

ブロイラーにおける鶏ボツリヌス症の発生事例

家畜衛生試験場 ○中尾 聡子、荒木 美穂
 北部家畜保健衛生所 砂川 真紀、杉山 明子

【はじめに】

鶏ボツリヌス症は *Clostridium botulium* C 型菌の産生する毒素によって起こる疾病で、本菌は芽胞を形成して土壌などに広く分布している。その発生機序はボツリヌス菌の盲腸内定着とボツリヌス毒素の吸収により、血中内毒素濃度が一定レベルを超えると発症すると言われており、主な症状は脚・翼・頸・眼瞼の麻痺、くびを垂れ嗜眠状態、背部の脱羽、黄白色下痢が上げられる。2012 年 7 月に 45 日齢のブロイラーの死亡羽数が増加し、病性鑑定の結果鶏ボツリヌス症と診断されたので、その概要について紹介する。

発生農場は沖縄本島北部のブロイラー養鶏農場で約 10 万羽を飼養、発症鶏の品種はチャンキーで開放式の平飼い鶏舎で飼養していた(図 1)。

発生農場の概要

- ・ 発生農場: 沖縄本島北部のブロイラー養鶏農場
- ・ 飼養羽数: 約10万羽飼養
- ・ 品種: チャンキー
- ・ 飼養形態: 開放式、平飼い



発生鶏舎内部の様子



鶏舎外部の様子

図 1. 発生農場の概要

【発生概要】

7 月 25 日に A 鶏舎で死亡鶏が増加し始め、7 月 30 日には 102 羽、その後 4 日間 70 ~ 90 羽の死亡が続き、8 月 4 日に 131 羽が死亡した後、死亡数は徐々に減少した。隣接する B 鶏舎でも 7 月 25 日から 10 ~ 20 羽の死亡が続き、8 月 7 日には 79 羽が死亡し、その後 2 日間 50 羽前後の死亡が続いた後、死亡数は減少した(図 2)。

発生と死亡羽数の推移

45日齢ブロイラーの死亡羽数増加

- ・ 7月25日 23号鶏舎での死亡鶏増加
- ・ 7月30日 23号鶏舎で死亡羽数102羽、その後70~90羽の死亡羽数で推移
- ・ 8月4日 23号鶏舎で死亡羽数131羽、その後終息に向う
- ・ 8月7日 22号鶏舎での死亡羽数79羽、その後徐々に終息に向う

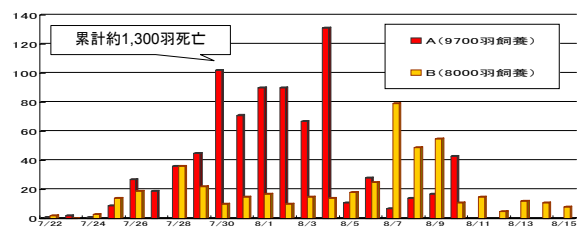


図 2. 発生と死亡羽数の推移

【臨床症状】

多い日で一日に 100 羽前後の死亡が見られ、発症鶏は頸を垂れて嗜眠状態を呈し、背部の脱羽も見られた(図 3)。

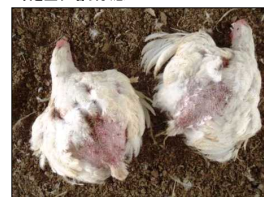
臨床症状



死亡羽数の増加



頸を垂れ嗜眠状態



背部の脱羽

図 3. 臨床症状

【剖検所見】

剖検所見では主要臓器に特に異常は認められず、小腸、盲腸の腫大と充出血、黄褐色内容物の貯留が見られたのみだった(図 4)。

剖検所見

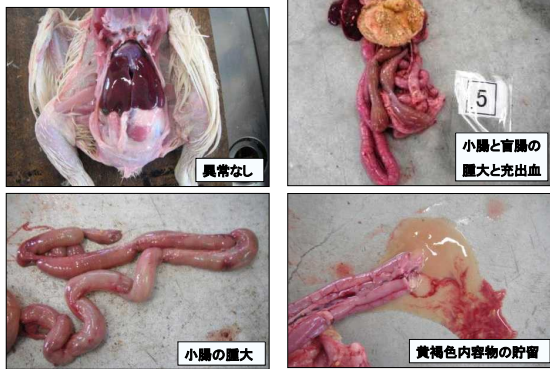


図 4. 剖検所見

【検査成績】

ウイルス学的検査として鳥インフルエンザ抗原検査を発症鶏 7 羽と死亡鶏 3 羽の気管スワブを用いて簡易キットにより実施した。結果は全て陰性で臨床症状からも鳥インフルエンザは否定された。

