

—日本で使用されている動物用診断薬（XX）—
鶏感染症とその診断薬の概説

8 鶏 マイコプラズマ病

永井英貴[†]（農林水産省動物医薬品検査所）

1 鶏マイコプラズマ病の概要

鶏マイコプラズマ病は家畜伝染病予防法で規定する届出伝染病（対象家畜：鶏及び七面鳥）であり、その病原体は、*Mycoplasma gallisepticum* 及び *Mycoplasma synoviae* である。

平成10年から始まった本病の統計では、平成25年まで発生戸数は年0～5戸で推移しているが、発生羽数は0～18,000羽と年によって大きな差がある [1]。本病は不顕性感染が多く、呼吸器病ウイルス、大腸菌等との混合感染により重症化し、成鶏よりも若齢鶏で重症化し、また、寒冷により重症化・慢性化する。

本病には、*M. gallisepticum* または *M. synoviae* の感染による呼吸器病と *M. synoviae* の感染による滑膜炎がみられるが、呼吸器病発症鶏は、異常呼吸音、鼻汁漏出、湿性の咳等を示し、また、滑膜炎発症鶏は、足関節の腫脹、跛行等を示す。産卵鶏に感染すると産卵率の低下が起こり、ブロイラーに感染すると発育阻害、廃棄率の増加等が起こって大きな経済的損害をもたらす。

2 診断方法

鶏マイコプラズマ病の検査は、発症鶏群においては、主として剖検及び細菌検査により行われ、不顕性感染鶏群においては、主として血清学的検査により行われる [2]。

剖検においては、呼吸器病では、鼻腔や眼窩下洞の粘液やチーズ様物、気管の粘液、気囊の混濁肥厚、滲出液、チーズ様物、肺の灰白色肝変化等を指標として診断する。また、関節炎では関節腔等病変部のクリーム様物、チーズ様物等を指標として診断する。

細菌検査は、原因菌の分離培養と同定による。採材は抗マイコプラズマ薬を投与していない鶏群から行い、発症鶏は気管、肺、気囊、関節等の病変部の滲出物、不顕

性感染鶏は鼻腔、眼窩下洞、気管上部等の上部呼吸気道粘膜表面を滅菌綿棒でぬぐって採取する。培地はFreyの寒天培地及びFreyの液体培地を用い、綿棒を、まずは寒天培地に塗抹し、次いで液体培地に洗い込んで接種する。寒天培地は37℃のCO₂ふ卵器で3～7日間培養し、マイコプラズマが存在すれば、2～3日後から実体顕微鏡下でマイコプラズマに特異的な目玉焼き状のコロニーが観察される。液体培地は、ゴム栓をして37℃の通常のふ卵器で培養し、培地の色が黄色に変化するまで1～2週間培養する。黄変したその日のうちに、液体培地を寒天培地に塗抹・培養し、マイコプラズマに特異的なコロニーを確認する。また、同時に黄変した液体培地からDNAを精製し、PCRを用いて同定を行う。

血清学的検査は市販の診断用菌液を用いた平板凝集反応により行う。次項で当該診断用菌液について説明する。

3 診断薬の概要

マイコプラズマ・ガリセプチカム診断用菌液及びマイコプラズマ・シノビエ診断用菌液は、それぞれ1品目ずつ流通しているが、主成分が異なるだけで、反応原理、製法及び使用方法は同一である。

(1) 反応原理

平板凝集反応による血中凝集抗体の検出である。

(2) 製法の概要

マイコプラズマ・ガリセプチカム S6株またはマイコプラズマ・シノビエ SG株の液体培地培養菌を集菌し、得られた菌体を規定濃度になるようにリン酸緩衝食塩液に浮遊した後、チメロサルで不活化し、クリスタルバイオレットで染色したものである。

(3) 使用方法の概要

鶏の血液を被検材料として用いる全血法では菌液2滴（約0.06ml）と血液1滴（約0.03ml）を、血清を被検

[†] 連絡責任者：永井英貴（農林水産省動物医薬品検査所）

〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1

☎042-321-1841 FAX 042-321-1769

E-mail: nagaihi@nval.maff.go.jp

表 鶏マイコプラズマ病の診断薬

診断薬の原理	商品名	製造販売業者	主成分	使用目的	承認年月日
平板凝集反応	マイコプラズマ・ガリセプチカム急速凝集反应用菌液 (マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症急速診断用菌液)	日生研(株)	マイコプラズマ・ガリセプチカム S6 株死菌	マイコプラズマ・ガリセプチカムに対する凝集抗体の検出	昭和 43 年 10 月 15 日
平板凝集反応	マイコプラズマ・シノビエ急速凝集反应用菌液 (マイコプラズマ・シノビエ感染症急速診断用菌液)	日生研(株)	マイコプラズマ・ガリセプチカム SG 株死菌	マイコプラズマ・シノビエに対する凝集抗体の検出	昭和 62 年 11 月 16 日

