

氏 名 (本籍) ふる た けん じ
 古 田 賢 治

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 275 号

学位授与年月日 昭和 59 年 10 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 特定病原不在 (SPF) 鶏の維持管理に
 関する研究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教授 勝野正則 教授 水間 豊

教授 堀口雅昭

論 文 内 容 要 旨

特定病原不在 (SPF) 鶏は医学、獣医学の実験動物として重要なばかりでなく、生ワクチン製造用の種卵を供給する産業動物としても重要視されるようになった。しかし、その作出の過程や維持管理についての研究は少なく、また、企業中心に行なわれていたため公表された成績は殆どない。

著者は、農林水産省家畜衛生試験場鶏病支場における鶏病研究に必要な SPF 鶏とその種卵を得ることを目的として、同支場において1973年に SPF 鶏 PDL-1 を作出し、以後その維持管理を担当してきた。本研究は SPF 鶏を繁殖し、SPF 状態を維持していくために必要な技術的問題を検討したものである。

先ず、第1章において、SPF 鶏の作出と維持管理上の問題点を明らかにした。次いで、第2章において、PDL-1 の作出から5世代までの鶏の能力を調べ、SPF 鶏を小規模閉鎖群として維持する交配方法を検討した。第3章においては、SPF 状態を維持するための鶏舎、管理器材、種卵、飼料の消毒及び飼育管理技術者の体表の清浄化の方法を明示し、第4章では SPF 状態の検証に際して発現した血清学的非特異反応について検討した。

そして、これらの検討結果をもとに、SPF 鶏の作出と維持管理のシステムを明らかにした。主な結果をあげれば以下のようなものである。

1. PDL-1 の能力

PDL-1 は、施設の規模から毎世代種鶏約200羽を限度とする小規模閉鎖群として維持されるため、近交による能力の低下が危惧された。そこで60～70羽ずつ3群に分けて循環交配方式を採用し、近交係数の上昇を毎世代1%以下

にすることを試みた。その結果、表1に示すように、性成熟日齢、産卵率、卵重、受精率、孵化率、健康雛の割合、育成期の増体、飼料効率、斃死率のいずれにおいても能力の退化を防ぐことができた。この成績は、本研究のような小規模閉鎖群であっても、循環交配方式の採用によって遺伝的退化を防止できることを示すものである。

また、PDL-1は、その飼育目的から長期間一定の産卵率（60%以上）を維持することが望まれる。このような産卵率を維持するための照明方法について検討した結果、育成期間の照明を8時間とし、18週齢から毎週30分ずつ延長し12時間とする方法、又は18週齢から毎週15分ずつ18時間まで延長する方法が有効であることを知った（図1）。このような照明条件下で飼育すると、50%産卵到達1週後より60%以上の産卵率を29~30週間維持することが可能であった（表1、図1）。

2. 病原体防除のための洗浄、消毒効果

PDL-1は、空気濾過陽圧（FAPP）鶏舎内で病原体の侵入防止に留意して種卵を孵化し、雛を育成することにより、寄生虫をはじめ本邦の鶏に常在する4種類の病原細菌、10種類の病原ウイルスに関してSPF化することができた。しかし、世代Ⅲに到り、伝染性気管支炎ウイルス（IBV）の侵入が生じた。そこで、これを契機に鶏舎、管理器材、種卵、飼料、管理技術者などに対して実施していた消毒又は清浄化の効果を再検討した。

PDL-1の各世代は、飼育終了後に鶏舎を水洗、消毒してから新たな鶏を搬入して飼育する。この場合、鶏舎床面、止まり木等の付着菌数の多い位置は、水流にブラシによる擦り洗いを併用して水洗する。次いで、1㎡当り40mlのホルマリンを用い、ホルムアルデヒドガス燻蒸により24時間以上消毒するのが有

効であることが明らかとなった。また、常時舎内で使用する各種管理器材も、これと同様の方法で水洗、消毒すれば無菌に近い状態となることが知られた（表2）。

種卵は毎日集卵し、肉眼的に汚れのないものを選び、温水で洗って貯卵した。これを1 m^3 当たり40 ml のホルマリンを用い1時間燻蒸すると、卵殻表面は無菌的となるが、卵殻内部にはしばしば菌が残存していた（表2）。この種卵を孵化すると、入卵直後とハッチャー移行直後にのみ、卵殻の細菌数の増加がみられた。これは入卵とハッチャー移行が人手により行なわれるためと思われ、種卵の取扱いは洗浄、消毒した清潔な手で行うことに留意しなければならない。

