

11 鶏における *Lawsonia intracellularis* の浸潤状況

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○渡邊 弘恭 佐藤 尚人
齋藤 豪 相馬 亜耶
菅原 健 森山 泰穂
渡部 巖 小笠原 和弘

1 はじめに

Lawsonia intracellularis (以下、「ローソニア」と言う。)は、豚の増殖性腸炎、馬の増殖性腸症の原因菌として知られている。

ローソニアは、偏性細胞内寄生性菌で、人工培地での培養は困難であることから、診断は、臨床症状と病理学的検査によるのが一般的で、補助的に遺伝子検査 (nested PCR) が用いられる。ローソニアの宿主域は広く、豚と馬の他に、羊、ハムスター、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、フェレット、イヌ、ブルーフォックス、オジロジカ、アカゲザル、ニホンザル、鳥類ではダチョウ、エミューに感染することが知られている¹⁾。

これまで、鶏でのローソニア感染症の報告はなかったが、兵庫県の食鳥処理場で処理された肉用鶏における、本菌による増殖性腸炎の事例が初めて報告²⁾された。鶏でのローソニア浸潤状況は、海外の肉用鶏での報告³⁾があるが、国内の報告はなく、採卵鶏では世界的にも報告はない。

そこで、今回、鶏のローソニア感染実態解明の一助とするため、県内の養鶏場における浸潤状況を調査したので、その概要を

報告する。

2 材料と方法

(1) 材料

材料は、県内養鶏場の健康鶏のプール糞便 (1 検体あたり 5 羽プール) 14 農場 58 検体 (採卵鶏 9 農場 32 検体、肉用鶏 6 農場 26 検体) と、県内養鶏場の健康鶏の回腸と盲腸粘膜、2 農場 20 羽分 (採卵鶏 1 農場 10 羽、肉用鶏 1 農場 10 羽) を用いた。

(2) 方法

遺伝子検査は、糞便は QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)、腸粘膜は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、ローソニアに特異的な Jones らの報告⁴⁾したプライマーを用いて nested PCR を実施した。

病理学的検査は、遺伝子検査で陽性であった回腸及び盲腸について、常法に従いヘマトキシリンエオジン染色、ワーチンスターリー染色、免疫組織化学的染色を実施した。なお、免疫組織化学的染色は、0.1% actinase E で前処理し、一次抗体は抗ローソニアモノクローナル抗体 (Anti-Limonoclonal antibody (Bio-X Diagnostics))

を用いた。

遺伝子解析は、nested PCR の増幅産物について、ダイレクトシーケンス法で遺伝子配列を解析した。

3 結果

(1) 遺伝子検査

採卵鶏の糞便では、表 1 に示すとおり、32 検体中 11 検体 (34%) で nested PCR 陽性であった。農場単位では、9 農場中 7 農場で陽性遺伝子が検出され、陽性農場率は 78%であった。

肉用鶏の糞便では、表 2 に示すとおり、26 検体中 2 検体 (8%) で nested PCR 陽性であった。農場単位では、6 農場中 2 農場で陽性遺伝子が検出され、陽性農場率は 33%であった。

回腸及び盲腸では、表 3 に示すとおり、採卵鶏の回腸 3 検体、盲腸 1 検体で nested PCR 陽性であった。

表 1 採卵鶏糞便の遺伝子検査結果

農場	飼養規模	日齢	豚との関連	nested PCR		
				+	-	計
A	100~999羽	440	なし	1	0	1
B	1,000~9,999羽	266	なし	3	2	5
C	≥10,000羽	500	なし	1	4	5
D	≥10,000羽	329	なし	3	2	5
E	≥10,000羽	399	なし	1	4	5
F	≥10,000羽	420	なし	1	1	2
G	1,000~9,999羽	不明	あり	1	4	5
H	≥10,000羽	620	なし	0	2	2
I	≥10,000羽	343	なし	0	2	2
計 (陽性検体率)				11 (34%)	21	32
陽性農場率				78%(7/9)		

表 2 肉用鶏糞便の遺伝子検査結果

農場	飼養規模	日齢	豚との関連	nested PCR		
				+	-	計
J	≥10,000羽	42	なし	1	2	3
K	≥10,000羽	41	あり	1	2	3
L	≥10,000羽	40	なし	0	5	5
M	≥10,000羽	42	なし	0	5	5
N	≥10,000羽	48	あり	0	5	5
O	1,000~9,999羽	112	なし	0	5	5
計 (陽性検体率)				2 (8%)	24	26
陽性農場率				33%(2/6)		

表 3 回腸、盲腸の遺伝子検査結果

農場	飼養規模	用途	日齢	豚との関連	nested PCR (陽性検体数/検体数)	
					回腸	盲腸
O	1,000~9,999羽	肉用	115	なし	0/10	0/10
P	<100羽	採卵	610	なし	3/10	1/10
計 (陽性検体率)					3/20 (15%)	1/20 (5%)

(2) 病理学的検査

遺伝子検査で陽性となった回腸と盲腸について、ヘマトキシリンエオジン染色では、著変は認められなかった。ワーチンスターリー染色では、菌体は確認されなかった。免疫組織化学的染色は、陰性であった。