材料として用いる血清法では菌液と血清の各 1 滴 (各約 0.03ml) を反应用ガラス板上で混合し、ガラス板を前後左右に傾けながら反応を観察する。

菌液と血液あるいは血清を混合してから、1 分以内に紫色の凝集顆粒が現れたものを陽性とする。1～2 分に凝集顆粒が現れたものを疑似とし、2 分間観察しても反応が現れないものを陰性とする。

(4) 使用上の注意等

- ア 検査は四季を通じ 20～25℃ のもとで行われるよう留意し、戸外では直射日光下やほこりの多い所は避けること。
- イ 血清を被検材料とする場合は新鮮なものを用い、凍結または長期保存のものは用いないこと。

4 今後の課題

平板凝集反応法の欠点是非特異反応が出現することであり、本診断薬の場合、その原因は各種ワクチンの接種 [3, 4] や各種微生物の感染 [5] とともに、飼料や飼育環境の変化、産卵開始に伴うホルモン分泌の変化等にもよると考えられている。被検血清に異種動物の血清を混合すると非特異反応が除去できることが知られているが [3, 6]、本診断薬を用いる場合には、非特異反応の出現

に影響を及ぼす諸要因について十分に考慮することが必要である。

参考文献

- [1] 農林水産省：監視伝染病の発生状況 (農林水産省 HP: http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansidensen/pdf/h25_ruinenn_todokede.pdf)
- [2] 農林水産省消費・安全局監修：鶏マイコプラズマ病、病性鑑定マニュアル、第 3 版、338-340、全国家畜衛生職員会、東京 (2008)
- [3] 飛鷹茂忠、寺沢元史、中井美穂子、堀田久美、瀬古美代子、山本美幸、田中玲爾、小西喬郎：IBD 不活化ワクチン接種鶏に出現する MG・MS の非特異反応の防止法について、鶏病研究会報、23、31-36 (1987)
- [4] 荻野博明、濱崎尚樹、小林淳彦、梅田雅夫、佐藤将典、星 邦夫、岡沢武夫：ニューカッスル病 (ND) オイルアジュバントワクチン接種鶏群における ND 血球凝集抑制抗体価とマイコプラズマに対する非特異反応、鶏病研究会報、31、167-170 (1995)
- [5] 尾崎裕昭、植松亜紀子：マイコプラズマ病血清検査における非特異反応と対応、平成 17 年度全国家畜保健衛生業績抄録、14、農林水産省消費・安全局動物衛生課、東京 (2006)
- [6] 佐藤藤夫：鶏のマイコプラズマ症—血清学的診断を中心として—、鶏病研究会報、22 増刊号、31-38 (1986)

9 伝 染 性 コ リ ー ザ

永井英貴[†] (農林水産省動物医薬品検査所)

1 伝染性コリーザの概要

伝染性コリーザは鶏の呼吸器病であり、その病原体は *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* である。本菌は、抗血清を用いた平板凝集反応により、A、B 及び C の 3 型に分類される。

わが国においては、1960 年代に A 型菌による発生が、1970 年代に C 型菌による発生が多発したが、本病に対してはワクチンが極めて有効であるため、ワクチンが普及した現在、発生は非常にまれである。

本病は、病鶏または保菌鶏から排出された病原菌を

含む鼻汁や涙で汚染された飲水・飼料を介して、または直接接触により急速に伝播する。中雛や産卵開始直前の鶏に発生が多く、若齢鶏は比較的抵抗性である。発病率は高いが、致死率は通常低く、マイコプラズマ等の混合感染で重篤化する。

本病は急性経過をたどり、発病鶏は呼吸器症状を呈し、水溶性から粘液性の鼻汁の漏出、顔面の浮腫性腫脹、流涙、下痢または緑便、異常呼吸音等がみられる。成長を阻害し、産卵鶏では産卵率が低下し、若しくは産卵を停止するが、症状の改善に伴って産卵率は回復する。

