

15 鶏大腸菌症と診断された採卵用成鶏に認められた大腸菌による頭蓋骨 air space 病変及び髄膜炎

中央家畜保健衛生所
寺山 好美・浦川 了
県北家畜保健衛生所
三浦 昭彦

鶏大腸菌症は、鶏病原性大腸菌（Avian pathogenic *Escherichia coli*: APEC）によって引き起こされる経済的損失が大きい疾病のひとつであり、平飼い飼養されるブロイラーを中心に問題となるが、近年、国内において、採卵用成鶏における発生も確認されており^{5、6、8、9)}、その臨床症状は、心膜炎および肝被膜炎を伴う急性敗血症や卵管炎が主である。一方、APEC による髄膜炎、脳炎の野外発生報告はほぼなく^{8、9)}、Nakamura ら¹⁰⁾によるブロイラー1例と、Kasuya ら³⁾による採卵用種鶏の新生ひな1例の報告のみである。

今回、鶏大腸菌症と診断された採卵用成鶏において、大腸菌による頭蓋骨 air space 病変および髄膜炎が認められた事例に遭遇したので報告する。

1 発生状況

採卵鶏 27,000 羽を飼養する養鶏場（7 鶏舎、開放、ケージ飼育）の1 鶏舎で、2021年6月15日に113日齢で導入したボリスブラウン4,600羽において、7月11日（139日齢）から斜頸などの症状を呈した鶏が、衰弱して2～3羽/日ずつ死亡していた。7月16日（144日齢）に14羽/日と死亡・淘汰羽数が増加したことから立入検査を実施し、生存鶏2羽および死亡鶏1羽の計3羽について病性鑑定を実施した。鶏舎周囲に消石灰を散布し消毒を実施するも、その後も症状が治まらないことから、7月20日（148日齢）にさらに生存鶏2羽および死亡鶏1羽の計3羽について再度病性鑑定を実施した。症状が確認されてから36日後（8月16日）には発生は終息し、発症期間の死亡・淘汰率は5.5%で

あった。また、当該鶏群の50%産卵日齢は143日齢で、ピーク産卵率は94.7%、ピーク産卵日齢は189日齢であった。なお、養鶏場は標高159mに所在し、発生鶏舎の3m南側に堆肥舎が位置しており（図-1）、気象庁データにおいて、発症時期に当該地域には南西から最大瞬間風速17m、平均風速5mを超える風が吹いていたことが確認された（図-2）。

