確認したので、その概要について報告する。

### 発生の概要

発生施設は、採卵鶏約950羽を平飼いの8鶏舎で飼養していた。令和4年5月、3鶏舎において死亡羽数の増加を主訴とした検診依頼があった。鶏舎では死亡鶏と沈うつ鶏が鶏舎全体に散在し、鳥インフルエンザ様症状はなく、A型鳥インフルエンザを簡易検査により否定した。死亡、沈うつ鶏には、背

部の脱羽が見られた。症状が見られた3鶏舎（A鶏舎・B鶏舎・C鶏舎）の衰弱鶏8羽及び死亡鶏1羽（各鶏舎3羽）を、病性鑑定に供した。

## 一般病性鑑定 材料と方法

### 1 材料

3 鶏舎の衰弱鶏 8 羽、死亡鶏 1 羽（A 鶏舎：No. 1～3、B 鶏舎 No. 4～6、C 鶏舎：No. 7～9）について、病理学的検査、ウイルス学的検査及び細菌学的検査に供した。

### 2 方法

#### (1) 病理学的検査

##### ア 病理解剖学的検査

衰弱鶏及び死亡鶏について、外貌検査及び剖検を実施した。

##### イ 病理組織学的検査

採材した材料について 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いパラフィン切片を製作し、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。

#### (2) ウイルス学的検査

各臓器乳剤（気管・肺プール、腎臓、肝臓、直腸便）について、発育鶏卵を用いたウイルス分離（7日間、3代）を実施した。

#### (3) 細菌学的検査

脳、肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓について、常法に従い 5%羊血液寒天培地及びDHL寒天培地を用いて好気条件下で 37℃、48 時間、5%羊血液寒天培地を用いて、CO<sub>2</sub>10%条件下で 37℃、48 時間培養した。

## 一般病性鑑定 結果

### 1 病理解剖学的検査

外貌検査では、体重は 1.5～2 kg (No. 1～9)であり、直腸脱 (No. 5, 6, 9)、切創 (No. 1, 9)、全身性の脱羽 (No. 6) 及び背部の脱羽 (No. 1, 2, 3, 9) が認められた (写真 1)。



写真1 No. 3 外貌

剖検では、胸腺の退縮（No. 1～9）、ファブリキウス嚢の退縮（No. 1～8）、線虫寄生（No. 1～4, 6）、条虫寄生（No. 2）が認められた。しかし、沈うつ・死亡に関与するような著変は認められなかった。

## 2 病理組織学的検査

腹膜炎（No. 1～5, 8）が複数例で見られたが、いずれも局所的で軽微なものであった。腺胃炎（No. 3）が1羽で見られたが、陰窩膿瘍とそれが進展した肉芽腫により構成されたもので、特定の疾病を示す病変ではなかった。線虫寄生ないし疑い（No. 1～3, 5～8）及び条虫寄生（No. 2, 3, 6）が見られたが沈うつや死亡に関与する程度の所見ではなかった。

## 3 ウイルス学的検査

いずれの検体でも胚異常は認められなかった。

## 4 細菌学的検査

いずれの検体からも有意な細菌は分離されなかった。

## ボツリヌス検査 材料と方法

稟告及び病理解剖学的検査から鶏ボツリヌス症を疑い、一般検査に並行して、農研機構動物衛生研究部門の定める「C型及びD型ボツリヌス診断プロトコール」（以下、プロトコール）<sup>4)</sup>に準じたボ

ツリヌス検査を実施した。当所では被検材料を増菌培養し、毒素を検出する方法（毒素検査・毒素型別）を実施している。また、毒素型別後に、詳細な遺伝子型を判別可能な毒素遺伝子型別（PCR検査）を実施した（図1）。