飼料原料には $10^3 \sim 10^5/g$ の一般細菌が混在し、これを配合したマッシュでは菌数が多い。しかし、これをペレット化することにより菌数が著しく減少する。この加工時の水蒸気温度は $80^\circ C$ 以上が適当で、処理により一般細菌数は $10^1/g$ 程度に減じ、腸内細菌は検出されなくなった（表3）。この加工条件ではビタミン類に対する影響は認められなかった。

PDL-1の飼料として、このペレットを20 kg 袋詰めとして購入使用しているが、鶏舎搬入時にホルマリン40 ml/m^3 を用いて24時間以上燻蒸すると、袋は内外層ともに無菌的となった。また、袋詰め飼料を6週間貯蔵してもペレット中の菌数の増加はなかった。

飲水として、無菌的な市水をウォーター・カップで自動給水したが、鶏が常時飲水するカップ内の細菌数の増加は速かで、少なくとも1日1回はカップ内を市水で洗浄し清潔にする必要のあることを知った。

管理技術者は入舎時にシャワー、入浴などにより体表を洗浄し、消毒済の作業衣を着用するが、洗浄後も体表に $10^2/cm^2$ 程度の細菌が残存している。また、頭髮の付着細菌数は $10^3/g$ 程度で、洗浄しても菌数は殆ど減少しない。従って、

帽子、マスク等を着用し、体表の露出をできるだけ少なくすることが有効である。

以上、SPF状態維持のための洗浄、消毒の効果を再検討し、それに適する条件を指摘した。これらの条件はPDL-1作出当初から実施していた方法と殆ど変わるところはなく、世代ⅢにおいてSPF状態が一部破綻した原因を持定することはできなかった。世代Ⅳ以後でSPF状態が破綻することなく維持されていることは、再検討の結果得られた上記の方法が効果的であることを示している。

3. SPF状態検証に用いる血清反応における非特異反応

寄生虫以外の病原体の感染の有無は、通常血清反応、特にその術式の簡便な急速平板凝集反応及び寒天ゲル内沈降反応によって第一次診断が行われる。この二つの診断術式では、病原体の感染と関わりのない非特異反応が発現する。PDL-1では、対象とした細菌の全て（4種）を凝集反応により、18種中8種のウイルスを沈降反応により検証したが、鶏痘ウイルス（FPV）と伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）を除き、非特異反応がしばしば認められ（表4）、迅速な診断に支障が生じた。著者はこの非特異反応を鶏と抗原の両面から解析することを企図し、次の知見を得た。

1) 非特異反応に関与する鶏側の因子

非特異反応は一般に18週齢頃より発現し始め、42週齢以後の発現率が高い。また、非特異反応発現率は、雌が雄に比べて高い（図2）。非特異反応の発現状態を個体別にみると、反応が一過性に発現するもの（Ⅰ型）、長期間持続するもの（Ⅲ型）、その中間のもの（Ⅱ型）及び全く発現しないもの（Ⅳ型）に分けられ、Ⅲ型の発現率は雄2.4%、雌22.8%であった（表5）。また、反応

を発現した鶏のうちⅢ型を示したものは雄3.8%、雌30.4%で、雌は雄より非特異反応に持続性があった。雌の反応発現率が高いことは、鶏血清中の非特異反応因子が産卵と関連している可能性を示唆するが、産卵鶏を換羽休産させても非特異反応は必ずしも消失せず、実験的にこれを確認するに至らなかった。

非特異反応は全個体に発現するのではなく、世代Ⅲの雌の25%はO型で、Ⅲ型のパターンを示したものは22.8%であった(表5)。これは非特異反応を呈し易い鶏と然らざる鶏のあることを示している。しかし、それらの個体を選抜して交配した後代の非特異反応発現率からみて、非特異反応が遺伝的に支配されているとは判断し得なかった。

2) 抗原側の因子

非特異反応はある1種の抗原に対して発現するが多いが、2種類以上の抗原と反応することもある。この様な交叉反応は、特に七面鳥ヘルペスウイルス(HVT)とマレック病ウイルス(MDV)の両抗原間、細網内皮症ウイルス(REV)とMDV又はHVT間に高頻度にみられた(表6)。この事実から、これら抗原間に共通因子のあることが示唆され、血清と上記各抗原の間に発現した沈降線が互いに融合することで確かめられた。

