

肉用鶏における *Mycoplasma gallisepticum* の 野外感染症例

小高真紀子^{1)†} 深水 大²⁾ 石田 剛²⁾ 小河大輔²⁾
横山敦史¹⁾ 芝原友幸³⁾

- 1) 福岡県筑後家畜保健衛生所 (〒833-0041 筑後市和泉606-1)
2) 福岡県中央家畜保健衛生所 (〒812-0051 福岡市東区箱崎ふ頭4-14-5)
3) 独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2012年11月29日受付・2013年3月18日受理)

要 約

2011年3月、福岡県の肉用鶏農場において、鼻汁漏出、異常呼吸音、嗜眠、うずくまりを呈し死亡鶏が増加した。剖検では、気嚢の混濁及び気嚢や腸管漿膜にチーズ様物の付着がみられ、組織検査では気管粘膜固有層にリンパ濾胞形成を伴ったリンパ球、形質細胞の浸潤による肥厚が認められた。気管及びチーズ様物から *Mycoplasma gallisepticum* (MG) が分離されるとともに特異遺伝子が検出され、免疫組織化学的染色で気管の粘膜表面にMG陽性反応が認められ、さらに検査に供したすべてがMG抗体陽性であった。また、その他の病原体の関与を示唆する検査成績は得られなかった。以上の結果から、今回の症例をMG感染症と診断、肉用鶏での野外感染症例としてはまれな症例と考えられた。——キーワード：プロイラー、*Mycoplasma gallisepticum*。

----- 日獣会誌 66, 474～478 (2013)

鶏のマイコプラズマ症は鶏の比較的伝染性の強い慢性呼吸器感染症であり、日本では鶏及び七面鳥の *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) 感染症を家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定している。しかし、単独感染では不顕性な場合が多く、他の呼吸器病原体との混合感染や環境悪化により発症し重篤化する [1]。

今回、福岡県内の肉用鶏農場で、鼻汁漏出等の症状を呈し死亡鶏が増加した事例をMG感染症と診断したので、その概要を報告する。

材料及び方法

発生農場の概要：開放式平飼いの9鶏舎に1鶏舎あたり7,500～9,000羽の初生雛を2011年1月20～26日に2カ所の孵化場から導入し、合計72,000羽の肉用鶏が飼育されていた。飼養方法はオールイン・オールアウトで敷料は戻し堆肥を使用し、ワクチンは初生（伝染性気管

支炎 (IB)、鶏痘、マレック病及び大腸菌)、12日齢 (ニューカッスル病 (ND)・IB混合)、21日齢 (ND及び伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD)) に接種されていた。

材料：8号鶏舎の42日齢の衰弱鶏10羽を鑑定殺し、検査に用いた。

病理学的検査：臓器は10%中性緩衝ホルマリンで固定し、常法に従いパラフィン包埋切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。また、免疫組織化学的にMG及びIBウイルス (IBV) 抗原の検出を行った。一次抗体に抗MG家兎血清 (全農家畜衛生研究所より分与)、抗IBVマウス抗体 (HyTest Ltd, Finland) を用い、2次抗体に組織検査用蛋白キット (ヒストファインシンプルステインMAX-PO (R) または (M)、ニチレイ株、東京) を用いた (独動物衛生研究所にて実施)。

ウイルス学的検査：ウイルス分離は、気管、直腸、腎臓の乳剤 (各部位10羽プール) を発育鶏卵の漿尿膜腔内に接種し、3代継代しHA試験及び鶏胚の形態を観察

† 連絡責任者(現所属)：小高真紀子 (福岡県農業総合試験場)