表 伝染性コリーザの診断薬

診断薬の原理	商品名	製造販売業者	主成分	使用目的	承認年月日
赤血球凝集抑制試験	コリーザ A 型 HA 抗原「NP」 (鶏伝染性コリーザ (A 型) 診断用赤血球凝集抗原)	(株)科学飼料研究所	ヘモフィルス・パラガリ ナルム A 型菌 No. 221 株	ヘモフィルス・パラガリ ナルム A 型菌に対する赤血 球凝集抑制抗体の検出	昭和 61 年 10 月 16 日
赤血球凝集抑制試験	コリーザ C 型 HA 抗原「NP」	(株)科学飼料研究所	ヘモフィルス・パラガリ ナルム C 型菌 S1 株	ヘモフィルス・パラガリ ナルム C 型菌に対する赤血 球凝集抑制抗体の検出	平成 4 年 3 月 12 日

2 診断方法

伝染性コリーザは上記の特徴的な臨床症状を呈するため、疫学調査及び臨床検査だけでも簡易診断が可能である。確定診断は細菌検査（分離培養）により行う [1]。

分離培養の接種材料は、発病 3 日以内の急性期の鶏から滅菌綿棒で採材した鼻汁、眼窩下洞内の滲出液等である。血液寒天に塗抹し、同一寒天に NAD 産生性を確認したブドウ球菌も塗抹して、37℃、5%炭酸ガス下で 24～48 時間培養すると、原因菌は非溶血性の露滴状のコロニーを形成し、衛星現象を示す。

なお、抗体の出現時期は感染 2～3 週以降であるため、急性経過をたどる本病の診断に血清診断を応用することはできない。しかし、本菌の赤血球凝集 (HA) 抗原は感染防御に関与し、赤血球凝集抑制 (HI) 抗体価と防御能の相関性が高いことから、市販の HA 抗原がワクチン接種後の免疫応答を判断する目的で用いられている。次項で当該 HA 抗原について説明する。

3 診断薬の概要

A 型 HA 抗原及び C 型 HA 抗原が、それぞれ 1 品目ずつ流通している。

(1) 反応原理

HI 試験による HI 抗体の検出である。

(2) 製法の概要

ア A 型 HA 抗原

ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 No. 221 株の濃厚菌液をチメロサルで不活化して製造する。

イ C 型 HA 抗原

ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌 S1 株の濃厚菌液をチメロサルで不活化して製造する。

(3) 使用方法の概要

ア A 型 HA 抗原

(ア) 抗原価の測定

抗原を生理食塩液で 10 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈して、希釈抗原 0.4ml ずつに等量の 0.5vol% 鶏赤血球浮遊液を加えて振とう混合し、60 分間静置後判定する。赤血球が完全凝集を示した最高希釈倍数の抗原濃度を 1 単位とし、0.4ml 中に 4 単位となるように抗原液を調整する。

(イ) 抗体価の測定

被検血清を生理食塩液で 5 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.2ml ずつに等量の抗原液を加えて混合し、10 分間処理した後、0.5vol% 鶏赤血球浮遊液を 0.4ml ずつ加えて振とう混合し、60 分間静置後判定する。赤血球凝集が完全に抑制された最高希釈倍数を被検血清の HI 抗体価とし、抗体価 5 倍以上を陽性とする。

イ C 型 HA 抗原

(ア) 抗原価の測定

抗原を生理食塩液で 5 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈して、V 型マイクロプレートを用い希釈抗原 50 μ l ずつに等量の 1vol% ホルマリン固定鶏赤血球浮遊液を加えて振とう混合し、室温に 45 分間静置後判定する。赤血球が完全凝集を示した最高希釈倍数の抗原濃度を 1 単位とし、50 μ l 中に 4 単位となるように抗原液を調整する。

(イ) 被検血清の前処置 (自然凝集素の除去)

被検血清は、あらかじめ 10vol% ホルマリン固定鶏赤血球浮遊液で 5 倍に希釈し十分振とう混合後、ときどき振とう混合しながら 37±1℃ に 1 時間、または 4℃ に一夜静置した後遠心し、その上清を 5 倍希釈被検血清として用いる。

(ウ) 抗体価の測定

5 倍希釈被検血清を V 型マイクロプレートを用い生理食塩液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 25 μ l ずつに等量の抗原液を加えて振とう混合し、10 分間静置後、1vol% ホルマリン固定鶏赤血球浮遊液を 50 μ l ずつ加えて振とう混合し、室温に 45 分間静置後判定する。赤血球凝集が完全に抑制された最高希釈倍数を被検血清の HI 抗体価とし、抗体価 5 倍以上を陽性とする。

(4) 使用上の注意等

両抗原とも抗原価は使用の都度測定すること。

参考文献

- [1] 農林水産省消費・安全局監修：伝染性コリーザ，病性鑑定マニュアル第 3 版，354-356，全国家畜衛生職員会，東京 (2008)