

総説

鶏盲腸内容物培養飼料によるサルモネラの競合排除

今井康雄

所属機関 JA 全農 家畜衛生研究所
所属機関所在地 〒 285-0043 千葉県佐倉市大蛇町7番地
電話 043-486-1011
Fax 043-486-1571
E-mail imai-yasuo@zennoh.or.jp

【要約】

初生ひなは腸内細菌叢が未形成であるためにサルモネラに対して極めて感染しやすい状態で農場に搬入される。農場におけるサルモネラ対策を進める上での最重要項目は、感染リスクの最も高い時期のひなへの効果的な防除手段を提供することである。初生ひなのサルモネラ感染予防策として活用されているものとしては競合排除 (Competitive Exclusion, CE) 法がある。CE 法は、健康な成鶏の糞便希釈液をひなに給与 (移植) することで、移植された成鶏の正常腸内細菌叢がひなの腸管内で増殖し、その後に入ってくるサルモネラが増殖抑制を受ける現象を実用化した技術である。現在では、本現象を応用した製品 (CE 製品) がわが国を含む世界各国で市販され利用されている。CE 製品は、初生時の1回だけの給与であり、薬剤残留や薬剤耐性の心配がない利点がある。その一方で、野外応用の際に確かな CE 効果を引き出すには、効果に影響する要因を事前に把握し対処することが不可欠である。本稿では、CE 効果に影響を及ぼす因子として、CE 製品給与からの経過時間、サルモネラの暴露量、温度ストレス、各種病原体による感染、生菌剤との併用などについて解説する。また、野外応用試験における成功ならびに失敗の事例と成否の要因を紹介する。

キーワード: 腸内細菌叢、競合排除、サルモネラ対策、野外応用法、養鶏

【はじめに】

成鶏の正常腸内細菌叢を活用した CE 法は、当初、北欧諸国における養鶏産業でサルモネラ防除を目的に確立した技術である。その後、成鶏の腸内細菌叢を応用した製品が開発され、我が国を含む世界各国において養鶏場のサルモネラ対策の一手段として広く活用されている。

しかし、CE 製品を野外応用した際の CE 効果は、研究施設での評価結果と必ずしも一致しないことがある。当然ではあるが、すべての条件が管理されている研究施設とは異なり、野外

の農場では様々な要因が CE 効果に影響を及ぼしていると考えられる。そこで本稿では、CE 製品の活用によって期待される CE 効果をより確かなものにするために、効果に影響する要因について解説する。

【CE 法の発見と製品化】

サルモネラ感染予防のための CE 法は、1973 年に Nurmi と Rantala [7] により報告された (表 1)。これは腸内細菌叢が未形成なためにサルモネラに対して感受性が高い初生ひなに健康な成鶏の腸内容物の希釈液またはその嫌気培養液を経口的に給与して腸内細菌叢を早期に形成させ、その後腸管内に侵入するサルモネラを競合

受理: 2022年5月11日

表1 成鶏腸内容物希釈液給与ひなにおけるサルモネラ排除効果 (Nurmi et al., 1973)

区	成鶏腸内容物希釈液給与 ^{a)}	接種菌数 ^{b)} (cfu/羽)	サルモネラ陽性羽数 / 検査羽数 (%)
1	有	10 ³	0/13 (0)
2	有	10 ⁶	1/13 (8)
3	無	10 ³	12/12 (100)
4	無	10 ⁶	10/10 (100)

a) 成鶏腸内容物の 10 倍希釈液を 1-2 日齢のひなに経口的に給与 (0.5ml/羽) した。

b) 成鶏腸内容物の希釈液の給与の翌日に *Salmonella* Infantis 野外分離株を経口接種した。

表2 CE製品を給与したひなでのサルモネラ排除効果^{a)} (今井ら, 未発表)

区	CE 給与	接種菌数 (cfu/羽)	盲腸内容物中サルモネラ菌数 (log cfu/g)
1	有	10 ³	2.0
2	有	10 ⁶	6.63
3	無	10 ³	6.33
4	無	10 ⁶	6.70

a) 各区に初生ひな 12 羽を供試し、CE 製品を経口的に給与した 24 時間後に *S. Typhimurium* L-417 NaI^r 株を経口接種した。