〒818-8549 筑紫野市大字吉木587

☎092-925-5177 FAX 092-925-5308

E-mail : odaka-m2639@pref.fukuoka.lg.jp

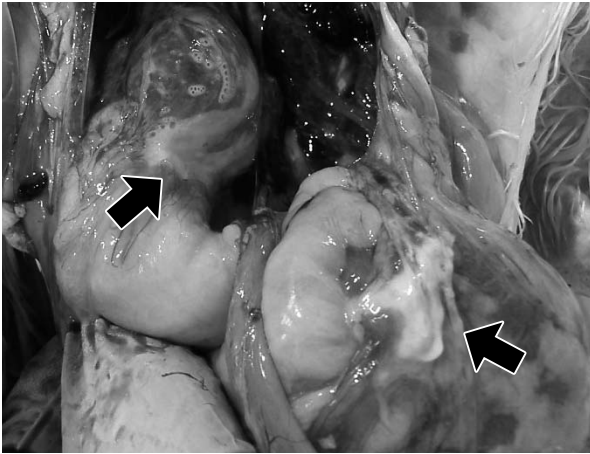


図1 気嚢の黄色混濁とチーズ様物 (矢印) (No. 8)

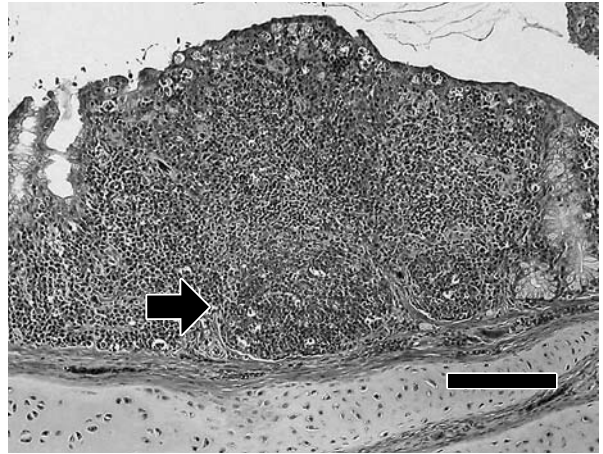


図2 気管の病理組織像 (No. 2)
濾胞形成 (矢印) を伴うリンパ球・形質細胞の浸潤による粘膜肥厚がみられる。(HE染色 Bar = 500μm)

表1 供試鶏の解剖所見

個体番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
体重 (kg)	1.9	1.5	1.9	2.2	1.8	2.0	2.2	2.0	2.3	2.0
気嚢 黄色混濁, チーズ様物	-	-	+	-	+	-	-	++	-	-
腹腔 腸管漿膜面に チーズ様物	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
十二指腸 粘膜肥厚	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
粘膜面出血	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
空回腸 粘膜肥厚	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
盲腸 粘膜点状出血	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-

++：中等度，+：軽度，-：病変無し

表2 供試鶏の病理組織所見

病変	鶏No.1	2	3	4	5
気管 粘膜固有層の濾胞形成を伴ったリンパ球・形質細胞浸潤による肥厚	+++	+++	+++	+++	+++
粘膜上皮の増生と線毛の消失	+++	+++	+++	+++	+++
肺 二次及び三次気管支粘膜における、一部で濾胞形成を伴ったリンパ球主体の単核細胞浸潤・集簇	++	+++	-	-	-
三次気管支腔内やその周囲に単核細胞・偽好酸球の浸潤、漿液・線維素の滲出	-	++	+++	-	-
肝臓 偽好酸球・単核細胞の浸潤集簇	++	+	+	+	-
脾臓 蔕組織の壊死	-	-	++	-	-
腎臓 間質にリンパ球の浸潤集簇	++	-	++	-	-

+++：重度，++：中等度，+：軽度，-：病変無し

した。鳥インフルエンザウイルス (AIV) の抗原検索は気管スワブと初代及び2代目の発育鶏卵から回収した尿膜腔液を用いて迅速検査キット (エスプライン, 富士レピオ(株), 東京) で実施した。遺伝子検索は分離用乳剤, ファブリキウス嚢 (F嚢) 乳剤及び2代目の尿膜腔液からDNA抽出キット (QIAamp DNA Mini Kit, (株)キアゲン, 東京) 及びRNA抽出キット (RNeasy Mini Kit, (株)キアゲン, 東京) を用いてDNA及びRNAを抽出後, PCR法 (TaKaRa Taq, タカラバイオ(株), 滋賀) により伝染性喉頭気管炎ウイルス (ILTV) [2], またRT-PCR法 (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, (株)キアゲン, 東京) によりAIV [3], NDウイルス (NDV) [4], IBV [5], IBDウイルス (IBDV) [6] について行った。また, 分離されたIBVのS1領域遺伝子のRT-PCR産物はキット (QIAquick PCR Purification Kit, (株)キアゲン,