上記3種の抗原はそれぞれ牛血清とTryptose phosphate broth(TPB)を加えた培地で培養した細胞に、各ウイルスを増殖させて製造したもの(血清培養抗原)であった。REVの血清培養抗原に対する非特異反応の発現率は18.1%(検査羽数609羽)であったが、これと同一の血清を牛血清とTPBを添加しない培地で製造した抗原(無血清培養抗原)で検査すると発現率は3.0%に低下した。

また、MDVとREVの血清培養抗原に対する鶏血清中の非特異反応因子は対照抗原(牛血清とTPBを加えて細胞を培養し、ウイルスを接種しないで製

造した抗原)で吸収除去された。

これらのことから、抗原中の非特異反応因子は培地成分にあるものと考えられた。この点を確かめたところ、REV抗原の非特異反応はTPBに含まれるTryptoseが一因であることが明らかとなった(表7)。また、97頭の牛のうち9頭の血清(9.3%)は鶏血清と反応して沈降線を発現した。そのうち3頭の牛血清は比較的広範な鶏血清と反応して(表8)、その力価も比較的高いものであった。このことから、牛血清の抗原中への混入も非特異反応の一因となると考えられた。

これらの知見に基づき、MDV、HVT、REVの他、伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV)、トリアデノウイルス(AAV)、トリレオウイルス(ARV)の各抗原を無血清培養により製造し、世代IVとVの鶏の検疫に使用した。その結果、非特異反応の発現率は血清培養の各抗原を使用した世代I~IIIの場合より明らかに低下した(表4)。

なお、非特異反応の発現が全くなかったFPVとIBDV両抗原は(表4)各感染鶏の臓器を乳剤として製造したものであった。

以上のことから、寒天ゲル内沈降反応における非特異反応の発現防止のため、感染鶏の臓器乳剤に抗原性がある場合は、それから製造した抗原を使用すること、一方、細胞培養による場合は無血清培養で製造した抗原を使用して検疫するのがよいことが明らかとなった。

以上、SPF鶏の維持管理に必要な消毒のあり方やその検疫時にみられる血清の非特異反応の動態を明確にすると共に、SPF鶏の小規模閉鎖群における有効な繁殖交配方式や効率のよい採卵方式を提起した。これらはSPF鶏の作出、維持管理のシステム化にとって有益な情報と考えられる。

表1 PDL-1の能力

調査事項		世 代						
		I	II	III	IV	V		
産	50%産卵到達日齢	153	162	167	-	167		
	産卵率(%) (21~68週齢)	55.0	59.1	63.6	-	65.2		
	最高産卵率を示した週齢	24	25	34	-	31, 32		
	週間最高産卵率(%)	72.1	90.1	88.1	-	84.5		
	産卵率60%以上の期間(週)	15	19	30	-	29		
卵	卵重(g) ^{*1}	24週齢	-	47.3±3.5	45.2±4.0	-	45.0±3.0	
		30週齢	-	-	52.3±3.1	-	51.7±3.8	
		50週齢	-	59.6±4.1	60.2±3.7	-	60.9±4.1	
	飼料効率(%) ^{*2}	24週齢	-	39.03	39.84	-	36.49	
		30週齢	-	-	44.69	-	45.83	
	50週齢	-	-	39.48	-	41.02		
孵化	受精率(%)	82.1±11.8	84.2±9.1	93.2± 3.9	92.8± 5.5	93.9±3.9		
	孵化率(%) ^{*3}	77.6± 9.7	83.5±5.4	91.7± 5.8	88.0± 9.2	86.6±8.6		
	健康雛の割合(%) ^{*3}	71.1±10.1	73.0±7.6	84.3±10.0	79.6±12.7	79.4±9.9		
発育	体重(kg) ^{*1}	10週齢 {	♂	-	1.19±0.10	1.18±0.09	-	1.22±0.10
			♀	-	0.91±0.06	0.91±0.07	-	0.91±0.07
		20週齢 {	♂	-	1.83±0.17	2.02±0.17	-	1.98±0.19
			♀	-	1.58±0.16	1.63±0.16	-	1.51±0.16
		50週齢 {	♂	-	-	2.53±0.22	-	2.55±0.26
			♀	-	-	1.88±0.23	-	1.83±0.25
	飼料消費量 ^{*4} (0~20週齢、kg/羽)	♂	-	8.9	10.1	-	9.8	
		♀	-	9.0	9.0	-	8.5	
	飼料効率 ^{*4} (0~20週齢)	♂	-	20.05	19.64	-	19.72	
		♀	-	17.12	17.57	-	17.27	
斃死率 (0~20週齢)	♂	10.0	8.9	2.2	5.7	4.8		
	♀	1.8	2.2	0.5	2.1	0.6		