的に排除する方法でヌルミ法とも言われている。

元々、親鳥の下で抱卵され孵化したひなは、親の糞を啄むことで成鶏の腸内細菌叢を早期に獲得し、サルモネラを競合排除する方法を自然に身に付けていたと考えられる。しかし、現代の養鶏産業では、種卵は衛生管理が徹底された施設で孵化するため、種鶏から腸内細菌叢を受け継ぐ機会はなく、ひなはサルモネラに対して感受性が高い状態で農場に搬入され感染リスクに曝されることになる。鶏の発育ステージの中で最も感染を受けやすい初生ひなの時期におけるサルモネラ対策は極めて重要であり、その対策には CE 法が最適と考えられる。

当初、CE 法はフィンランドにおけるブロイラーのサルモネラ対策に試され、その効果が認められていった。その後、CE 効果を発揮する成鶏の腸内細菌叢が製品化されたことで、CE 法は欧州諸国ならびに世界に広がり、現在ではわが国でも CE 製品が使用されている。なお、CE 製品には SPF 鶏の腸内容物・糞便を嫌気培養した Undefined Culture と、既知の菌を混合した Defined Culture の 2 種類がある。

【CE 効果に影響を及ぼす要因】

1. CE 製品の給与からサルモネラ感染までの時間

CE 製品の給与後、ひなの腸管においてサルモネラに対して CE 効果を示すまでには 6 ~ 8 時間必要であり、CE 製品給与と同時あるいはその 1 時間後の感染では十分な効果が得られないことが知られている [11]。孵化後のひなの腸管は腸内細菌叢が未成熟であるためサルモネラに感染しやすい状態であることから、CE 製品の給与は可能な限り早期に済ませることが望ましく [5]、農場であれば入雛直後になるが、可能であれば農場よりも早い段階の孵化場での実施が推奨される。また、種卵ならびに孵化場施設はサルモネラ陰性が保たれていることが必要である。

2. サルモネラ感染菌数

CE 法は初生ひなにおいて比較的少ない菌数のサルモネラ感染に対して有効である一方で、経口接種菌数が 1 羽あたり 10⁶cfu になると CE 効果が低下することを私たちは確認している (表 2)。このことから、入雛する鶏舎内に洗浄消毒不足によるサルモネラの生残箇所があると

CE効果が期待どおりに得られない可能性がある」と推察される。したがって、鶏舎施設ならびに器具等の洗浄消毒を徹底し、飼育環境全体をサルモネラ陰性化または汚染菌数の最少化にすることがCE効果をより確かなものにする方法と言える。

3. CE製品の溶解水・希釈水

CE製品の溶解ならびに希釈に用いる水に塩素が含まれているとCE効果が低下することが知られている。通常、塩素濃度が0.1 ppmで効果に影響するとされており、その対策として溶解または希釈に用いる水を予め汲み置かすスキムミルク等を添加して脱塩素して用いることが推奨される [9]。

4. ストレス

(1) 温度

孵化後間もないひなに温度ストレスを負荷すると、サルモネラに対する感受性が高まることが知られている。Soerjadiら [10] は18-22℃で飼育した初生ひなは32-36℃で飼育したひなに比べてサルモネラに感染し易くなることを報告している。私たちは20-24℃または30-34℃の環境下で飼育した初生ひなにおけるCE効果の比較を試み、低温の飼育環境下での効果の低下を確認している (表3)。このことから、鶏舎内温度を目標設定値まで十分に高めるために必要な時間・日数をかけてブルーダー点火等を行って入雛準備を進めることが重要である。

なお、Weinackら [13] は低温飼育環境下のみならず高温飼育環境下においてもCE効果に影響を及ぼすことを報告している。孵化直後のひなは周囲の温度に対して体温を調節する能力が極めて低いので適切な温度管理で正常体温を

保持させることが大切である。

(2) 断餌・断水

腸内細菌叢が確立している成鶏であっても断餌によってサルモネラに対する感受性が高まることからHoltら [2] によって明らかにされている。また、Gorenら [1] はCE製品の試験品を給与した後、その当日から給餌を開始しなければCE効果が十分に得られない恐れがあることを示唆している。

一方、断水処置による影響については報告例が少ないが、サルモネラ感染ひなにおける排菌期間が断水によって長引く事実を考えればCE効果に影響を及ぼすことが予想される。

これらのことから、給餌・給水システムの適正管理もCE製品の効果を確保するための管理項目になる。

5. 疾病

(1) コクシジウム症

コクシジウム感染は腸管粘膜を損傷させ、サルモネラに対する感受性を高めることが知られている。LaFontら [4] はCE効果を示す腸内容の培養物を給与したひなが*Eimeria tenella*に感染するとサルモネラの排菌数が増加し、排菌期間も延長しCE効果が低下したことを報告している。