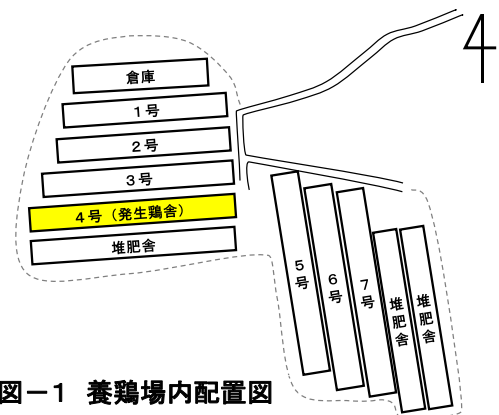


図-1 養鶏場内配置図

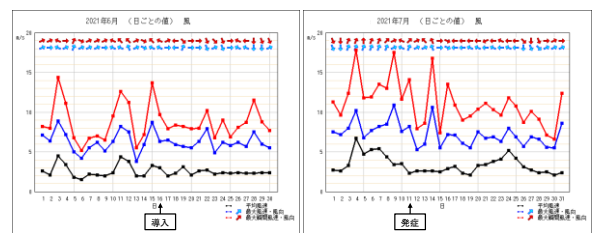


図-2 疾病発生時の風速および風向き（気象庁ホームページ「2021年6月および7月（日ごとの値）風」より一部改変）

当該鶏群のワクチネーションプログラムは、表-1に示すとおりで、大腸菌症ワクチンは投与されていない。

表-1 発症鶏群のワクチネーションプログラム

接種日齢	ワクチン	株名	投与・接種方法
初生	マレック病 (生)	FC-126株	皮下接種
	IB ^{a)} (生)	C78株	散毒
14日齢	ND ^{b)} ・IB (生)	ND: Clone30株, IB: Ma5株	飲水
20日齢	鶏痘 (生)	ボーデット株	翼膜穿刺
23日齢	伝染性ファブリキウス嚢病 (生)	MB-1・B株	飲水
36日齢	伝染性ファブリキウス嚢病 (生)	ウイルスE株	飲水
43日齢	ND・IB (生)	ND: B1株, IB: H120株	点鼻
48日齢	鶏伝染性喉頭気管炎	C7株	点鼻
60日齢	ニワトリ6種混合オイル (不活化)	ND: 石井株, IB: 綾馬E10株, TM-86BC株, IC ^{c)} ・A型菌: No. 221株, IC・C型菌: 63-47株, MG ^{d)} : 63-523株	筋肉内接種
80日齢	IB (生)	H120株	飲水

a) 鶏伝染性気管支炎, b) ニューカッスル病, c) 伝染性コリーザ, d) MG: マイコプラズマ・ガリセプラカム感染症

2 病性鑑定

(1) 解剖検査および病理組織学的検査

144および148日齢それぞれの死亡鶏1羽ならびに生存鶏2羽の計6羽(鶏No. 1~6)の解剖検査実施後、主要臓器、器官について、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィン包埋切片を作製して、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。全例の頭蓋骨および鶏No. 6の脳については、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ社)の01、0119および0161免疫血清を用いて、シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス社)にて免疫組織学的検査を実施した。

(2) 細菌学的検査

鶏No. 1~6の主要臓器および脳について、5%馬血液寒天培地(日水製薬社)およびDHL培地(日水製薬社)を用いて好気培養で細菌検索を実施し、分離菌はAPI20E(ビオメリュー・ジャパン社)により同定した。

148日齢の3羽の脳から分離された大腸菌各1株について、病原大腸菌免疫血清を用いて凝集反応を実施した。さらにボイル法にて遺伝子を抽出し、Iguchiらの報告²⁾に従い、0血清型別プライマーを用いたマルチプレックスPCR法により血清型を確認した。また、同サンプルを用いて、Ewersらの報告¹⁾に従い、病原性関連遺伝子 *irp2*, *iucD*, *astA*, *vat*, *papC*, *tsh*, *iss*, *cva/cvi* の保有をマルチプレックスPCR法にて検索した。なお、144日齢の3羽から分離された大腸菌については、上記検査は実施しなかった。

5羽(鶏No. 1, 3~6)から分離された大腸

菌5株の薬剤感受性試験は、アンピシリン(ABPC)、アモキシシリン(AMPC)、オキシテトラサイクリン(OTC)、ドキシサイクリン(DOXY)、ST合剤(ST)、オフロキサシン(OFLX)、ノルフロキサシン(NFLX)、エンロフロキサシン(ERFX)について、ミューラーヒントン培地(日本ベクトン・ディッキンソン社)を用いて1濃度ディスク拡散法(BDセンシ・ディスク、日本ベクトン・ディッキンソン社)により実施した。

3 成績

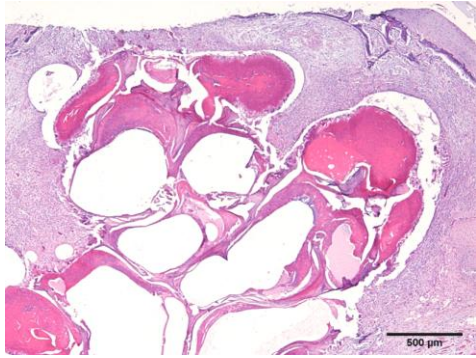
(1) 解剖検査および病理組織学的検査

生存鶏4羽に起立不能や斜頸などの神経症状(写真-1)が認められたものの、外貌上の異常はみられず、死亡鶏を含めて剖検所見では顕著な異常所見は認められなかった。



写真-1 斜頸を呈する鶏(剖検時、No.2)

病理組織学的検査では、148日齢の3羽(鶏No. 4~6)の頭蓋骨 air space に、多数の細菌塊を伴う偽好酸球、マクロファージの浸潤、線維素析出および細胞退廃物の沈着、多核巨細胞やマクロファージに囲まれた凝固壊死巣といった病変(写真-2)が認められ、144日齢の1羽(鶏No. 3)においても頭蓋骨 air space に細菌塊を伴う軽度のマクロファージの浸潤が認められたものの、144日齢の2羽(鶏No. 1~2)には同病変は認められなかった。さらに、鶏No. 6では髄膜に細菌塊を伴う偽好酸球、マクロファージの浸潤が認められ、中等度の髄膜炎が確認されたが、その他の5羽では脳に所見は観察されなかった。



