

鶏コクシジウム病発生農場におけるリアルタイム PCR 検査成績に基づいた改善事例

中央家畜保健衛生所

宮島 侘生

濱田 英莉

弥田 進

和食 雄一

馬上 斉

小林 淳吉

はじめに

鶏コクシジウム病は、*Eimeria* 属原虫のオーシストが鶏に経口的に感染することにより生じる消化器疾病で、発育不良、死亡羽数増加、産卵率低下等を引き起こす。発生部位や症状の程度は種によって異なり、*E. tenella*(以下 Et)や *E. necatrix*(以下 En)では下痢、血便、貧血等の重篤な症状を呈し、養鶏場経営に大きな悪影響を生じる[1], [2]。

コクシジウムのオーシストは一般的な消毒薬に対する抵抗力が強く、糞便中等適切な環境下では長期間にわたり残存し、農場内で感染が持続することが知られている[3], [4]。治療や予防の手段としては抗菌剤の投与、適切な消毒、ワクチン接種などが挙げられるが、抗菌薬は休薬期間が生じる為採卵鶏農場での使用は難しい場合も多い。鶏舎の清掃消毒により対処する場合は、清掃時に極力オーシストを含む糞便を取り除く事、オーシストを殺滅する為にスチームクリーナーやオルソ剤等を使用して消毒する事、残存したオーシストを殺滅する為に十分な空舎期間を設け、鶏舎を乾燥させることが重要である。

今回、鶏コクシジウム病が発生した県内平飼い養鶏場において、リアルタイム PCR の結果に基づき、発生農場のワクチン接種及び清掃消毒指導、発生後の対策効果の判定、周辺農場の浸潤状況調査を実施したため、概要を報告する。

1 例目発生概要

発生農場は県内の平飼い採卵鶏農場で、鶏舎は4棟5区画で構成され、床はすのこで落下便をスクレイパーで回収する構造となっている。飼養鶏はアイメリア3種混合生ワクチン(Et, *E. accervulina*(以下 Ea)、*E. maxima*(以下 Em))を導入前の100日齢で接種され、110日齢程で農場に導入される。

令和5年6月、本農場で死亡羽数が通常1日1羽程度の所1日25羽程まで増加したとの連絡を受け、立ち入り検査を実施した。現地で鳥インフルエンザ簡易検査を実施し、全10羽陰性となった為、313日齢の死亡鶏3羽を持ち帰り病性鑑定を実施した。

剖検所見として十二指腸膨隆及び盲腸内容黒色化が認められ、寄生虫学的検査で1羽の盲腸内容物からコクシジウムオーシストが13,200個/g検出された。腸管内容物についてアイメリア5種リアルタイムPCR(Et, Ea, Em, En, *Eimeria brunetti*(以下 Eb)[5])を実施した結果、3羽全羽の十二指腸及び盲腸内容物から *E. necatrix*(En)特異遺伝子が検出された。病理組織学的検査では十二指腸粘膜陰窩上皮にコクシジウム虫体の寄生を認めた。以上の結果から、本症例はEnを原因とする鶏コクシジウム病と診断された。

本症例において、同時期導入の鶏コクシジウム病を発症していない対照群と飼養日数あたりの産卵数、卵価、死亡羽数、廃鶏出荷額等を比較した。その結果、発生鶏舎あたりの被害額は約115万円と算出され、ワクチン接種費用(6万円/鶏群)と比較しても被害額が甚大であったことから、農場にEn単味生ワクチン追加接種を提案し、農場では次回ロットからEnワクチン接種鶏の導入を開始した。



図1 小腸膨隆、盲腸内容黒色化

2 例目発生概要

鶏群のオールイン・オールアウト後の同年12月、同農場のEnワクチン接種済153日齢の鶏群において死亡羽数が1日5羽程度まで増加し、産卵率が停滞したとの連絡を受け、立ち入り検査を実施した。現地で鳥インフルエンザ簡易検査を実施し、全10羽陰性となった為、死亡鶏5羽を持ち帰り病性鑑定を実施した。

剖検所見として全5羽に小腸膨満や小腸内容黒色化が認められ、細菌学的検査では全羽の小腸内容物から $6 \times 10^5 \sim 10^7$ 個/g程度のクロ

ストリジウム属菌が検出され、*Clostridium perfringens* A型と同定された。寄生虫学的検査では全羽の小腸内容物からコクシジウムオーシストが多数検出され、リアルタイムPCRでEn及びEb特異遺伝子が検出された。病理組織学的検査では小腸遊離部に粘膜上皮剥離と絨毛短縮、大型桿菌及び偽膜・潰瘍形成、上皮細胞内に寄生するコクシジウム虫体が観察された。以上の結果から、本症例は鶏コクシジウム病及びクロストリジウム・パーフリンゲンス感染症と診断された。



図2 小腸膨隆、内容黒色化

本症例の被害額は1例目と同様の手法で約22万円と算出された。リアルタイムPCRではEbで陽性検体数が多く(En: 4/5羽陽性、Eb: 5/5羽陽性)、Ct値が低い(En: 32~36、Eb: 32~36)傾向にあり、Enワクチン接種鶏群での発生であることから本症例はEbが優勢であると判断された。

