

16 大腸菌が関与した肉用鶏における *Mycoplasma gallisepticum* 感染事例

熊谷家畜保健衛生所

○田嶋 径佳・宮本 賢一・山田 均

中央家畜保健衛生所

荒井 理恵・平野 晃司

I はじめに

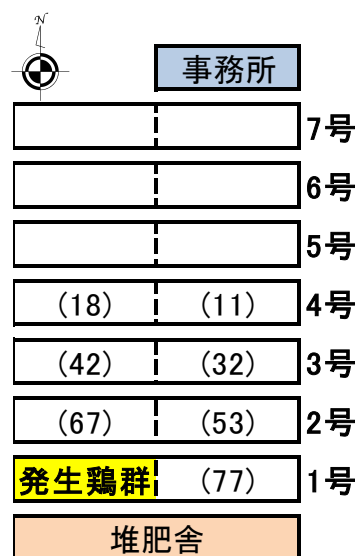
鶏マイコプラズマ病は、*Mycoplasma gallisepticum* (MG)、*Mycoplasma synoviae* (MS) の感染によって引き起こされる比較的伝染性の強い慢性呼吸器病であり、日本では、鶏及び七面鳥の MG、MS 感染症を家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定している。一般に、MG あるいは MS による単独感染鶏は、不顕性に経過するが、他の細菌あるいはウイルスとの複合感染ならびに飼育環境条件の悪化などが誘因となって発症し、異常呼吸音、咳、鼻汁漏出、眼窩下洞炎および重度の気嚢炎を伴う慢性呼吸器障害を呈する¹⁾。

今回、管内の肉用鶏農場で、異常呼吸音を呈し死亡鶏が増加した事例を、大腸菌が関与した MG 感染症と診断したので、その概要を報告する。

II 発生概要

1 農場の概要

当該農場は平飼いの開放鶏舎が7鶏舎あり、各鶏舎内は東西で大きく2区画に仕切られており、1ロット約2,000~2,400羽ずつ、合計8ロット約16,000羽の肉用鶏が飼育されていた。各区画に初生雛を導入し、約90日飼育して出荷、オールアウト後は、敷料を鶏舎内で堆肥化し次の飼育時に敷料として利用していた。ワクチンは初生で鶏痘、マレック病、鶏伝染性気管支炎 (IB)、30日齢でニューカッスル病 (ND) が接種されていた。



※()内は日齢

図1 鶏舎配置図

2 発生概要

1号鶏舎の西側1区画において、95日齢の一鶏群に2012年12月下旬から呼吸器症状が認められた。通常、各区画の1週間の死亡羽数は約10羽であるが、このころから徐々に増え始め、翌年1月に入って1週間の死亡羽数が65羽となり、1月7日に家畜保健衛生所に通報があり、病性鑑定を実施した。同日立ち入り時の症状は、ゴロゴロという異常呼吸音、発咳、うずくまりが認められた。また、1号鶏舎の東側1区画においても軽度の異常呼吸音が認められたが

死亡羽数の増加は認められなかった。なお、隣接する他の鶏舎では、呼吸器症状や死亡羽数増加などの異常は認められなかった。

Ⅲ 材料及び方法

病性鑑定の材料としては、1号鶏舎の西側1区画の発症鶏3羽、死亡鶏1羽を供した。

1 病理学的検査

病理解剖の後、主要臓器等を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従いパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。また、気囊については、グラム染色を行った。

2 細菌学的検査

一般細菌は、病鶏4羽の肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳、心囊水、気囊拭いおよび直腸内容を5%羊血液加寒天培地(CO₂培養、48時間)およびDHL寒天培地(好気培養、24時間)に直接塗抹し、分離培養した。分離大腸菌については一次性状を確認後、簡易同定キット(アピ20E;日本ビオメリュー)により同定した。さらに、大腸菌株の薬剤感受性試験を一濃度ディスク拡散法で実施した。