(3) 遺伝子解析

糞便及び腸管から検出された遺伝子 10 検体について、塩基配列を解析し、データベース登録遺伝子と照合したところ、いずれの遺伝子も *Lawsonia aspartate ammonia lyase gene* (GenBank accession No. KF199338) と 98.8~99.6%と高い相同性を示し、他に相同性が高い遺伝子が認められなかったことから、今回の遺伝子検査で検出された遺伝子は、ローソニアの遺伝子であることが確認された。

今回検出された遺伝子増幅産物同士の比較を表4に示した。採卵鶏由来の遺伝子増幅産物8検体中5検体で塩基配列が100%一致し、肉用鶏由来の遺伝子増幅産物、2検体中2検体の遺伝子配列が100%一致した。この両者の相同性を比較したところ、一致率は97.6%であった。

また、豚と鶏の両方を飼養するG農場由来の遺伝子増幅産物の比較を図1に示した。その一致率は97.6%で、相同性は高いもの完全には一致しなかった。

表4 nested PCR増幅遺伝子同士の比較

農場	用途	由来	配列の一致
A	採卵	糞便	★
B	採卵	糞便	★
C	採卵	糞便	★
D	採卵	糞便	★
E	採卵	糞便	★
F	採卵	糞便	★
G	採卵	糞便	★
P	採卵	回腸	★
J	肉用	糞便	●
K	肉用	糞便	●

8検体中5検体(★)で塩基配列が100%一致

★と●の一致率は97.6%(247bp/253bp)

2検体中2検体(●)で塩基配列が100%一致

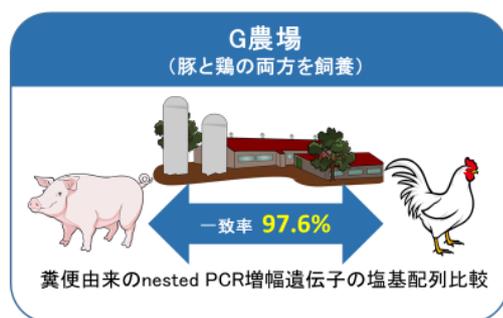


図1 豚と鶏由来遺伝子の比較

4 考察

採卵鶏農場で78%、肉用鶏農場で33%と多くの養鶏場で、健康鶏からローソニア遺伝

子が検出されたことから、ローソニアが養鶏場に広く浸潤していることが示唆された。

遺伝子検査において、平均日齢が415日齢であった採卵鶏と比較し、平均日齢が54日齢であった肉用鶏で低い陽性率を示した。肥育豚の糞便の遺伝子検査では、120日齢で最も陽性率が高くなるとの報告⁵⁾があることから、今回の採卵鶏と肉用鶏の日齢の違いが、陽性率に影響を与えている可能性が考えられるが、不明な点が多く、検証が必要と考えられた。また、ローソニア陽性農場のうち、豚と疫学的な関連性のある農場は2農場のみであったことや、異なる養鶏場由来のローソニア遺伝子で、塩基配列が100%一致するものが多く認められた一方で、同一農場の豚と鶏由来の塩基配列は完全には一致しなかったことから、ローソニアは、豚との関連性に関わらず、鶏から鶏へ伝播している可能性が考えられた。

今回、臨床的に健康な鶏からローソニア遺伝子が検出されており、遺伝子が検出された腸管のヘマトキシリンエオジン染色では、著変が認められなかったことから、鶏におけるローソニアの病原性は高くないと推察されたが、病原性や感染実態については未だ不明な点が多く、更なる調査が必要と考えられた。

5 まとめ

ローソニアは、養鶏場に広く浸潤していることが示されたが、人工培地での培養が困難であるだけでなく、ヘマトキシリンエオジン染色等の通常の病理学的検査で菌体を確認することが困難であるため、これまでの鶏の病性鑑定において、ローソニアが

見過ごされていた可能性がある。

したがって、今後、鶏の腸炎などの病性鑑定において、細菌培養検査で有意菌が検出されず、原因が特定できないような症例では、ローソニアの関与を疑い、遺伝子検査や、免疫染色なども検討する必要があると考えられた。

6 謝辞

本調査実施にあたり、ダイレクトシークエンスを実施していただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門の勝田賢先生、免疫組織化学的染色を実施していただいた、同じく動物衛生研究部門の三上修先生に深謝する。

<参考文献>

- 1) 三上修：ローソニアの感染と感染動態，養豚界, 46, 60-61 (2011)
- 2) Ohtaら：Proliferative Enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in Chickens, J Comp Pathol, 【Epub ahead of print】 (2016)
- 3) McOristら：Search for *Lawsonia intracellularis* and *Bilophila wadsworthia* in malabsorption-diseased chickens, Can J Vet Res, 67(3), 232-234 (2003)
- 4) Jonesら：Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis ileal symbiont *intracellularis*, in feces by polymerase chain reaction, J Clin Microbiol 31, 2611-2615 (1993)
- 5) 矢原芳博：豚増殖性腸炎 日本にお

る浸潤状況, 臨床獣医, 22(1), 13-16 (2004)