

16 肉用鶏から分離された *Mycoplasma gallisepticum* の薬剤感受性及び疫学解析

中央家畜保健衛生所
 浦川 了
 県北家畜保健衛生所
 鈴木史子

鶏マイコプラズマ症は、*Mycoplasma gallisepticum*(MG)、*M. synoviae*(MS)によって引き起こされる慢性呼吸器病で、単独感染では無症状で経過するが、細菌やウイルスとの複合感染や飼養環境の悪化により発症する¹⁾。

ブロイラーでは発育不良や気嚢炎によると体の廃棄率の増加により経済被害を与える。

今回、肉用鶏農場において、MG びよる本症の発生が確認され、病性鑑定、薬剤感受性試験及び分子疫学解析を実施したのでその概要を報告する。

1 農場概要

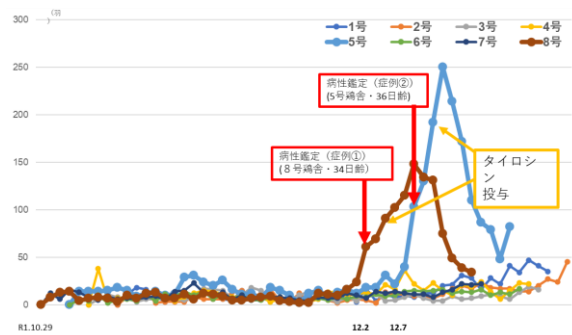
発生農場は肉用鶏 165,000 羽飼養で鶏舎数は 8 棟、ワクチンは 0 日齢でマレック病 (MD)、伝染性気管支炎 (IB)、鶏痘 (FP)、12 日及び 20 日齢でニューカッスル病 (ND)、伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) を接種していた。

2 発生状況

令和元年 12 月 2 日に 8 号鶏舎においてゴロゴロといった呼吸器音を呈する個体が増加し、死亡及び淘汰羽数が増加したため、病性鑑定を実施した (症例 1)。

さらに、12 月 7 日に 5 号鶏舎で同様の症状を呈し、死亡及び淘汰羽数が増加したため病性鑑定を実施した (症例 2)。

なお、両症例とも病性鑑定を実施した 2 日後から MG 対策としてタイロシンを投与した (図 1)。



図一1 死亡・淘汰羽数推移

3 病性鑑定

(1) 外貌及び剖検所見

症例 1 では眼瞼周囲の腫脹、鼻汁漏出、流涙、気管粘液の増量が共通して認められ、症例 2 では気管粘膜の充血、粘液増量のほか 8 羽中 2 羽で肝被膜及び心外膜の混濁が認められた (表 1)。

表一1 外貌及び剖検所見

○症例① (供試鶏：生鶏3羽)

眼瞼周囲の腫脹	鼻汁漏出	流涙	気管粘液増量
3/3	3/3	3/3	3/3

○症例② (供試鶏：生鶏5羽、死亡鶏3羽)

気管粘膜充血、粘液増量	肝被膜の混濁	心外膜の混濁
8/8	2/8	2/8



(2) 病理組織学的検査

10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィン包埋切片を作成し、HE 染色、グラム染色、MG 及び IB の免疫染色を実施した。