病理組織学的検査は主要 6 臓器及び腸管を用いて常法に基づき実施した。結果はいずれの臓器においても特記所見は認められなかった。

一般細菌検査は主要 6 臓器を用いて 5%羊血液寒天培地と変法 GAM 寒天培地で好気及び嫌気条件下で培養した。結果は 10 羽中 1 羽の心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓から *Staphylococcus aureus* と肺、肝臓から *Streptococcus hyicus*、別の 1 羽の肺から *Clostridium perfringens* A 型が分離された。鶏壊死性腸炎を疑い、*C.perfringens* の定量培養を小腸 7 検体を用いて実施した。10%卵黄液加カナマイシン加 CW 寒天培地で嫌気条件下で定量培養した結果、*C.perfringens* が 10^8 個以上と有意に分離された。分離された *C.perfringens* の毒素型別を PCR で実施した結果、いずれも α 毒素遺伝子のみを保有する A 型菌と同定された。またいずれの株も鶏壊死性腸炎に関連があるとされている NetB 遺伝子は保有していなかった。鶏壊死性腸炎の毒素検査は腸内容物上清をマウスの尾静脈に接種して実施した。結果は 8 匹中 1 匹が 30 分後に死亡、1 匹が 24 時間後に死亡、6 匹は 48 時間経過しても生存し、異常は認められなかった。30 分後の死亡はショック死と判断したため、1 匹のみで死亡が確認されたが、鶏壊死性腸炎の毒素検査は陰性と判定した。臨床症状から鶏ボツリヌス症を疑い、鶏ボツリヌス症の毒素検査を実施した。発症鶏の血清をマウス腹腔内に接種した結果、接種して 5 ~ 6 時間後に 7 匹中 4 匹が後肢麻痺と複式呼吸を呈して死亡し、残り

の 3 匹も 22 時間後に死亡が確認された(図 5)。

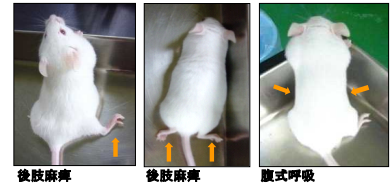
細菌検査成績2

臨床症状から鶏ボツリヌス症を疑う

ボツリヌス毒素検査

2倍希釈した血清0.5mlをマウス腹腔内に接種

血清番号	死亡時間
No.1	10~22時間
No.2	5時間
No.3	6時間
No.4	10~22時間
No.5	6.5時間
No.6	6時間
No.7	10~22時間



5~6時間後に後肢麻痺と複式呼吸を呈して死亡(4/7匹)
22時間後に死亡を確認(3/7匹)

図 5. ボツリヌス毒素検査

ボツリヌス毒素型別を行うため毒素中和検査を実施した。陽性血清を動物衛生研究所より分与された抗毒素血清と 30 分中和させた後、マウス腹腔内に接種した。結果は 24 時間が経過してもマウスは生存し、異常は認められなかった。抗 C 毒素、抗 D 毒素共に中和が成立し、抗 C 毒素と抗 D 毒素で交差反応が見られたため、抗毒素血清を希釈して実施した。結果はそれぞれの抗血清を 10 倍に希釈すると交差反応が見られたが、50 倍に希釈すると、抗 C 毒素で中和した血清を接種したマウスは 24 時間後に生存し、抗 D 毒素で中和した血清を接種したマウスは 5 時間後に腹式呼吸を呈して死亡した。以上の結果から本疾病は *Clostridium botulium* C 型毒素産生菌による鶏ボツリヌス症と診断された(図 6)。

細菌検査成績3

毒素中和検査

抗毒素血清と中和させた血清0.5mlをマウス腹腔内に接種

毒素型	死亡時間
抗C毒素(2IU/ml)	生存
抗D毒素(20IU/ml)	生存

ボツリヌス毒素抗血清
(動物衛生研究所分与)



⇒抗C毒素、抗D毒素共に中和検査が成立したため、抗毒素血清を希釈して実施

10倍希釈

毒素型	死亡時間
抗C毒素(0.2IU/ml)	生存
抗D毒素(2IU/ml)	生存

50倍希釈

毒素型	死亡時間
抗C毒素(0.04IU/ml)	生存
抗D毒素(0.4IU/ml)	5時間

⇒抗C毒素血清のみで中和検査が成立

C. botulinum C型毒素産生菌による鶏ボツリヌス症と診断

図 6. ボツリヌス毒素中和検査

毒素遺伝子のスクリーニング検査は小腸内容物と盲腸内容物を用いて、強化クックドミート培地で 4 日間増菌培養後、BHI に継代して 2 日間培養した培養液から QIAmp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて DNA を