(2) 呼吸器感染症

CE効果を示す腸内容培養物を給与したひなにサルモネラを接種した後に*Mycoplasma gallisepticum* (MG) とinfectious bronchitis virus (IBV) を混合感染させるとクロアカスワブからのサルモネラ陽性率が高まることをWeinackら [12] は報告している (表4)。

表3 飼育温度がCE効果に及ぼす影響^{a)} (今井ら, 未発表)

区	CE給与	飼育温度 (°C)	盲腸内サルモネラ菌数 (log cfu/g)
1	有	30-34	1.94 ± 2.66
2	有	20-24	6.45 ± 2.05
3	無	30-34	7.34 ± 0.58
4	無	20-24	8.29 ± 0.71

^{a)}: SPF鶏盲腸内容物で作製したCE培養物を初生ひなに経口投与し、その24時間後に*S.Typhimurium* L-417 NaI^r株を経口接種した (10³cfu/羽)。

表4 MGおよびIBVの混合感染がCE効果に及ぼす影響^{a)} (Weinack et al., 1984)

区	CE 給与	MG-IBV 混合感染	クローカスワブのサルモネラ陽性率	
			MG-IBV 感染前	MG-IBV 感染後
1	無	無	20/20 ^{b)}	20/20
2	有	無	0/20	0/20
3	無	有	20/20	20/20
4	有	有	0/20	6/20

a) CE を初生ひなに経口的に給与した後、3日齢で *S. Typhimurium* Nal^r 株を経口接種 (2×10^4 cfu/羽) し、22日齢で MG-IBV を噴霧で感染した。

b) サルモネラ陽性羽数 / 検査羽数

表5 CE製品ならびに *B. subtilis* を給与したひなにおけるCE効果^{a)} (今井ら, 2008)

区	CE 製品 ^{b)}	生菌剤 ^{c)}	<i>S. Enteritidis</i> 菌数 (平均菌数 ± 標準偏差) ^{d)}			
			7	14	21	28
1	-	-	7.21 ± 0.84 ^A	5.88 ± 1.01 ^A	4.81 ± 1.17 ^A	4.17 ± 1.59 ^A
2	-	+	5.79 ± 1.24 ^B	4.72 ± 0.76 ^B	3.19 ± 1.32 ^B	1.84 ± 1.52 ^B
3	+	-	4.77 ± 0.51 ^C	2.22 ± 1.29 ^C	0.00 ± 0.00 ^C	0.31 ± 0.94 ^C
4	+	+	3.65 ± 1.41 ^D	1.51 ± 1.20 ^C	0.40 ± 0.84 ^C	0.00 ± 0.00 ^C

a) 7日齢時に *S. Enteritidis* ZK-2ax リファンピシン耐性株をひなの嚙嚢内に接種 (10^3 cfu/羽) して評価試験を実施した。

b) - : 給与なし, + : 給与あり (初生時に1回のみ)

c) - : 給与なし, + : 給与あり (飼料1g中に *B. subtilis* 菌株を 2×10^6 cfu の割合で添加したものを初生時から試験終了時まで給与)

d) *S. Enteritidis* 接種後7~21日目は盲腸便を, 接種後28日目は盲腸内容物を検体とし, それらの菌数 (log cfu/羽) を測定した。

A, B, C, D : 異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)。

このことから、MG-IBV の呼吸器感染症対策は生産成績の維持・改善のみならずサルモネラ対策においても重要と考えられる。

(3) Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)

IBDV は養鶏場に広く浸潤しており、免疫抑制、他疾病の増悪、ワクチン効果の低下を引き起こすことが知られている。

IBDV と *S. Enteritidis* (SE) をひなに混合感染すると、重度の病変が形成されるとともに、斃死率は対照区1%、IBDV 単独感染区10%、SE 単独感染区1% に対して、混合感染区32%と最も高い値を示すことを Phillips ら [8] は報告している。IBDV は鶏のサルモネラ感染を増悪させることからCE効果に影響する恐れがあると考えられる。