症例 1、2 ともに気管や肺、鼻腔、眼窩洞、眼球では粘膜または粘膜固有層におけるリンパ球浸潤、リンパ濾胞の形成等鶏マイコプラズマ

病に特徴的な所見がみられた。

また、症例2では鶏マイコプラズマ病に特徴的な所見に加え肝臓、心臓の被膜または外膜に線維素析出といった鶏大腸菌症で見られる所見も認められた(表-2)。

表-2 病理組織学的検査

	所見	症例①			症例②		
		①	②	③	①	②	③
気管	粘膜固有層にリンパ球・形質細胞浸潤、リンパ濾胞形成	●	●	●	●	●	●
	粘膜上皮細胞の増生、線毛細胞の消失、粘液腺の過形成	●	●	●	●	●	●
肺	腔内に偽好酸球浸潤、粘液浸出	●	●	●	●	●	●
	気管支粘膜にリンパ球・形質細胞浸潤、リンパ濾胞形成	●	●	●	●	●	●
鼻腔 眼窩洞	気管にリンパ球・形質細胞浸潤、肥厚	●	●	●	●	●	●
	粘膜固有層にリンパ球・形質細胞浸潤、リンパ濾胞形成	●	●	●	NT	NT	NT
	粘膜上皮細胞の増生、線毛細胞の消失、粘液腺の過形成	●	●	●	NT	NT	NT
眼球	腔内に偽好酸球浸潤、粘液浸出	●	●	●	NT	NT	NT
	眼輪結核・結膜にリンパ球浸潤、リンパ濾胞形成	●	●	●	NT	NT	NT
肝臓	被膜に偽好酸球・線維素析出					●	
	線原に線維素血症						●
心臓	外膜に偽好酸球浸潤				●	●	
	外膜に線維素析出				●	●	

免疫染色ではMGは気管、鼻腔、眼窩洞、眼球において抗原分布は中程度から多数がほとんどであり、IBはほとんどが抗原分布はなしまたはごく少数で、今回の病変へ関与した可能性は低いと思われた(表-3)(図-2)。

表-3 免疫染色

免疫染色		症例①			症例②		
		①	②	③	①	②	③
気管上部	MG	+++	+++	NT	NT	NT	+++
	IB	±	-	NT	NT	NT	-
気管中部	MG	+++	+++	NT	+++	+++	NT
	IB	±	-	NT	±	±	NT
気管下部	MG	++	+++	+++	+++	+	NT
	IB	-	-	-	±	±	NT
肺	MG	-	-	-	-	-	-
	IB	-	-	-	-	-	-
鼻腔 眼窩洞	MG	+++	+++	+++	NT	NT	NT
	IB	-	±	-	NT	NT	NT
眼球	MG	+~++	+	++	NT	NT	NT
	IB	±	+	±	NT	NT	NT

NT: 検査未実施
-: 陽性反応なし、±: 極少数、+: 軽度、++: 中等度、+++ : 多数

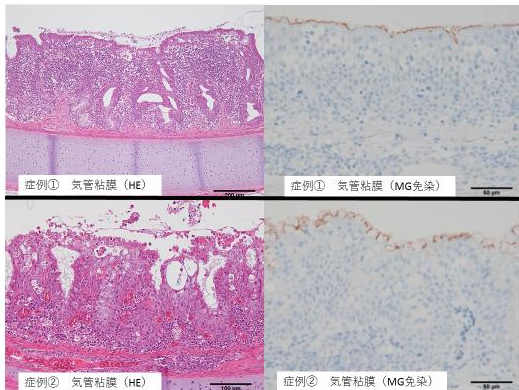


図-2 免疫染色

(3) 細菌学的検査

細菌分離検査は主要臓器、気管、血清等を材

料とし、症例1、2ともに3羽用い、DHL及び5%馬血液寒天培地を用いたろそうそく培養にて実施した。

マイコプラズマ検査は、症例1は5羽、症例2は5又は7羽用い、MG及びMS急速反作用菌液(日生研)を用いた抗体検査、Freyの培地を用いた分離培養、Kissら²⁾のプライマーを用いたPCRによる同定を実施した。

細菌分離検査では、症例1は全羽陰性、症例2では3羽中2羽の主要臓器から大腸菌が分離された。

抗体検査では症例1、2ともに5羽中5羽からMGの抗体が検出された。

マイコプラズマ分離培養検査では症例1が5羽中5羽、症例2が7羽中5羽からMGが分離された。

薬剤感受性試験はMGについて今回の分離株2株、福岡県及び埼玉県分離株を用いて微量液体希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

大腸菌については心臓由来1株を用いて1濃度ディスク法により実施した。

MGについてはタイロシン(TS)、カナマイシン(KM)、オキシテトラサイクリン(OTC)が内田らの既報³⁾と比較して低いMICであり、エンロフロキサシン(ERFX)については既報にて実施されていなかったが、今回の結果はかなり低い値であった。大腸菌についてはストレプトマイシン、KMのみ中間で他は感性であった(表-4)。