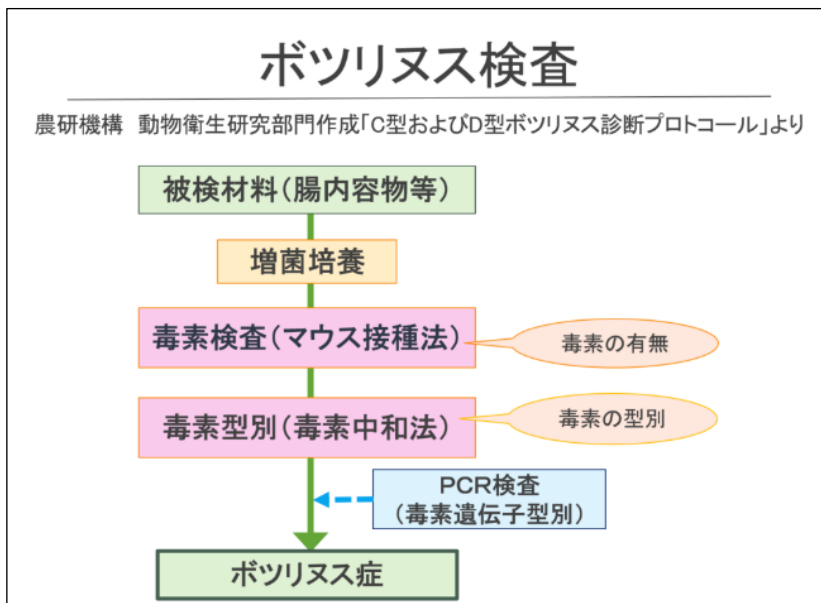


図1 ボツリヌス検査の流れ

## 1 材料

3 鶏舎の衰弱鶏 7 羽、死亡鶏 1 羽（A 鶏舎：No. 1～3、B 鶏舎 No. 4～6、C 鶏舎：No. 7～8）の盲腸内容物を検査に供した。

## 2 方法

### (1) 増菌培養

検体を強化クックドミート培地に接種後、75℃15分加熱し、37℃5日間嫌気培養した。

### (2) 毒素検査（マウス接種法）

4倍希釈した培養液を1検体当たり2匹のマウス腹腔内に接種し、最長4日間観察した。腹部陥凹・後肢麻痺・呼吸困難等の特徴所見を呈して死亡したものを毒素陽性と判定した。

### (3) 毒素型別（毒素中和法）

毒素陽性の検体のうち、各鶏舎から1検体ずつ選抜し（No. 2, 6, 7）、培養液を最終濃度4倍となるように以下の材料と混合・処理した。処理した材料をマウス腹腔内に接種し、特徴所見及び生死を観察した。

#### ① 希釈液と混合（無処理）

② 希釈液と混合し、100°C10分加熱（毒素が易熱性であることの確認）

③ 抗C型血清と混合

④ 抗D型血清と混合

(4) PCR検査（毒素遺伝子型別）

培養液を継代した検体をDNA抽出し、プロトコール<sup>4)</sup>に準じたPCR法による毒素遺伝子の型別を実施した。

## ボツリヌス検査 結果

### 1 毒素検査

No.7の2匹中1匹を除いて、特徴所見（腹部陥凹・後肢麻痺・呼吸困難）（写真2）を示して死亡したことから、全検体で毒素陽性と判定した（表1）。

表1 毒素検査結果

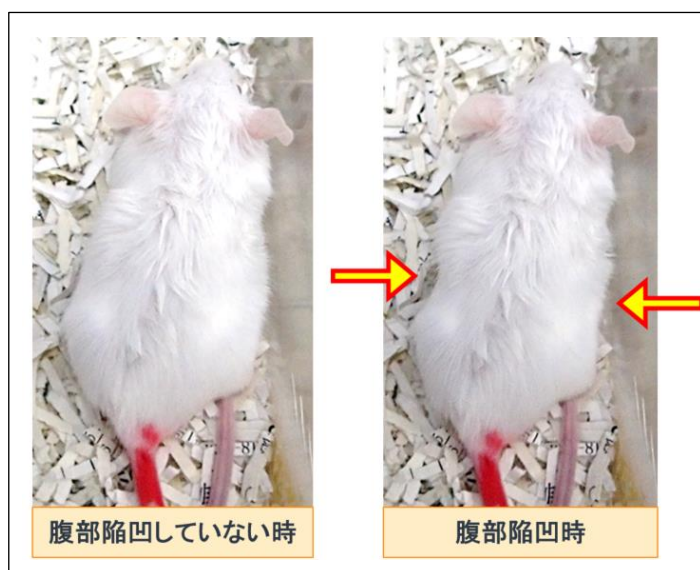


写真2 No.6 接種マウス

鶏舎	鶏	結果	
		生死	死亡時間
A	No.1	死亡	6.5時間
		死亡	9時間
	No.2	死亡	4時間
		死亡	9~23時間
	No.3	死亡	9~23時間
		死亡	5時間
B	No.4	死亡	6.5時間
		死亡	7.5時間
	No.5	死亡	9~23時間
		死亡	9~23時間
	No.6	死亡	6.5時間
		死亡	3.5時間
C	No.7	生存	生存
		死亡	4時間
	No.8	死亡	7.5時間
		死亡	7.5時間

### 2 毒素型別

希釈液と混合した無処理の検体（表2-①）を接種したマウスはすべて死亡し、希釈液と混合し加熱した検体（表2-②）を接種したマウスはすべて生存した。このことからボツリヌス毒素の性質である易熱性であることを確認した

No. 2 の検体は、抗C型血清と混合した検体で生存、抗D型血清と混合した検体で時間延長を伴う死亡が見られたことから、毒素は抗C型血清で中和された。

No. 6 の検体は、抗C型（表 2-③）・抗D型血清（表 2-④）と混合した検体で、どちらも時間延長を伴う死亡が見られ、No. 7 の検体は、どちらも生存した。

C/Dモザイク型毒素では、抗D型血清でも毒素が中和・一部中和されることがあるため、抗D型血清と混合した検体でも死亡時間の延長や、生存が見られることがある。

以上から、No. 2 のみがC型毒素と判定という結果となるが、3 検体共に抗C型・抗D型血清で死亡時間の延長または生存が見られたことから、すべての検体でC/Dモザイク型毒素を示唆する結果であった（表 2）。