東京) で精製し, ダイレクトシーケンス法により解析を行った ((株)ジーンネット, 福岡に依頼)。得られた塩基配列はNCBIデータベースに登録されているIBVとの相同性解析を行った。

細菌学的検査: 一般細菌は気管スワブ, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓及び心臓を5%馬血液加トリプトソイ寒天培地 (馬脱線血, (株)日本バイオテスト研究所, 東京, トリプトソイ, 栄研化学(株), 栃木) 及びDHL寒天培地 (栄研化学(株), 栃木) に直接塗抹し, 37℃で24時間培養した。マイコプラズマは, 常法に従い培養した [7, 8]。MG及びMSの遺伝子検索は気管スワブ, チーズ様物及び分離株をDNA抽出キット (InstaGene Matrix, BioRad(株), 東京) で抽出後, PCR法 (KOD FX, 東洋紡績(株), 大

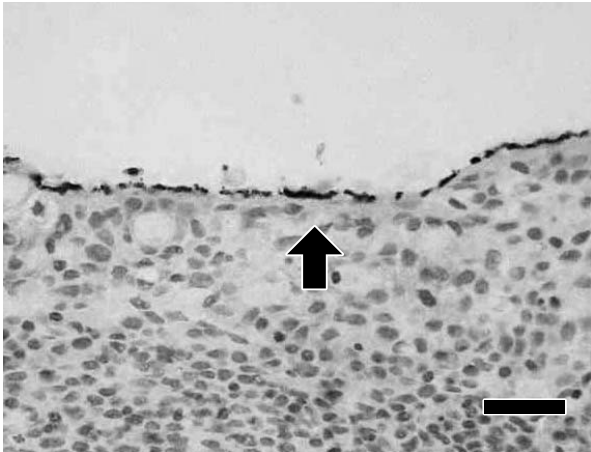


図3 気管の免疫組織化学的染色像 (No. 2)
 粘膜上皮の細胞上部で抗 *M. gallisepticum* 家兔血清に陽性反応 (矢印) を示している。
 (免疫組織化学 Bar = 10 μm)

表3 供試鶏における *M. gallisepticum* 検索成績

項目	方法	材料	鶏No.1	2	3	4	5	8
遺伝子検索	PCR法	気管スワブ	+	+	+	+	+	ND
		チーズ様物	ND	ND	ND	ND	+	+
病原検索	細菌分離	気管スワブ	+	+	*	*	+	ND
		チーズ様物	ND	ND	ND	ND	+	+
抗原検索	免疫組織化学的染色	気管	+++	+++	-	+	++	ND

+++ : 多量 ++ : 中等量
 + : 少量 (PCR法及び細菌分離は陽性)
 * : マイコプラズマ単離不能 - : 陰性 ND : 未実施

阪)で特異遺伝子の検出を行った [9, 10], 抗体検査は市販抗原 (日生研株, 東京) を用い急速凝集反応で行った。

環境要因検査: 発生当時の気温は気象庁より発生農場近隣のアメダス観測データを用いた。

成 績

発生概要: 2011年3月8日, 1月26日に導入された7,500羽 (42日齢) を飼養する鶏舎において, 鼻汁漏出, 異常呼吸音, 嗜眠, うずくまりが認められ, 死亡羽数が増加した。死亡羽数は3月6日35羽, 7日48羽, 8日121羽, 計204羽 (死亡率2.7%) であった。なお他の鶏舎では死亡羽数の増加などの異常は認められなかった。