表-4 薬剤感受性成績

MG薬剤感受性成績		報告 内田ら(1986)	
薬剤	MIC	薬剤	MIC
TS	<0.06	TS	MIC50: 0.1, MIC90: 1.56
KM	8~64	KM	>100
LCM	0.25~1	LCM	MIC50: 0.1, MIC90: 1.56
OTC	<0.06~0.13	OTC	MIC50: 0.78, MIC90: 1.56
TP	4	TP	NT
FF	1~4	FF	NT
ERFX	<0.06	ERFX	NT

供試株: 112株

大腸菌薬剤感受性成績											
薬剤	ABPC	AMPC	SM	KM	OTC	DOX	NFLX	ERFX	OFLX	ST	TP
判定	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S

(4) ウイルス学的検査

症例1、2ともに3羽を用いてNDV、IBV、AMPV、

ILTV の遺伝子検査または分離検査を実施し、症例 1 のみ IBV が PCR 陽性、分離陰性であった。

なお、鳥インフルエンザ簡易キットは陰性であった。

4 分子疫学解析

MG について野外株 7 株、標準株、MG ワクチン株 4 株、MS ワクチン株を用いて分子疫学解析を実施した。

方法は PFGE⁴⁾、MLST⁵⁾ により実施した。

PFGE の結果、長崎株は症例 1、2 で同じパルスパターンであった。

埼玉株は k5831b-19 ワクチン株と同じパルスパターンであり、これらと長崎株は類似のパルスパターンを示した。

福岡株は g210 ワクチン株に類似したパルスパターンであり、岐阜、徳島、広島株は同じパルスパターンであった (図-3)。

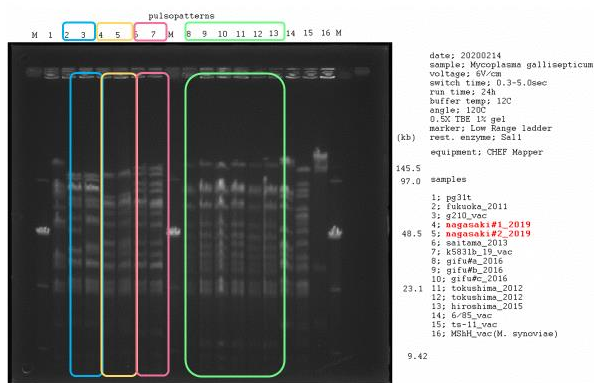


図-3 PFGE結果

MLST の結果、長崎株は同じシークエンスタイプ (ST) であり、パルスパターンも同じであったことから同一クローン由来であることが示唆された。

埼玉株と k5831b-19 ワクチン株は同じ ST で、これらは長崎株と 2 アレルのみの相違であり、パルスパターンも同じまたは類似していたことから、これらは同一クローンまたは近縁な株であることが示唆された。

福岡株と g210 ワクチン株は 2 アレルの相違であり、パルスパターンも類似していたことから同一クローンまたは近縁な株であることが示唆された。

岐阜、徳島、広島株は同一 ST でパルスパターンも同じであったことから、これらは同一クロー

ンであることが示唆された (表-5)。

表-5 MLST結果

株	ugpA	atpG	DUF3196	mraW	plsC	dppC	lgT	ST
pg31t	1	2	2	1	10	25	26	ST23
福岡	6	1	2	1	10	24	31	ST58
G210_vac	1	1	2	1	10	25	31	ST59
長崎症例①	1	5	5	12	13	26	30	ST60
長崎症例②	1	5	5	11	13	26	32	ST57
埼玉	1	5	5	11	13	26	32	ST57
K5831b-19_vac	1	5	5	11	13	26	32	ST57
岐阜	22	2	4	21	20	3	30	ST56
徳島	22	2	4	21	20	3	30	ST56
広島	22	2	4	21	20	3	30	ST56
6/85_vac	9	8	10	12	14	6	19	ST10
ts-11_vac	6	4	2	3	17	24	1	ST19