以上のように、CE効果をより確実なものに

するにはサルモネラのみならず各種病原体の対策も十分に実施することが必要である。

(4) 生菌剤

生菌剤は、腸内細菌叢を維持又は正常化して家畜・家禽の成長を促進する目的 [6] で養鶏用飼料の添加物としてしばしば用いられている。そこで私たちは、CE製品と *Bacillus subtilis* 菌株の生菌剤を組み合わせひなに給与し、*S. Enteritidis* に対するCE効果に与える影響を評価した。その結果、CE製品と生菌剤を組み合わせ給与した区は、それぞれを単独で給与した区および対照区と比較して、とくに感染初期からサルモネラ増殖抑制効果が認められた (表5) [3]。

このことから、*B. subtilis* の生菌剤はCE製品が有する効果に対して負の影響を示さず、むしろ

表6 ブロイラー農場でのCE製品評価試験におけるサルモネラ陽性率（試験1）

鶏舎	微生物資材 ^{a)}	入雛前			ひな 輸送箱	盲腸便	
		給餌器	給水器	床		3週齢	8週齢
A	CE+BS	6/10 ^{b)} (60) ^{c)}	5/10 (50)	4/4 (100)	0/8 (0)	16/20 (80)	20/20 (100)
B	BS	4/10 (40)	1/10 (10)	1/4 (100)	0/8 (0)	20/20 (100)	20/20 (100)

a) CE：CE製品、BS：*B. subtilis* 菌株の生菌剤を飼料に添加して給与

b) サルモネラ陽性数 / 検体数

c) 陽性率 (%)

表7 ブロイラー農場でのCE製品評価試験におけるサルモネラ陽性率（試験2）

鶏舎	微生物資材 ^{a)}	入雛前			ひな 輸送箱	盲腸便	
		給餌器	給水器	チックガード		2週齢	6週齢
A	CE+BS	0/20 ^{b)} (0) ^{c)}	0/20 (0)	0/10 (0)	0/8 (0)	0/20 (0)	0/20** (0)
B	-	0/20 (0)	0/20 (0)	0/10 (0)	0/8 (0)	1/20 (5)	16/20 (80)

a) CE+BS：初生でCE製品を給与し、*B. subtilis* 菌株の生菌剤を飼料に添加して入雛～出荷まで給餌、

-：CE製品および生菌剤の給与なし

b) サルモネラ陽性数 / 検体数

c) 陽性率 (%)

**：B鶏舎（対照区）のサルモネラ陽性率と比較して有意差あり ($P < 0.01$)

る感染初期においてはCE効果をさらに確実に
する可能性が考えられる。

のサルモネラ浄化対策に貢献できると考えられ
た。

【野外応用での効果確認】

CE製品を用いてサルモネラ汚染農場の浄化に成功した国内の事例報告は極めて少ない。私たちはサルモネラ汚染が継続しているブロイラー農場においてCE製品を活用した浄化対策を実施し、効果を確かにするための知見を得た。すなわち、洗浄消毒作業を実施したものの鶏舎内施設・器具にサルモネラが残存した状態で入雛した場合は、農場到着時にCE製品を給与するとともに生菌剤添加飼料を出荷時まで給餌してもその効果は期待通りに得られ難いことが示された（表6）。それに対して、孵化場でのCE製品を給与した後、サルモネラの残存が見られない鶏舎に入雛して生菌剤添加飼料を出荷時まで給餌した鶏群はサルモネラ陰性状態が維持されることを確認した（表7）。このことから、鶏舎の水洗・消毒を徹底し、飼育環境の清浄度を高めた上でCE製品をひなに給与すると農場

【まとめ】

CE法は生産現場におけるサルモネラの水平感染防止に役立ち、農場での衛生対策の一手段として有用であると考えられる。また、CE法は副作用・薬剤耐性菌出現・残留等の問題がなく、環境に負荷をかけない病原菌防除法としても期待される。なお、野外応用の際に確かなCE効果を引き出すには、効果に影響する要因を事前に把握し対処することが不可欠である。

【引用文献】

- [1] Goren, E., de Jong, W. A., Doornenbal, P., Koopman, J. P. and Kenniset, H. M. 1984. Protection of chicks against *Salmonella* infantis infection induced by strict anaerobically cultured intestinal microflora. *Vet. Q.* 6 : 22-26.
- [2] Holt, P. S. and Porter, R. E. 1992. Effect of induced molting on the course of infection and transmission of *Salmonella* enteritidis in White Leghorn hens of