解剖所見: 気嚢は黄色混濁し, チーズ様物 (3/10) を認めた (図1)。腸管漿膜面はチーズ様物が付着 (2/10) し, 十二指腸粘膜は肥厚及び出血 (1/10), 空回腸粘膜は肥厚 (1/10), 盲腸粘膜は点状出血 (1/10) を認めた (表1)。

病理組織学的所見: 気管炎及び気管支肺炎が主な病変であった (表2)。気管は粘膜固有層に濾胞形成を伴ったリンパ球・形質細胞浸潤による著しい肥厚 (5/5) (図2) や粘膜上皮の増生と線毛の消失 (5/5) を認め, MG抗原は, これらの気管病変部の粘膜上皮細胞上部において陽性反応 (4/5) を示した (図3, 表3)。一方, IBV抗原は, 1羽の気管の粘膜上皮細胞で軽度, 散在性に検出されたが, 他の個体 (4/5) では陰性であった。肺は, 二次及び三次気管支粘膜における, 一部で濾胞形成を伴ったリンパ球主体の単核細胞浸潤・集簇 (2/5), 三次気管支腔内やその周囲に単核細胞・偽好酸球の浸潤や漿液・線維素の滲出 (2/5) を認めた。

肝臓は偽好酸球・単核細胞の浸潤集簇 (4/5), 脾臓は莢組織の壊死 (1/5), 腎臓は間質にリンパ球の浸潤集簇 (2/5), 十二指腸及び盲腸は粘膜上皮や固有層にコクシジウムの寄生 (3/5, 1/5) を認めた。

ウイルス学的検査: 気管からIBVが分離された。分離されたIBVのS1領域遺伝子はワクチン株のTM-86株 (JP-II型) と塩基配列が100%一致した。AIVを含め他のウイルスは分離, 特異遺伝子及び抗原検出ともに陰性であった。

細菌学的検査: MGは分離 (気管3/5, チーズ様物2/2) 及び特異遺伝子 (気管5/5, チーズ様物2/2) の検出で確認された (表3)。大腸菌は心臓, 肝臓, 腎臓, 肺 (それぞれ1/5) から少量及び肺 (1/5) から中等量分離された。MG, MSの抗体陽性は10/10, 0/10であった。

観測データ: 最低気温は, 3月1日6.4℃, 2~5日の4日間は氷点下を示した。

考 察

今回, MGは急速凝集反応による抗体検査ですべての鶏が陽性を示し, 免疫組織化学的染色で気管の粘膜表面に抗原が確認され, 気管及びチーズ様物から特異遺伝子が検出された。また同材料から分離されたマイコプラズマはPCR法によりMGと確認された。

一般に, MGは健康な鶏が単独で感染しても臨床症状を示さないことが多く, MGに感染した鶏が他の微生物との複合感染により臨床症状を示したり病勢が悪化することが知られている。野外では, *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* [11] や大腸菌 [12] の感染, 強毒なIBDVの感染 [13] による免疫抑制に起因する場合, 生ウイルスワクチン (NDとIB [14]) やアンモニアによる粘膜の損傷 [15] に起因する場合が知られている。

病原因子では, 細菌検査で大腸菌が複数の臓器から分

離されたが、その分離菌数は少なく、病理学的にも大腸菌症でみられる心外膜炎や肝包膜炎等の所見は認められなかった。ウイルス検査でIBVが気管から分離されたが、S1領域遺伝子塩基配列がワクチン株であるTM-86株(JP-II型)と100%一致した。また、IBVの抗原は、免疫組織化学的染色で1羽の気管の粘膜上皮細胞で軽度、散在性に検出されたが、その他の個体は陰性であり、今回の発症要因としてIBVの関与は軽度と考えられた。