*₁ 平均値±標準偏差

*₂ 24, 30 及び50週齢の各1週間について測定

*₃ 受精卵数に対する割合

*₄ 餌付(0週齢)から20週まで毎週測定

$$\text{飼料効率} = \frac{\text{期間内増体量又は産卵重量}}{\text{期間内飼料消費量}} \times 100$$

図1 PDL-1に対する照明時間の延長と産卵率の推移

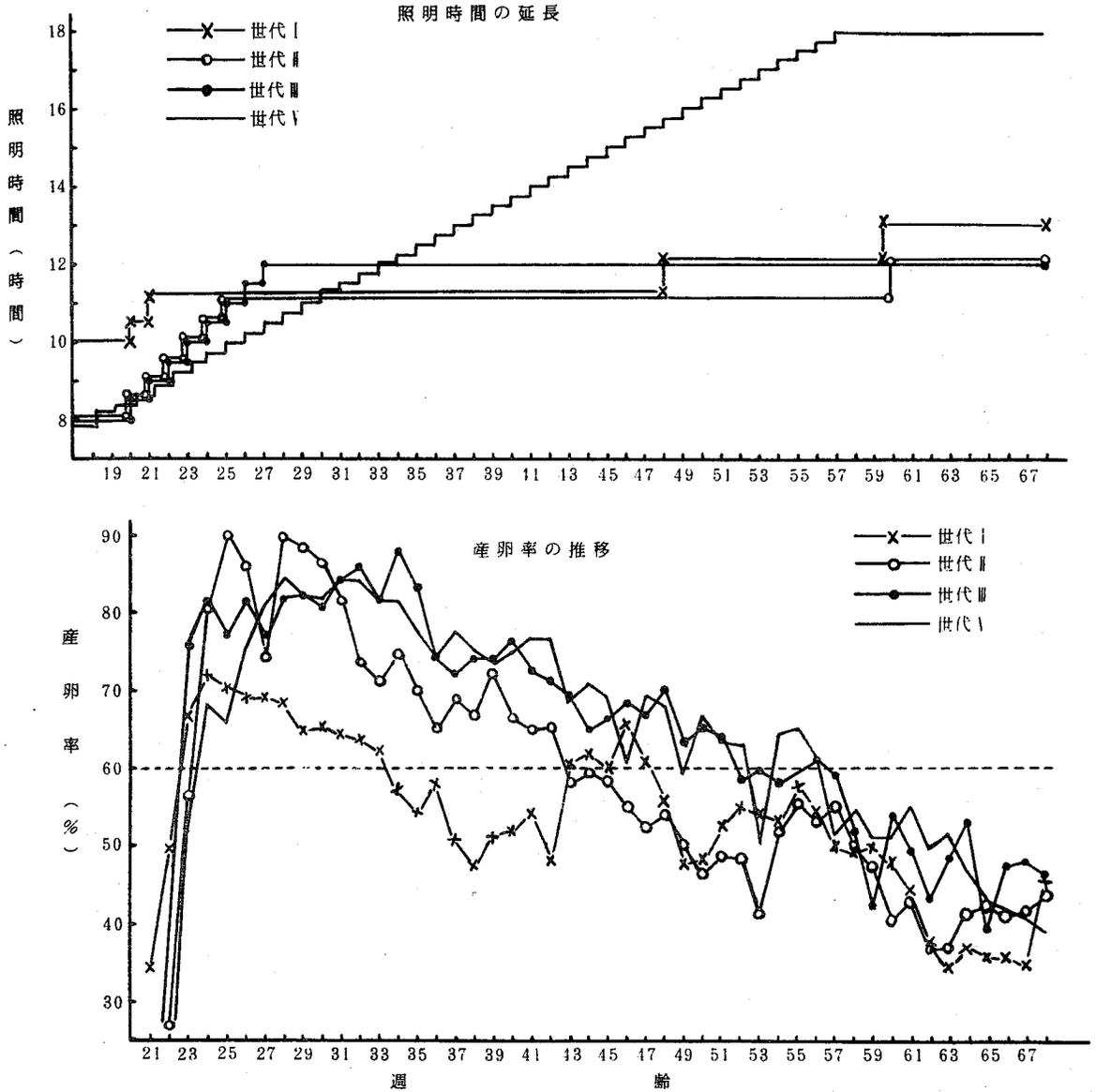


表2 鶏舎，管理器材及び種卵の水洗と消毒の効果

測定対象		水洗前	水洗後	消毒後 ^{*1}	
鶏舎	床面	1065±0.5 ^{*2}	1048±0.5	1/30 ^{*3}	
	止まり木	1063±0.4	1048±0.8	2/25	
	壁面（床面からの高さ30cm）	1042±1.1	1037±0.7	1/20	
管理器材	スコップ { 木の柄の部分	1028±0.7	1016±0.4	0/5	
		金属部分	1023±0.8	1011±0.2	0/5
	デッキ・ブラシ	竹の柄の部分	1030±0.9	1014±0.4	0/5
	長靴 {	足の甲に当たる部分	1020±0.4	1008±0.7	0/12
		足の脛に当たる部分	1021±0.5	1009±0.6	0/12
靴底		-	-	0/12	
種卵	清浄卵 ^{*4}	1030±0.6	1023±0.4	1/50	
	汚卵	1045±0.5	1027±0.7	6/50	

*₁ 40ml/m³のホルマリンを20g/m³の過マンガン酸カリと反応させガスを発生

24時間燻蒸，但し種卵については1時間燻蒸

*₂ 1cm²（種卵については1個）当たりの菌数，平均値±標準偏差

*₃ 菌陽性検体数/供試検体数

*₄ 肉眼的な汚染の有無による

表3 各種温度で加工したペレットから検出された細菌数

飼料形態	水蒸気温度 (°C)	総菌数		腸内細菌数		