Ebに関しては当時市販ワクチンが存在しなかった為、対策として殺オーシストに有効な薬剤を用いた消毒、十分な乾燥期間の確保を農場に指導し、農場では通常の清掃消毒の後、オルソ剤噴霧による消毒の実施と、以前は14日程度であった乾燥期間を30日以上確保するよう手順の変更を行った。

清掃消毒効果判定

清掃消毒の指導後、効果判定の為鶏舎内の落下便を用いた糞便検査を実施した。糞便検査は図3に示したように、Eb発生鶏群のオールアウト、鶏舎内の清掃消毒、新規ロット導入の1か月後より、1か月に1回、計4回実施し、全5区画の糞便を最低10羽分採取した(図3)。糞便は混合した後浮遊法によりコクシジウムオーシストを検出し、リアルタイムPCRによりコクシジウム5種の特異遺伝子を検出した(表1)。



図3 糞便検査日程

表1 糞便検査結果

1回目 (151~165日齢)							2回目 (169~183日齢)						
区画No.	OPG (個/g)	E.a Ct値	E.b Ct値	E.m Ct値	E.n Ct値	E.t Ct値	区画No.	OPG (個/g)	E.a Ct値	E.b Ct値	E.m Ct値	E.n Ct値	E.t Ct値
1	0	40.9	-	45	35.3	34.4	1	0	-	-	-	35.5	37.9
2	0	34.1	-	41.9	31	31	2	0	-	-	-	39.2	-
3	300	35.3	-	29.8	-	-	3	0	-	-	-	34.8	-
4	0	31.4	-	37.1	35.1	35.4	4	0	-	-	-	41.9	-
5	0	35.1	41.4	-	-	-	5	0	-	-	-	-	-

3回目 (193~218日齢)							4回目 (218~243日齢)						
区画No.	OPG (個/g)	E.a Ct値	E.b Ct値	E.m Ct値	E.n Ct値	E.t Ct値	区画No.	OPG (個/g)	E.a Ct値	E.b Ct値	E.m Ct値	E.n Ct値	E.t Ct値
1	600	-	-	-	32	-	1	0	-	-	-	-	-
2	0	-	-	-	38.6	40.9	2	0	-	-	-	-	-
3	1,700	-	-	-	32.8	-	3	0	-	-	-	-	-
4	0	-	-	-	-	-	4	0	-	-	-	35.9	-
5	0	-	-	-	-	-	5	0	-	-	38.7	-	-

コクシジウムオーシスト：初回検査の1区画(OPG300)、3回目検査の2区画(OPG600及び1,700)で検出されたが、4回目検査時には陰性となった。

Eb：初回検査の1区画において特異遺伝子が検出されたが、その後の検査では全期間、全区画にわたって陰性となった。

Ea、Em、Et：初回検査では3~4区画で特異遺伝子が検出されたが、2回目検査以降では各1区画で検出される程度まで減少が認められた。2回目検査以降はオーシスト陽性区画では陰性であり、Ct値も増加傾向が認められた。

En：初回検査で3区画において特異遺伝子が検出され、2回目では1区画に減少したが3回目検査時には再度3区画で検出され、内2区画はオーシストも検出された。4回目検査時には1区画のみ陽性となった。

上記の結果から、Ebは一部の遺伝子のみ残存していたが鶏舎内から消失したものと考えられた。また、他種についても経時的に消失する傾向が認められたが、Enに関しては他種よりも長期にオーシストを形成し残存する傾向が認められた。

管内コクシジウム浸潤状況調査

上記の検査結果から、ワクチン接種農場において、接種後数か月にわたりコクシジウムオーシスト及び遺伝子が検出されることが明らかになった。また、過去の報告から病原性を持つコクシジウム野外株であっても症状を示さず鶏舎内に残存する[6]ことから、ワクチン接種後時間の経過した農場や、過去の発生歴が無い農場でも、コクシジウムが浸潤している可能性が考えられた。そこで、養鶏場におけるワクチン株の残存状況と野外株の浸潤状

況を調査する為、ワクチン接種・非接種農場の両者を含む管内の12養鶏場を対象とし糞便を採取、清掃消毒効果判定検査と同様に虫卵検査及びアイメリア5種リアルタイムPCRによる遺伝子検出を実施した(表2)。

表2 浸潤状況調査結果

農場No.	1	2	3	4	5	6
飼養形態	平飼い	平飼い	平飼い	平飼い	ケージ	平飼い
ワクチン(日齢)	3種,E.n(10)	3種,E.n(10)	3種,E.n(10)	3種,E.n(90)	無	無
日齢	96	257	169	168	217	115
虫卵検査	-	-	-	-	-	-
PCR	-	E.n	-	E.n	-	E.n