抽出して実施した。使用したプライマーは TaKaRa のボツリヌス C,D 型毒素遺伝子検出用キットと PCR 法による遺伝子型別(Vet Microbiol 140:147-154,2010)で実施した。後者の方法はプライマーの組み合わせにより C 型と D 型のみでなく、C/D キメラ型と D/C キメラ型の毒素遺伝子型別も可能である(図 7)。

毒素遺伝子のスクリーニング検査

材料:小腸内容物 7、盲腸内容物 2
 強化クックドミート培地、37°C/嫌気培養/4days
 BHIに継代、37°C/嫌気培養/2days
 培養液をQIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてDNA抽出

使用したプライマー

- TaKaRaのボツリヌスC,D型毒素遺伝子検出用キット
- PCR法による遺伝子型別 (Vet Microbiol 140, 147-154, 2010)
- C型遺伝子とD型遺伝子のプライマーの組み合わせにより型別が可能
 C5F+C26R/D9F+C26R/C12F+C23F/C12F+D15R

プライマー	C型	D型	C/Dキメラ	D/Cキメラ
C5F+C26R	+	-	+	-
D9F+C26R	-	+	-	+
C12F+C23R	+	-	-	+
C12F+D15R	-	+	+	-

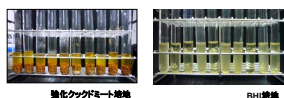


図 7. 毒素遺伝子のスクリーニング検査

TaKaRa のボツリヌス C,D 型毒素遺伝子検出用キットで実施した結果、小腸 2 検体と盲腸 1 検体が C 型毒素遺伝子陽性、D 型毒素遺伝子は全て陰性だった。PCR 法による遺伝子型別で実施した結果、小腸 2 検体と盲腸 1 検体がプライマー C5F/C26R の組み合わせで陽性、小腸 2 検体と盲腸 2 検体がプライマー C12F/D15R の組み合わせで陽性だった。プライマー C5F/C26R の組み合わせで陽性になるのは C 型若しくは C/D キメラ型、プライマー C12F/D15R の組み合わせで陽性になるのは D 型若しくは C/D キメラ型なので、毒素型は C/D キメラ型毒素遺伝子と判定した。C/D キメラ型毒素とは C 型菌が産生する C 型毒素および D 型毒素が組み合わさったモザイク様毒素のことで、鶏では C 型毒素よりも毒性が強いとされている。毒素遺伝子が検出された検体の毒素検査を実施したところ、いずれのマウスも 3 時間から 8 時間後に腹式呼吸を呈して死亡したため、毒素の産生が確認された(図 8)。

毒素遺伝子のスクリーニング検査成績

- TaKaRaのボツリヌスC,D型毒素遺伝子検出用キット
 C型:小腸2、盲腸1検体陽性 D型:全て陰性

- PCR法による遺伝子型別

プライマー	C型	D型	C/Dキメラ	D/Cキメラ
C5F+C26R	+	-	+	-
D9F+C26R	-	+	-	+
C12F+C23R	+	-	-	+
C12F+D15R	-	+	+	-

C/DキメラとはC型菌の産生するC型毒素及びD型毒素が組み合わさったモザイク様毒素

- 毒素検査
 毒素遺伝子が検出された検体の培養液0.5mlをマウス腹腔内に接種

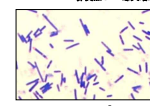
検体	小腸1	小腸2	盲腸1	盲腸2	
死亡時間	3時間	4時間	6.5時間	8時間	いずれの検体も毒素を産生

図 8. 毒素遺伝子のスクリーニング検査成績

C. botulinum の分離培養は小腸内容物と盲腸内容物を用いて、強化クックドミート培地で 3 日間増菌後、卵黄加 GAM 寒天培地で嫌気条件下で培養した。結果は盲腸 1 検体から C. botulinum 2 株が分離され、分離株の PCR 法による遺伝子型別では C/D キメラ毒素遺伝子が検出された。分離された菌株の毒素検査を実施したところ、いずれのマウスも 24 時間後に生存し、毒素の産生は確認されなかった。この理由としてクローニングや継代によるプラスミドの脱落が考えられた(図 9)。

C. botulinum の分離培養成績

- 増菌培養
 材料:小腸内容物 7、盲腸内容物 2
 強化クックドミート培地、37°C/嫌気培養/3days
 卵黄加GAM寒天培地にて分離培養
 ⇒盲腸1検体からC. botulinum 2株分離
- 分離株のPCR法による遺伝子型別
 InstaGeneMatrixを用いてDNA抽出
 ⇒C/Dキメラ毒素遺伝子を検出(2/2株)