- different ages. Poult. Sci. 71 : 1842-1848.
- [3] 今井康雄, 熊谷直祐, 田中剛志, 小川めぐみ, 佐藤静夫. 2008. 競合排除資材によるひなのサルモネラ対策. 鶏病研報. 44 (増) : 27-36.
- [4] Lafont, J. P., Brée, A., Naciri, M., Yvoré, P., Guillot, J. F. and Chaslus-Dancla, E. 1983. Experimental study of some factors limiting 'competitive exclusion' of salmonella in chickens. Res. Vet. Sci. 34 : 16-20.
- [5] 中村政幸. 1995. 鶏のサルモネラ防除における競合排除法、ワクチン、抗菌剤使用に関するWHO (世界保健機関) - FEDESA (欧州家畜衛生協議会) - FEP (ドイツ応用疫学・生態学振興協会) ワークショップ. 鶏病研報. 31 : 1-9.
- [6] 日本科学飼料協会. 2007. 成長促進又は飼料効率の改善の効果を確認する試験 (生菌剤) : 飼料添加物の評価基準及びその試験方法 第3版. 日本科学飼料協会, 東京, pp.13-16.
- [7] Nurmi, E. and Rantala, M. 1973. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. Nature 241 : 210-211.
- [8] Phillips, R. A. and Opitz, H. M. 1995. Pathogenicity and persistence of *Salmonella* enteritidis and egg contamination in normal and infectious bursal disease virus-infected leghorn chicks. Avi. Dis. 39 : 778-87.
- [9] Pivnic, H., Blanchfield, B. and D'Aoust, J. T. 1981. Prevention of *Salmonella* infection in chicks by treatment with fecal cultures from mature chickens (Nurmi Cultures). J. Food Prot. 44 : 909-916.
- [10] Soerjadi-Leim, A. S., Druitt, J. H., Lloyd, A. B. and Cumming, R. B. 1979. Effect of environmental temperature on susceptibility of young chickens to *Salmonella typhimurium*. Aust. Vet. J. 55 : 413-417.
- [11] Stavric, S., Gleeson, T. M., Blanchfield, B. and Pivnick, H. 1987. Role of adhering microflora in competitive exclusion of *Salmonella* from young chicks. J. Food Prot. 50 : 928-932.
- [12] Weinack, O. M., Snoeyenbos, G.H., Smyser, C. F. and Soerjadi-Liem, A. S. 1984. Influence of *Mycoplasma gallisepticum*, infectious bronchitis, and cyclophosphamide on chickens protected by native intestinal microflora against *Salmonella typhimurium* or *Escherichia coli*. Avi. Dis. 28 : 416-425.
- [13] Weinack, O. M., Snoeyenbos, G. H., Soerjadi-Leim, A. S. and Smyser, C. F. 1985. Influence of temperature, social, and dietary stress on development and stability of protective microflora in chickens against *S. typhimurium*. Avi. Dis. 29 : 1177-1183.

Application of competitive exclusion products to control Salmonellas in Poultry

Yasuo Imai

Zennoh Institute of Animal Health
285-0043 7 Ohja-machi, Sakura-shi, Chiba-ken, Japan
Tel: +81-43-486-1011
Fax: +81-43-486-1571
E-mail: imai-yasuo@zennoh.or.jp

[Abstract]

In newly hatched chicks, the rapid establishment of an adult-type intestinal microbiota, via the oral route, produces almost immediate resistance to colonization by salmonellas that gain access to the rearing environment. The phenomenon is known as competitive exclusion (CE). Primarily, the CE treatment is a prophylactic measure that is aimed at increasing the resistance of chicks to salmonella infection by compensating for the slow development of the native gut microbiota under commercial conditions. For prophylactic use, the chicks being treated should be salmonella-free, otherwise the effect is likely to be minimal.

Exploitation of the CE effect is now an accepted part of the overall strategy by which poultry-associated salmonellas are being controlled in many countries.

This review covers practical aspects of CE treatment and factors affecting efficacy in both laboratory trials and field studies. Field trials pose certain difficulties that are not experienced in laboratory studies. Under field conditions, the efficacy of CE treatment can be adversely affected by various kinds of stress, although few studies have been devoted to this particular problem. With the chick, physiological stress induced by high or low environmental temperatures or deprivation of feed and water can interfere with the establishment of a protective microbiota or reduce the protection obtained.

Exposure to disease agents can also affect the salmonella carrier state and increase shedding. Therefore, it is important to avoid any stress, especially in the early stages of establishing an adult type microbiota in chicks.

Keywords: application of competitive exclusion (CE) products, chicken, efficacy of CE, intestinal microbiota, *Salmonella* control