農場No.	7	8	9	10	11	12
飼養形態	平飼い	平飼い	平飼い	ケージ	平飼い	ケージ
ワクチン(日齢)	無	無	無	無	無	無
日齢	不明	1000-	250	180	160	300
虫卵検査	-	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	E.n	E.n	-

上記結果のように、各農場でオーシストは検出されなかったが、12農場中5農場でEn特異遺伝子が検出された。Enが検出された農場のうち、2農場はワクチン接種農場(接種後78日および247日)であったことから、ワクチン株が農場内で残存しているものと考えられた。一方で、ワクチン非接種の3農場に関して検出された遺伝子は野外株由来のものと考えられた。

考察と課題

本症例ではEn及びEbにより鶏コクシジウム病が発生し、養鶏場に多大な被害が生じた。1例目発生後にはEnワクチン追加接種を実施し、2例目発生後は当時市販のEb生ワクチンが存在しなかった為、清掃消毒指導を実施した。2例目発生以降、当該農場での再発は認められず、発生後の糞便検査でEbが2回目以降全ての区画で陰性となったことから、清掃消毒の指導により鶏舎内のEbが消失したものと考えられた。

Eb以外の種について、ワクチン接種後50~60日経過した1回目検査時点でEt、Ea、Em、Enと様々なコクシジウム遺伝子が検出され、一部区画でオーシストの検出も認められたが、臨床症状を伴わず時間経過に伴って消失した。コクシジウムワクチンは弱毒株を含む生ワクチンであり[7]、投与後に体内での増殖と排泄、再感染を数回以上繰り返した後、鶏群が免疫を獲得することで再感染が防止され糞便中から消失するとされている[8]ことから、今回検出された遺伝子はワクチン株由来であると考えられた。

また、Enの遺伝子及びオーシストは他種に比べ長期の残存が認められた。過去の報告よ

り、野外株Enは他種の野外株に比べ増殖効率が劣り、混合感染下では増殖・発症が抑制される[9]ことから、ワクチン株同士においても同様の干渉によりEnワクチン株の増殖が抑制され、免疫付与と消失が遅延したものと考えられた。

コクシジウム浸潤状況調査ではワクチン接種後200日を超える鶏群においてEn遺伝子が検出された。この農場は3種混合生ワクチン及びEn単味生ワクチンを同時接種しており、上記の機序によってEn消失が遅延したものと考えられた。同様のワクチン接種プロトコルを実施している他農場ではコクシジウム遺伝子が検出されなかったが、過去の報告でもワクチン接種農場でオーシストや遺伝子が検出される日齢には農場によって幅がある[6]点と一致する。その理由として、鶏舎床の構造や飼養密度の違いが影響しEnが残存している可能性や、採材した時期によってEnの残存量の違いがあり他農場では検出限界以下であった可能性が考えられた。また、ワクチン非接種の3農場に関しては検出されたEn特異遺伝子が野外株であると考えられたため、清掃消毒の指導やワクチン接種の提案等、事前のコクシジウム対策を実施した。

コクシジウム種の同定には鏡検下オーシスト形態での判別、リアルタイムPCRを用いるが、オーシスト形態での判別はサイズの近いEtとEn、EmとEb等の判別は困難であると考えられる[5],[6]。リアルタイムPCRでは各種の特異遺伝子を検出することで種を判別することができ、虫卵検査では判別が難しい混合感染症例に対しても対応可能である。本症例の様に原因種を特定することで、対応するワクチンの有無や費用対効果を考慮したワクチン接種の提案、清掃消毒指導等、種や農場に対応した対策を選択でき、またそれらの効果を落下便を用いたリアルタイムPCRで評価することも可能である。また、非発生農場においても虫卵検査ではオーシストを検出できなかったが、リアルタイムPCRにより潜在的なコクシジウム感染を摘発することができたことから、コクシジウムが浸潤している農場では発生後と同様の対策を事前に講じることで被害を未然に防ぐことが可能であり、リアルタイムPCR検査の有用性が示された。

参考文献

[1] 松林誠: コクシジウム症, 家禽疾病学, 鶏病研究会編, 第二版, 140-143, 鶏病研究会, 茨城(2022)

- [2] 川原史也：鶏コクシジウム症と壊死性腸炎を再考する，鶏病研究会報 49，19-24(2013)
- [3] 川原史也：鶏コクシジウム症の対策および今後の戦略，鶏病研究会報 48，185-192(2012)
- [4] *Leonardo B et al*, *Vet Res Commun*, 48(6):3639-3653(2024)
- [5] *Kawahara et al*, *Avian Dis*, 52(4):652-6(2008)
- [6] *Matsubayashi et al*, *JVMS*, 82(5):516-519(2020)
- [7] *Soutter et al*, *Front Vet Sci*, 7:101(2020)
- [8] 石井俊雄：鶏のコクシジウム，55-65，*獣医寄生虫学・寄生虫病学1 総論／原虫*，講談社，東京(1998)
- [9] *McDougald LR, et al*, *Coccidiosis, Diseases of Poultry*, 10th ed, 871-872, Iowa State Univ, Iowa(1997)