写真一2 頭蓋骨air spaceに細菌塊を伴う壊死形成、炎症細胞浸潤(HE染色、No.5)

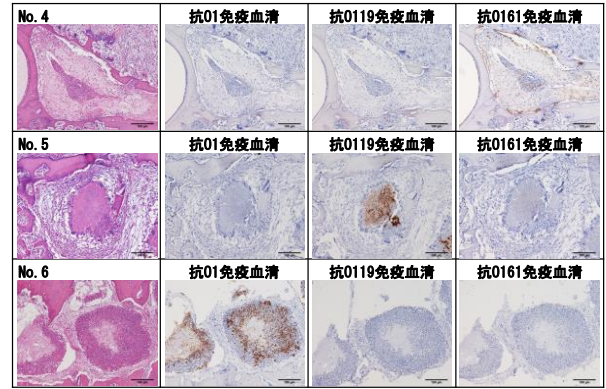
また、全羽で頭部皮下組織あるいは眼窩下洞いずれかにおける化膿性病変が確認された。心膜における炎症細胞浸潤は 144 日齢の 3 羽(鶏 No. 1~3)すべてで認められたものの、148 日齢の 3 羽(鶏 No. 4~6)ではいずれにもみられなかった。その他に、軽度ではあるが肝臓に血栓形成が 3 羽、肝臓の壊死が 1 羽、脾臓の線維素析出が 3 羽、十二指腸から小腸の漿膜炎が 1 羽、筋胃びらんが 1 羽で確認された(表一 2)。

表一 2 臨床症状および病理組織学的所見

	144日齢			148日齢		
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
転帰	生存	生存	死亡	生存	生存	死亡
症状						
斜頸	+	+	不明	+	+	不明
組織所見						
頭蓋骨 air space 病変	-	-	+	+++	+++	+++
髄膜炎	-	-	-	-	-	++
頭部皮下組織の化膿性炎	+	-	+++	+	-	+
眼窩下洞の化膿性炎	-	++	++	-	+	+
肝臓の血栓形成	-	-	+	+	+	-
肝臓の壊死	-	-	-	+	+	-
脾臓の線維素析出	-	-	+	+	±	+
心膜に炎症細胞浸潤	+	+	+	-	-	-
小腸~大腸の漿膜炎	-	-	++ ^{a)}	-	±	-
筋胃びらん	-	-	-	-	++	++

病変の程度：- (病変なし)、± (きわめて軽度)、+ (軽度)、++ (中等度)、+++ (高度)
a) 肉芽腫性病変を伴う

免疫組織化学的検査では、鶏 No. 3 および 6 は抗 01 血清、鶏 No. 4 は抗 0161 血清、鶏 No. 5 は抗 0119 血清それぞれで頭蓋骨 air space 病変部位に抗原陽性像が確認された(写真一 3)。



写真一 3 頭蓋骨air spaceにおける大腸菌抗原の免疫組織化学的検査

さらに、鶏 No. 6 の髄膜病変部にも抗 01 血清での抗原陽性像が確認された。鶏 No. 1 および 2 についてはいずれの抗血清に対しても抗原陽性像は確認されなかった(表一 3)。

表一 3 細菌検査成績および免疫組織化学的検査成績

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
細菌分離						
肝臓	-	-	+	-	-	+
脾臓	-	-	+	-	-	+
腎臓	-	-	+	-	-	+
心臓	-	-	+	-	-	+
肺	-	-	+	-	-	+
脳	+	+	+	+	+	+
分離大腸菌の血清型	不明	不明	不明	0161	0119	01
免疫染色陽性の血清型	-	-	01	0161	0119	01

(2) 細菌学的検査(表一 3 および表一 4)