		増菌培養 ^{*1}	菌数	増菌培養 大腸菌 ^{*2}	Salmonella ^{*3}	菌数
ペレット	70	5/5 ^{*4}	1018±14 ^{*5}	3/5	0/5	0
	80	5/5	1011±16	0/5	0/5	0
	83	5/5	1011±18	0/5	0/5	0
	90	5/5	1008±16	0/5	0/5	0
マッシュ（対照）		5/5	1045±0.1	5/5	0/5	1034±0.3

*₁ HI液体培地使用

*₂ EC培地使用

*₃ テトラチオン酸塩培地使用

*₄ 菌陽性ロット数/供試ロット数

*₅ 検体1g当たりの菌数，平均値±標準偏差

表4 PDL-1, 各世代の鶏の非特異反応発現率*₁

検査術式	病原微生物	世 代					計
		I	II	III	IV	V	
検査	羽数* ₂	135	175	229	173	207	919
急速平板凝集反応	雛白痢菌	7.4	22.9	17.5	35.8	42.0	26.0
	マイコプラズマ・ガリセプチカム	0.7	0	14.8	11.0	2.4	6.4
	マイコプラズマ・シノビエ	0	1.7	8.3	2.3	4.8	3.9
	ヘモフィルス・パラガリナルム	5.9	17.1	5.7	8.7	4.3	8.2
寒天ゲル内* ₃ 沈降反応	鶏痘ウイルス* ₄	0	0	0	0	0	0
	マレック病ウイルス	1.5	9.1	11.8	3.5	0.5	5.7
	七面鳥ヘルペスウイルス	1.5	1.1	19.2	5.2	0	6.2
	伝染性喉頭気管炎ウイルス	0	0.6	22.7	2.3	2.9	6.9
	トリアデノウイルス	3.0	2.9	7.4	0	0	2.8
	トリレオウイルス	0	18.9	3.5	1.7	1.4	5.1
	伝染性ファブリキ* ₄ ウス嚢病ウイルス	0	0	0	0	0	0
	細網内皮症ウイルス	—	50.9	30.1	3.5	1.0	21.2