- 毒素検査
 毒素遺伝子が確認された検体の培養液0.5mlをマウス腹腔内に接種
- | 検体 | 分離株1 | 分離株2 |
|------|------|------|
| 死亡時間 | 生存 | 生存 |
- 毒素産生は陰性
 クローニングや継代によるプラスミドの脱落が考えられる

図 9. C. botulinum の分離培養

分離された C. botulinum 2 株の薬剤感受性試験を常法に基づき 1 濃度ディスク法で実施した。薬剤はペニシリン、アンピシリン、アモキシシリン、エリスロマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、コリスチン、クロラムフェニコール、オキシテトラサイクリン、オルビフロキサシン、オフロキサシン、ナリジクス酸の 13 薬剤を使用した。結果はペニシリン、アンピシリン、アモキシシリン、オキシテトラサイクリンに高感受性を示し、エリスロマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシ

ン、ストレプトマイシン、コリスチン、オフロキサシンには耐性を示した。クロラムフェニコール、オルビフロキサシン、ナリジクス酸には中間層の感受性を示した(図10)。

薬剤感受性試験

下記の13薬剤について1濃度ディスク法で実施

ペニシリン(PGG)、アンピシリン(ABPC)、アモキシリン(AMX)、エリスロマイシン(EM)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ストレプトマイシン(SM)、コリスチン(CL)、クロラムフェニコール(CF)、オキシテトラサイクリン(OTC)、オルビフロキサシン(OBFX)、オフロキサシン(OFX)、ナリジクス酸(NA)

薬剤感受性試験成績

感受性 : PGG, ABPC, AMX, OTC

中間 : CF, OBFX, NA

耐性 : EM, KM, GM, SM, CL, OFX

図10. 薬剤感受性試験成績

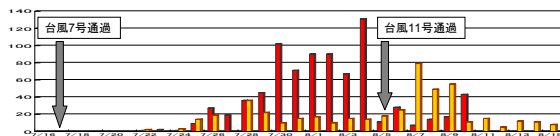
【まとめと考察】

鶏ボツリヌス症の発生には高温多湿やストレスが影響するとされている。今回2鶏舎で死亡鶏が増加する前に共通して大きな台風が通過していたため、台風通過時の換気不足とストレスが関与していると考えられた。また沖縄県における過去の発生例は2006年9月に本島北部でアヒル1200羽を飼養する農家でアヒルが100羽死亡、同じく2006年9月に八重山諸島の西表島で合鴨20羽を飼養する施設で合鴨が7羽死亡、2007年6月に本島南部で鶏50羽とアヒル20羽を飼養する農家で鶏6羽、アヒル4羽が死亡の3例のみである(図11)。

発生要因と過去発生事例

・発生要因

鶏ボツリヌス症の発生には高温多湿やストレスが影響するとされている
台風通過時の換気不足とストレスによって発生したと考えられる



・過去発生事例

- 2006年9月 本島北部 アヒル1200羽飼養、100羽死亡
- 2006年9月 八重山諸島 合鴨20羽飼養、7羽死亡
- 2007年6月 本島南部 鶏50羽・アヒル20羽飼養、鶏6羽・アヒル4羽が死亡

図11. 発生要因と過去発生事例

本疾病では血清材料と抗C毒素血清での毒素中和検査が成立したため、*C. botulinum* C型毒素産生菌による鶏ボツリヌス症と診断された。毒素遺伝子検査の結果、小腸と盲腸内容物からC/Dキメラ毒素遺

伝子が検出され、いずれも毒素を産生していた。毒素中和検査においてC型とD型で交差反応が見られたのもC/Dキメラ毒素遺伝子を保有しているためと推測された。分離培養の結果、盲腸内容物から*C. botulinum*が分離され、C/Dキメラ毒素遺伝子を保有していたが、毒素の産生は確認されなかった。この理由として、クローニングや継代によるプラスミド脱落が考えられた。薬剤感受性試験の結果、ペニシリン系薬剤に高感受性で、アミノグリコシド系薬剤には耐性を示した。

発症要因として台風通過時のストレスと換気不足が影響していたと推察された。過去発生例はアヒルや合鴨を飼養する小規模農場のみであり、県内初の鶏での大規模発生となった。今後家禽における死亡羽数増加の病性鑑定では、鶏ボツリヌス症も視野に入れた類症鑑別と病性鑑定を実施する必要がある。