表 2 毒素型別結果

鶏舎	鶏	接種内容	結 果		
			生死	死亡時間	
A	No.2	①無処理	死亡	3.5時間	抗C型血清で生存 抗D型血清で 死亡時間の延長
		②加熱	生存		
		③抗C型血清と混合	生存		
		④抗D型血清と混合	死亡	8~22時間	
B	No.6	①無処理	死亡	5~6時間	抗C型・抗D型血清で ともに死亡時間の延長
		②加熱	生存		
		③抗C型血清と混合	死亡	8~22時間	
		④抗D型血清と混合	死亡	6.25時間	
C	No.7	①無処理	死亡	7.5時間	抗C型・抗D型血清で ともに生存
		②加熱	生存		
		③抗C型血清と混合	生存		
		④抗D型血清と混合	生存		

C型  
(C/Dモザイク?)

C/Dモザイク?

C/Dモザイク?

### 3 PCR検査（毒素遺伝子型別）

No. 2~7 の 6 検体でC/Dモザイク型毒素を検出した。No. 1 は検出限界以下、No. 8 は判定不能であった（表 3）。

表3 PCR検査（毒素遺伝子型別）結果

鶏舎	鶏	結果
A	No.1	—
	No.2	C/Dモザイク型毒素
	No.3	C/Dモザイク型毒素
B	No.4	C/Dモザイク型毒素
	No.5	C/Dモザイク型毒素
	No.6	C/Dモザイク型毒素
C	No.7	C/Dモザイク型毒素
	No.8	判定不能

—:検出限界以下

#### 検査結果のまとめ及び診断

##### 1 一般病性鑑定

病理解剖学的検査より、背部の脱羽(No. 1, 2, 3, 9)が特徴的であったが、他に沈うつ・死亡に関与する著変は認められなかった。また、病理組織学的検査、ウイルス学的検査及び一般細菌検査においても、沈うつ・死亡に関与する感染症の所見は認められなかった。

##### 2 ボツリヌス検査

毒素検査では、No. 1～8 の全検体において、毒素陽性と判定した。

毒素型別では、No. 2 はC型、同時に No. 2, 6, 7 すべてにおいてC/Dモザイク型毒素を示唆する結果となった。

PCR検査ではNo. 2～7 でC/Dモザイク型毒素陽性となった（表4）。

##### 3 診断

稟告の死亡羽数の増加や検査結果から、総合的に本症例はボツリヌスC型菌が産生するC/Dモザイク型毒素による鶏ボツリヌス症であると診断した。

表4 ボツリヌス検査結果まとめ

鶏舎	鶏	材料	毒素検査	毒素型別検査	PCR検査
A	No.1	盲腸内容 培養液	+	NT	—
	No.2		+	C型 (C/Dモザイク型?)	C/Dモザイク型
	No.3		+	NT	C/Dモザイク型
B	No.4	盲腸内容 培養液	+	NT	C/Dモザイク型
	No.5		+	NT	C/Dモザイク型
	No.6		+	C/Dモザイク型?	C/Dモザイク型
C	No.7	盲腸内容 培養液	+	C/Dモザイク型?	C/Dモザイク型
	No.8		+	NT	判定不能

NT:実施せず    —:検出限界以下

#### まとめ及び考察

採卵鶏を平飼いで飼養する施設において、死亡羽数の増加や沈うつが見られ、背部の脱羽の他に死亡・沈うつに関与する著変は認められなかった。一般病性鑑定でも感染症の関与は認められず、ボツリヌス検査により、ボツリヌスC型菌が産生するC/Dモザイク型毒素による鶏ボツリヌス症と診断した。

本疾病は食糞やストレスが影響するとされ、病原体を持ち込まない対策と、適切な飼養管理が疾病予防に重要である。

鶏ボツリヌス症は農林水産省の統計によると、年間数例の発生が見られるが、一般的に平飼いのブロイラーで発生報告が多いとされている。本県はケージ飼養の採卵鶏飼養施設の割合が多く、これまでに把握した範囲で、県内での発生事例はなかった。今後、アニマルウェルフェアの観点から、平飼いが増加する可能性もあり、本症例のように、平飼いの採卵鶏飼養施設においても、鶏ボツリヌス症の発生があることを勘案し、病性鑑定を実施することが重要と考える。



## 謝辞

最後に、多大なるご助言を賜りました、大阪公立大学大学院獣医学研究科獣医感染症学教室幸田知子先生に深謝いたします。

## 引用文献

- 1)岡本嘉六、佐藤憲一、足立雅之、中馬猛久：日獣会誌、52、159-163（1999）
- 2)全国家畜衛生職員会：農林水産省消費・安全局監修 病性鑑定マニュアル、第4版、422-424（2016）
- 3)小崎俊司：日生研たより、No. 583、4-8(2013)
- 4)国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門：C型およびD型ボツリヌス診断プロトコール（2012年8月改訂版）（2012）