環境要因では、発生時鶏舎内でアンモニア臭を強く感じたことからアンモニア濃度は25~30ppm程度と推測された[16]。また、外気の最低温度が死亡羽数の増加する数日前から氷点下を示しており、カーテンの閉め切り等鶏舎内の換気が不十分であった可能性が高く、加えて発生農場の敷料の管理失宜(使用済み敷料の不交換と発酵途中で入糞)が影響し、鶏舎内のアンモニア濃度が高い傾向にあったことが推察された。Satoら[15]はアンモニア濃度が20ppmでもMG感染の助長を確認していることから、今回の発症要因を鶏舎内アンモニアが環境ストレスとなってMGの病勢を悪化させたと推察した。

また、以上の結果から、死亡鶏の検査を実施していないため確定はできないものの、不良環境の影響を受けたMGの単独発症が死亡の原因となった可能性が示唆された。

野外における肉用鶏でのMG感染症の報告は少なく、その理由の一つとして確定診断にMGの分離培養が必要で、他の病原体との複合感染が診断を難しくしているためと思われる。特に肉用鶏において大腸菌が侵入し病勢を増悪させた事例では、肉眼所見や病理所見において心外膜炎や肝包膜炎及び気嚢炎が観察され大腸菌性敗血症の病変と区別が不可能[17]で、大腸菌症を疑い一般細菌のみ分離が行われたり、マイコプラズマの分離において大腸菌が分離を困難にしていると思われる。今回は早期通報により複合感染前に病性鑑定を行うことによりMGを高率に分離できた事例と思われた。また、組織学的にも特徴的な病変[18]を観察し、免疫組織化学的染色でMG抗原が確認された。免疫組織化学的染色での抗原確認は、採卵鶏[13]やウズラ[19]での報告はあるが、野外の肉用鶏症例では、わが国ではほとんど報告がなく貴重な症例と思われた。谷口[18]は、組織学的な所見でMG感染症と経過の長いILTでは同様な所見を示し組織診断が不可能なことがあると報告しているが、このような事例において免疫組織化学的染色は有用であると思われた。一方で組織学的所見があるにも関わらず、MG抗原が少量または陰性(それぞれ1/5)であった理由は、感染ステージによる個体間でのMG抗原量の違いや採材部位によるMG抗原量のばらつきなどが関係し

ていると考えられた。

鶏マイコプラズマ感染症の予防は介卵感染並びに気道感染による鶏群へのマイコプラズマの伝播を防止することが基本である。そして他の病原因子や環境因子による被害の拡大を防止する必要がある。そのため呼吸器病予防を目的とした適切なワクチンプログラムと換気等の鶏舎内環境の改善に注意を払うように指導することが肝要である。

当該農場に対しては清浄種鶏の雛の導入、鶏舎内の洗浄消毒、敷料の発酵後の入糞と使用済み敷料の搬出を指導徹底し、現在発生はみられていない。

引用文献

- [1] 今田由美子：マイコプラズマ症、鳥の病気、鶏病研究会編、第7版、66-69、鶏病研究会、茨城(2010)
- [2] Alexander HS, Nagy E : Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens, *Avian Dis*, 41, 646-653 (1997)
- [3] Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK : Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR, *J Virol Methods*, 97, 13-22 (2001)
- [4] Mase M, Imai K, Sanada Y, Sanada N, Yuasa N, Imada T, Tsukamoto K, Yamaguchi S : Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan, *J Clin Microbiol*, 40, 3826-3830 (2002)
- [5] Mase M, Tsukamoto K, Imai K, Yamaguchi S : Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan, *Arch Virol*, 149, 2069-2078 (2004)
- [6] Lin Z, Kato A, Otaki Y, Nakamura T, Sasmaz E, Ueda S : Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan, *Avian Dis*, 37, 315-323 (1993)
- [7] Frey M, Hanson R, Anderson D : A medium for the isolation of avian mycoplasmas, *Am J Vet Res*, 29, 2163-2171 (1968)
- [8] 八木橋 武：トリ由来マイコプラズマの培地と分離培養、マイコプラズマとその実験法、興水 馨、第1版、336-349、近代出版、東京(1988)
- [9] Kiss I, Matiz K, Kaszanyitzky E, Chavez Y, Johansson KE : Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay, *Vet Microbiol*, 58, 23-30 (1997)
- [10] Lauerman LH, Hoerr FJ, Sharpton AR, Shah SM, van Santen VL : Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*, *Avian Dis*, 37, 829-834 (1993)
- [11] Kato K : Infectious coryza of chickens. V. Influence of *Mycoplasma gallisepticum* infection on chicken infected with *Haemophilus gallinarum*, *Natl Inst Anim Hlth Q*, 5, 183-189 (1965)
- [12] Ando K : Respiratory mycoplasmosis in chickens [in