死亡鶏 2 羽(鶏 No. 3 および 6) はすべての主要臓器および脳、生存鶏 4 羽は脳からのみ大腸菌が分離された。分離された大腸菌の血清型は、凝集反応法ならびにマルチプレックス PCR 法によって、鶏 No. 4 由来株は 0161、鶏 No. 5 由来株は 0119、鶏 No. 6 由来株は 01 に型別された。鶏 No. 1~3 から分離された大腸菌については検査していなかったため不明とした。鶏 No. 4~6 由来株すべてで病原性関連遺伝子 *irp2*、*iucD*、*vat*、*papC*、*iss*、*cva/cvi* の保有、さらに鶏 No. 4 および 6 由来株では *tsh* の保有も確認された。薬剤感受性試験の結果、鶏 No. 1、3、6 では OTC 耐性、鶏 No. 4 由来株では ABPC および AMPC 耐性、鶏 No. 5 由来株では OTC および DOXY 耐性が確認され、それ以外の薬剤については感受性を示した。

表一4 分離大腸菌の病原性関連遺伝子保有状況および薬剤感受性試験成績

	No. 1	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
病原性関連遺伝子保有状況					
<i>lfp2</i>			+	+	+
<i>iucD</i>			+	+	+
<i>astA</i>			-	-	-
<i>vat</i>	不明	不明	+	+	+
<i>papC</i>			+	+	+
<i>tsh</i>			+	+	+
<i>iss</i>			+	+	+
<i>eva/cvi</i>			+	+	+
薬剤感受性試験成績					
ABPC	S	S	R	S	S
AMPC	I	S	R	S	S
OTC	R	R	S	R	R
DOXY	I	S	S	R	I
ST	S	S	S	S	S
OFLX	S	S	S	S	S
NFLX	S	S	S	S	S
ERFK	S	S	S	S	S

判定結果：S（感性）、I（中間）、R（耐性）

4 考察

今回、神経症状を呈した採卵鶏群について、大腸菌が関与した髄膜炎および頭蓋骨 air space 病変が明瞭に確認されたことから、当該鶏群で鶏大腸菌症が発生したと診断された。上記病変以外には眼窩下洞または頭部皮下組織などに化膿性または肉芽腫性の病変が認められたものの、一般的な鶏大腸菌症で認められる実質臓器の漿膜炎はほぼ観察されなかった。さらに、斜頸や神経症状に関連することが明らかにされている各種疾病（ニューカッスル病、アスペルギルス症、マレック病、リステリア症およびパストレラ症など）を疑う病変も認められなかった。髄膜炎あるいは頭蓋骨病変が認められなかった144日齢の生存鶏2羽においても斜頸が確認されていたことから、これらの病変形成が直接的に神経症状を引き起こしたというよりも、何らかの要因で頭蓋内に大腸菌が侵入して増殖した結果、神経症状を誘発し、その後、髄膜炎や頭蓋骨病変を形成したものと推察された。この推論は、細菌検査において全羽の脳から大腸菌が分離されことから裏付けられ、神経症状を誘引した原因として細胞壁成分であるリポ多糖体（LPS）の可能性が示唆された。

分離された大腸菌の血清型が各個体で異なっていた点については、検索した株数が少なかったことが影響したと考えられたが、免疫組織化学的検査において、それぞれの病変部位に分離大腸菌の血清型と一致した陽性反応が確認されたことから、それぞれの大腸菌株すべてが本事例の原因菌であったことを示していた。また、

免疫組織化学的検査で大腸菌抗原を確認できなかった2例については、供試した3血清型以外の大腸菌に感染していたと推察された。分離された大腸菌株は、APECとして高頻度に分離される血清型ではないものも含まれていたが⁸⁾、鉄吸着因子、P線毛遺伝子、血清抵抗性因子およびコリシン産生性に関連した遺伝子を保有していたことから、一定の病原性を保持していたと推察され、本事例の原因菌となり得ることを裏付けていた。これら3株については、それぞれ1～2剤の薬剤耐性しか確認されなかったことから、多剤耐性に関する危惧は必要ないと思われたが、それぞれ耐性プロファイルが異なっていたため、治療として抗菌製剤を投与する場合には注意が必要であると考えられた。神経症状を呈して同様な頭蓋骨 air space 病変を報告した熊谷ら⁷⁾は、神経症状の発現と頭蓋骨 air space 病変の有無が一致していたと報告しており、その事例では *Pasteurella multocida* を原因菌と診断している。いくつかの類似点が認められるものの、本事例において臨床症状の発現と頭蓋骨病変形成の程度が異なっていた点については、原因となった菌が異なることも関係したと推察された。