*₁ 非特異反応発現率 = $\frac{\text{反応発現羽数} \times 100}{\text{検査羽数}}$

*₂ 世代I…17、60週齢 世代II…18、63、86週齢

世代III…18、26、34、42、50、58、66、74、107週齢

世代IV…22、48、77週齢 世代V…17、28、52、74週齢で検査

検査羽数は各世代の検査週齢のうち最も若い週齢における検査羽数を示す

*₃ 世代I～IIIは各血清培養抗原、世代IV、Vは各無血清培養抗原を使用して検査

*₄ 世代IIIの検査はそれぞれ雄15羽、雌30羽を選抜して実施

図2 PDL-1, 世代Ⅲの鶏の各種抗原に対する非特異反応発現率の消長

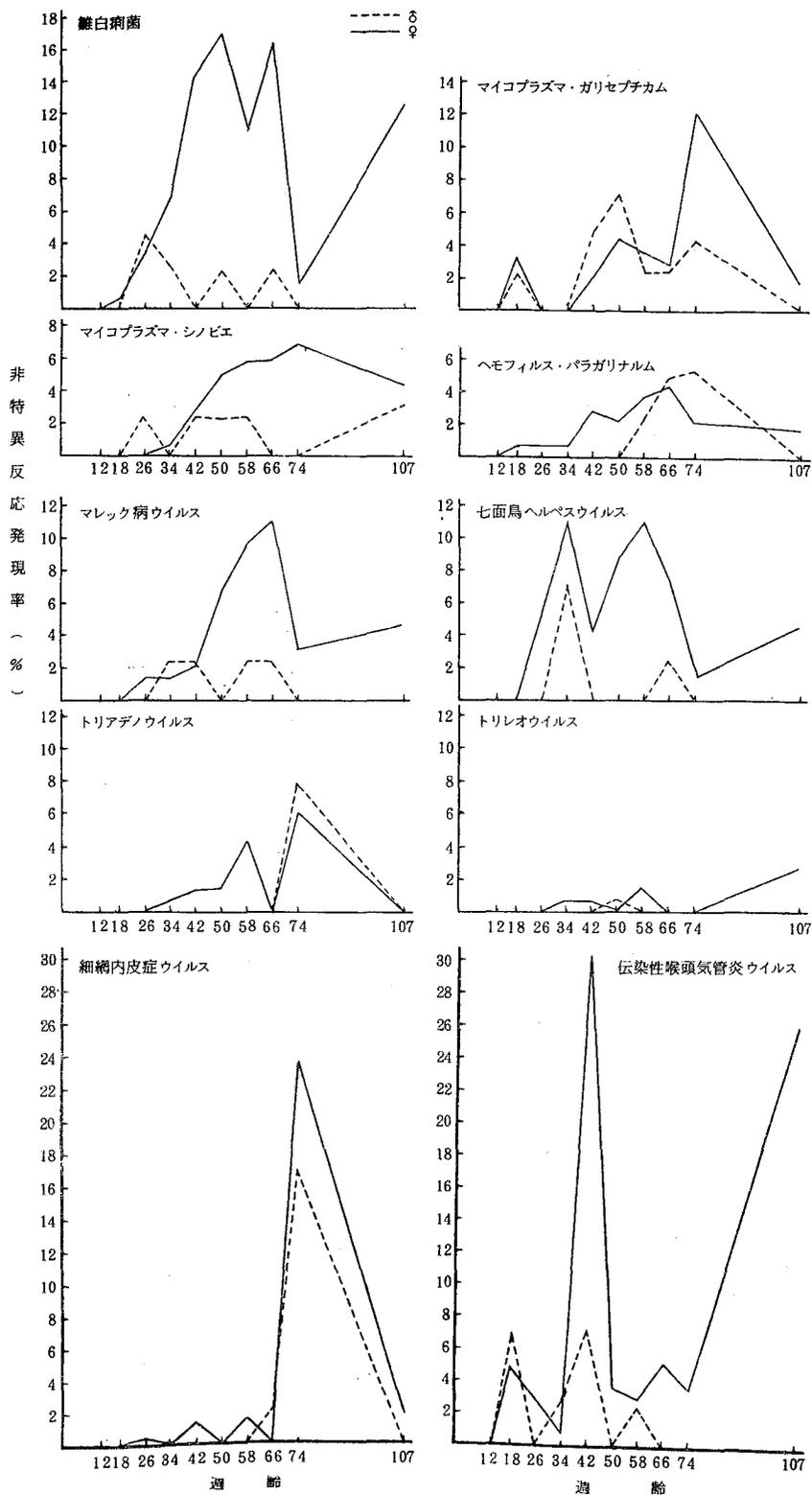


表5 PDL-1, 世代Ⅲでみられた非特異反応パターン発現羽数

性	非 特 異 反 応 パ タ ー ン				計
	O	I	Ⅱ	Ⅲ	
♂	15 (36.6)	24 (58.5)	1 (2.4)	1 (2.4)	41 (100.0)
♀	34 (25.0)	57 (41.9)	14 (10.3)	31 (22.8)	136 (100.0)