ST : Sequence type

得られた MLST 解析結果をもとに、系統樹解析を実施したところ、各ワクチン株と同一クローンまたは近縁と思われる野外株が複数確認された (図-4)。

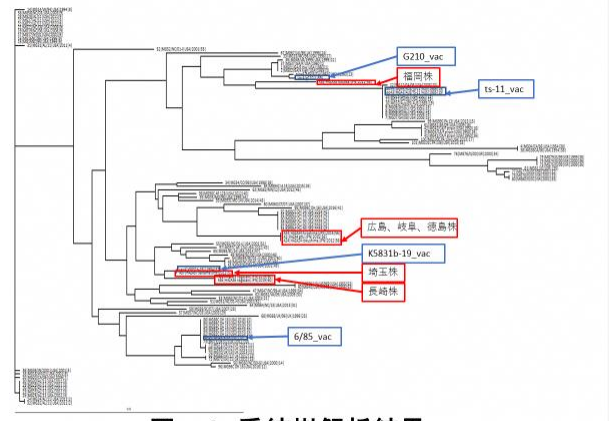
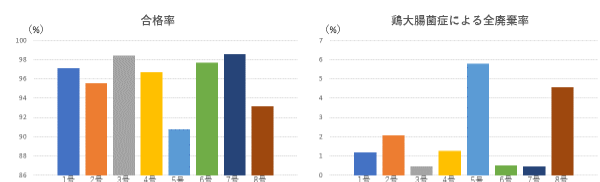


図-4 系統樹解析結果

5 食鳥処理場における出荷成績

合格率は 5 号鶏舎と 8 号鶏舎が他の鶏舎より大幅に下回り、鶏大腸菌症による全廃棄率は 5 号鶏舎と 8 号鶏舎が他の鶏舎を大きく上回った。

今回の発生による粗損失額は 5 号鶏舎で約 200 万円、8 号鶏舎で約 150 万円、合計で約 340 万円であった (図-5)。



5 号鶏舎及び 8 号鶏舎の粗損失額 (1羽あたり 600 円で計算)
(入雛羽数 - 出荷羽数 + 全廃棄羽数) × 600

5 号鶏舎: (20620 - 18425 + 1086) × 600 = 1,968,600円
8 号鶏舎: (20700 - 19164 + 889) × 600 = 1,455,000円
合計: 3,423,600円

図-5 食鳥処理場成績

6 まとめ及び考察

症例1では眼や鼻腔、気管といった上部気道に限局した病変であり、IBの関与は無いと思われる、MGの単独による発症と考えられた。

薬剤感受性試験の結果、今回分離されたMGはTS、KM、OTC、ERFXが有効であると思われた。

また、病性鑑定時にはあまり確認されなかった鶏大腸菌症が食鳥処理時には増加していたことから、MGが鶏大腸菌症の誘発要因となったと推察された。

このことから、TSはMGの予防的投薬には有効であるが、発症後はすでに大腸菌が混合感染している可能性が高いため、大腸菌にも効果があるOTC、ERFXが効果的であると思われた。

分子疫学解析の結果、症例1、2は同じ種鶏場からの導入であり、同一クローン由来であったことから、今回の株が偶然農場に侵入し、人為的に2つの鶏舎のみに侵入した可能性、または種鶏場からの持ち込みの可能性が考えられた。

埼玉株はk5831b-19ワクチン株と同一クローンであり、長崎株はこれらと同一クローンまたは近縁な株と思われました。福岡株はg210ワクチン株と同一クローンまたは近縁な株と思われた。

系統樹解析の結果、ワクチン株と近縁と思われる野外株が複数存在することから、ワクチン株と近縁な野外株の存在またはワクチン株の病原性復帰の可能性も示唆されたので、その関連性についてはさらなる検討が必要と思われた。

7 参考文献

- 1) 今井由美子：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) Kiss *et al*: Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Vet Microbiol*, 58, 23-30 (1997)
- 3) 内田ら：コマーシャルのブロイラー及び採

卵鶏由来 *Mycoplasma gallisepticum* 及び *Mycoplasma synoviae* 株の各種薬剤に対する感受性, 日獣会誌, 39, 644-647 (1986)

4) Hata *et al*: Molecular epidemiology of cases of *Mycoplasma californicum* infection in Japan, *Appl. Environ. Microbiol*, 80 (24), 7717-7724 (2014)

5) Mostafa *et al*: Development of a multilocus sequence typing assay for *Mycoplasma gallisepticum*, *Avian Disease*, 63, 693-702 (2019)