鶏大腸菌症の臨床的病型として、急性敗血症型、亜急性線維素化膿性漿膜炎型、大腸菌性肉芽腫、皮膚型、腸管型に分類され¹²⁾、一般的な野外事例では漿膜炎型が多数を占めている。その理由として敗血症に続発して漿膜炎型の経過を辿り、その経過が長期間に及んだ場合に肉芽腫型に移行することによる。また皮膚型は経皮的に感染した局所感染であり、腸管型の事例はまれである。今回の事例では、敗血症型や漿膜炎型から派生して頭蓋骨に病変が形成されたというよりも、頭蓋骨病変が局所的に形成される経過を辿った可能性が示唆されている。その場合、頭部皮下組織あるいは眼窩下洞で観察された化膿性病変が発端となった可能性が考えられ、その病変部位で増殖した大腸菌が偶発的に頭蓋内に感染し、そして同時に全身型へと移行したことで、重度な頭蓋骨病変と軽度な漿膜炎型病変が形成されたと考えられた。本事例のように

鶏大腸菌症と診断された採卵用成鶏に、大腸菌による頭蓋骨病変や髄膜炎が認められた報告はこれまでにない。

採卵用成鶏における大腸菌症の多くは、産卵ストレスが引き金と考えられており^{8、9)}、本症例においても、時期的に産卵開始ストレスが深く関与していると考察している。また、養鶏場は標高が高い場所に位置し、日常的に強い風が吹く環境にあり、気象庁のデータを確認すると本事例の発生前に堆肥舎側から発生鶏舎に向けて強風下にあったことが確認された。複数種の大腸菌の関与が確認されたことを鑑みて、産卵開始の強いストレス下にあった鶏群に、堆肥舎からの塵埃あるいは臭気に暴露されたことが発症の引き金になったという推論が成り立つと考えている。なお、発症鶏群と同じ種鶏場から10日前に導入された鶏群（1号舎）の50%産卵日齢は139日齢、ピーク産卵率は96.8%、ピーク産卵日齢は197日齢、発症期間の死亡率は0.6%であり、顕著な産卵成績の低下等は認められず、本症例における鶏大腸菌症による被害は、死亡・淘汰率の上昇のみであった。

本症例では産卵開始前後に斜頸などの神経症状を呈す鶏において、鶏大腸菌症がその原因となり得ることが示された。今後同様な事例が確認された場合に、頭蓋骨内に病変が形成されているか確認する事が重要であることを提起したい。

5 参考文献

(1) Ewers, C. *et al.* : Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 37, 355-366 (2008)

(2) Iguchi, A. *et al.* : *Escherichia coli* O-genotyping PCR: comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J. Clin. Microbiol.* 58, 2427-2432 (2015)

(3) Kasuya, K. *et al.* : Three cases of *Escherichia coli* meningitis in chicks imported to Japan. *Avian Dis.* 6¹, 135-138

(2016)

(4) Kawano, M. *et al.* : Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiol. Immunol.* 50, 961-966 (2006)

(5) 鶏病研究会 : 採卵養鶏場で散発するコクシジウム症, 壊死性腸炎および大腸菌症. 鶏病研報 51, 81-90 (2015)

(6) 小泉慎一郎ら : 採卵用成鶏に発生した急性敗血症型大腸菌症. 鶏病研報 45, 22-27 (2009)

(7) 熊谷芳浩ら : ブロイラーおよびブロイラー種鶏における *Pasteurella multocida* による頭蓋骨 air space 病変と脳髄膜炎. 鶏病研報 50, 70-75 (2014)

(8) 村瀬敏之 : 採卵用成鶏における大腸菌症. 鶏病研報 45, 147-155 (2009)

(9) 永野哲司 : 大腸菌症の現状と対策. 鶏病研報 56 (増刊号), 27-38 (2020)

(10) Nakamura, K. *et al.* : Pathology of spontaneous colibacillosis in a broiler flock. *Vet. Pathol.* 22, 592-597 (1985)

(11) 中村菊保 : 鶏の大腸菌症の発病機序. 日獣会誌 48, 633-639 (1995)

(12) 中村菊保 : 鶏の大腸菌症の病理と病理発生. 鶏病研報 52, 24-34 (2016)

(13) Yaguchi, K. *et al.* : Virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan. *Avian Dis.* 51, 656-662 (2007)