- Japanese], Natl Inst Anim Hlth Q, 62, 108-121 (1971)
- [13] Nunoya T, Yagihashi T, Tajima M, Nagasawa Y : Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens, Vet Pathol, 32, 11-18 (1995)
- [14] Nonomura I, Sato S, Syoya S, Shimizu F, Horiuchi T : Multiplication of *Mycoplasma gallisepticum* and Newcastle disease virus B1 strain in the respiratory tract of chickens, Natl Inst Anim Hlth Q, 11, 1-10 (1971)
- [15] Sato S, Shaya S, Kobayashi H : Effect of ammonia on *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens, Natl Inst Anim Hlth Q, 13, 45-53 (1973)
- [16] 吉田賢治 : 鶏の管理よりみた環境要因としてのアンモニア, 鶏病研究会報, 13, 57-64 (1977)
- [17] 井上 勇 : 大腸菌症, 鶏病臨床図説, 井上 勇編, 第1版, 185-193, 日本畜産振興会, 東京 (1979)
- [18] 谷口稔明 : 伝染性喉頭気管炎の病理変化, 鶏病研究会報, 13増刊, 15-21 (1977)
- [19] Murakami S, Miyama M, Ogawa A, Shimada J, Nakane T : Occurrence of conjunctivitis, sinusitis and upper region tracheitis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), possibly caused by *Mycoplasma gallisepticum* accompanied by *Cryptosporidium* sp. infection, Avian Pathol, 31, 363-370 (2002)

Mycoplasma gallisepticum Infection in Broiler Chickens

Makiko ODAKA^{1)†}, Dai FUKAMIZU²⁾, Tsuyoshi ISHIDA²⁾, Daisuke OGAWA³⁾,
Atushi YOKOYAMA¹⁾ and Tomoyuki SHIBAHARA³⁾

- 1) *Fukuoka Prefectural Chikugo Livestock Hygiene Service Center, 606-1 Izumi, Chikugo, 833-0041, Japan*
- 2) *Fukuoka Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center, 4-14-5 Hakozakifutou, Higashi-ku, Fukuoka, 812-0051, Japan*
- 3) *National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

In March 2011, broiler chickens reared on a farm in Fukuoka prefecture showed nasal discharge, respiratory rales, closed eyes and crouching. The mortality of the chickens increased. Necropsy revealed yellowish caseous exudates in the air sacs and intestinal serous membranes, and turbidity of the air sacs. Histopathologically, the tracheal mucosa was markedly thickened due to the infiltration of lymphocytes and plasma cells with the formation of germinal centers. The epithelial surface of the tracheal mucosa showed a positive reaction against *Mycoplasma gallisepticum* (MG) by immunohistochemical staining. MG was isolated from tissue homogenates of the trachea and yellowish caseous exudates, and an MG-specific gene was amplified by PCR in the same material and MG antibody was detected from all birds examined. On the basis of these findings, we considered a rare field case of MG infection in broiler chickens.

— Key words : broiler chickens, *Mycoplasma gallisepticum*.

† Correspondence to (Present address) : Makiko ODAKA (Fukuoka Agricultural Research Center)
587 Yosiki, Chikushino, 818-8549, Japan
TEL 092-925-5177 FAX 092-925-5308
E-mail : odaka-m2639@pref.fukuoka.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 474 ~ 478 (2013)