18~74週齢に10種の抗原を用いて8回検査

()内は百分率

表6 PDL-1, 世代Ⅲ(18-74週齢)の交叉非特異反応の抗原間組合せ(数字は交叉のあった血清数)

	雑白痢菌	マイコプラズマ・ ガリセプチカム	マイコプ ラズマ・ シノビエ	ヘモフィルス パラ ガリナルム	マレック病 ウイルス	七面鳥 ヘルペス ウイルス	伝染性喉 頭気管炎 ウイルス	トリ アデノ ウイルス	トリ レオ ウイルス	細網内皮症 ウイルス
細網内皮症ウイルス	10	8	5	4	16	19	1	5	0	-
トリレオウイルス	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
トリアデノウイルス	4	0	2	1	6	6	10	-	-	-
伝染性喉頭気管炎 ウイルス	1	6	2	3	0	0	-	-	-	-
七面鳥 ヘルペスウイルス	8	1	2	4	32	-	-	-	-	-
マレック病ウイルス	6	3	3	3	-	-	-	-	-	-
ヘモフィルス・ パラガリナルム	2	2	3	-	-	-	-	-	-	-
マイコプラズマ・ シノビエ	1	5	-	-	-	-	-	-	-	-
マイコプラズマ・ ガリセプチカム	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
雑白痢菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2種類の抗原に対して反応した血清数 77例

3~6種類の抗原に対して反応した血清数 26例

表7 REV抗原製造用の培地及び培地成分と反応して沈降線を発現したPDL-1, 世代IVの血清数

培地又は培地成分	沈降線発現血清数
199培地	0/88 ^{*1}
MEM培地	0/88
Tryptose phosphate broth (TPB)	15/88
Tryptose ^{*2}	22/90
Dextrose ^{*2}	0/88
塩化ナトリウム ^{*2}	0/78
燐酸2ナトリウム ^{*2}	0/84

*1 沈降線発現血清数/供試血清数

*2 TPBの組成成分

表8 牛におけるPDL-1の血清との反応因子の保有率

反応した鶏羽数	0	1	2	11	14	計
牛血清数	88 (90.7)	5 (5.2)	1 (1.0)	2 (2.1)	1 (1.0)	97 (100.0)

()内は供試牛血清数に対する百分率

審 査 結 果 の 要 旨

特定病原体不在 (SPF) 鶏は医学、獣医学の実験用動物として、また生ワクチン製造用の種卵を供給する産業動物として重要であるが、その作出や維持管理について公表された成績は殆どない。

著者は鶏病研究に必要な SPF 鶏とその種卵を得ることを目的として SPF 鶏 PDL-1 を作出し、1973 年以來その維持管理を担当してきたが、第 1 章ではこの間に得られた問題点を体系的に指摘した。そして特に重要と思われた近交退化、病原体防除のための消毒、SPF 状態の検証のための血清反応に現われる非特異反応につき第 2～第 4 章で検討し、以下のような知見を得た。

1. PDL-1 は各世代種鶏 200 羽を限度とする小規模閉鎖群として維持したが、これを 3 群に分けた循環交配方式で、世代毎の近交係数の上昇を 1% 以下にすることにより、各種能力の低下を防ぎ得ること、また長期間一定の産卵率を維持するための照明条件を指摘した (第 2 章)。
2. 一般細菌と腸内細菌を指標に消毒、清浄化の方法を検討し、鶏舎、管理器材、種卵、袋詰飼料、管理技術者などに適する洗浄法、消毒法を指摘すると共に飼料の無菌化のためのペレット加工条件を検討した (第 3 章)。
3. 血清反応に出現する非特異反応の一因は抗原作成時に用いる培地成分にあることを解明し、それを除去して製造した抗原の使用により該反応の出現は著減することを示した。また非特異反応の出現は雌鶏の性現象とも関連のあることを示唆した (第 4 章)。

以上の業績は養鶏界、家畜衛生に寄与するところ大きく、審査員一同は著者は農学博士の学位を得るに値するものと認めた。