マイコプラズマは、病鶏4羽の気管スワブ、肺乳剤および気囊拭いを材料に、Freyの培地を用い、常法に従い分離培養した²⁾。また、分離に用いたのと同じ材料からインスタジーンマトリックス(BIO-RAD社)によりDNAを抽出し、MG及びMS特異的PCR法を行った³⁾⁴⁾。

3 ウイルス学的検査

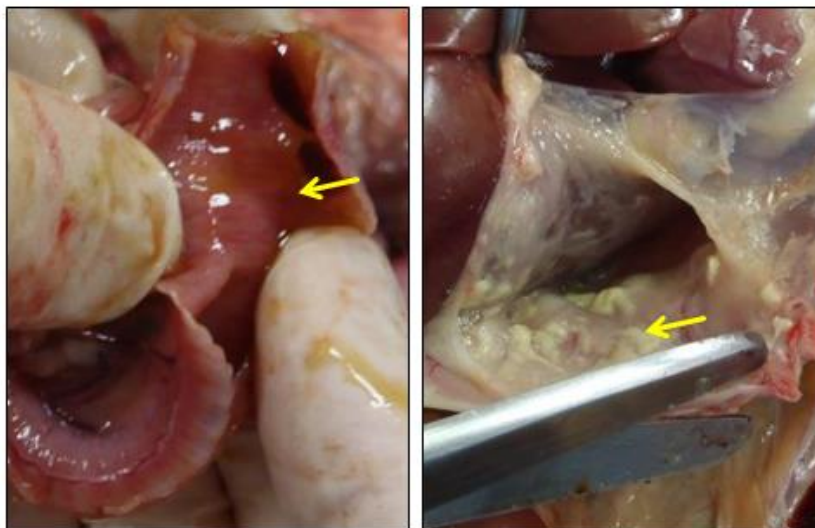
農場立ち入り時に、発症鶏3羽、死亡鶏3羽の気管スワブを材料とし、鳥インフルエンザウイルス(AIV)迅速診断キット(エスプラインAインフルエンザ;富士レビオ株式会社)を実施した。ウイルス分離は病鶏4羽の気管、直腸、肺の10%乳剤を作製し、9~11日齢の発育鶏卵尿膜腔内に接種し2代培養(5~7日間)した。なお、気管、直腸については2代5日間培養後、赤血球凝集試験(HA試験)を実施した。さらに気管、肺については漿尿膜上接種を実施し、5日間培養後、ポック形成の有無を確認した。また、発症鶏3羽の気管スワブと直腸スワブを材料として、AIV、ニューカッスル病ウイルス(NDV)特異的RT-PCR検査⁵⁾⁶⁾を、発症鶏3羽と死亡鶏1羽の気管スワブ、肺、腎臓を材料として、IBウイルス(IBV)特異的RT-PCR検査⁷⁾を実施した。

Ⅳ 成績

1 病理学的検査成績

(1) 剖検所見

気管内に血液または粘液の貯留が2羽で認められ、そのうち1羽に肺表面の白濁と一部黄白色化、気囊の肥厚と中にチーズ様物の貯留が認められた。心囊水の貯留が3羽に認められ、そのうち1羽は心外膜全体に白色の付着物が認められた(図2)。



気管:粘液の貯留

気嚢:肥厚及びチーズ様物の貯留

図2 剖検所見

(2) 病理組織学的所見

化膿性気管支炎と化膿性気嚢炎が主な病変であった。気管では、リンパ濾胞過形成とリンパ球浸潤により粘膜固有層が肥厚し、偽好酸球の浸潤や杯細胞の活性化もみられた(図3)。肺では、1次気管支は、粘膜固有層にリンパ濾胞過形成により気管支腔内の狭小化が認められた。2次、3次気管支腔内は、偽好酸球の浸潤や細胞退廃物が貯留し、重度病変部では肺の固有構造が消失していた(図4)。気嚢では、線維芽細胞の増生による気嚢壁の顕著な肥厚と、気嚢内に偽好酸球の高度な浸潤と細胞退廃物の貯留が認められ、軽度から中程度、グラム陰性の桿菌を伴っていた(図5)。また、偽好酸球とリンパ球が軽度に浸潤し化膿性心外膜炎が認められた。



図3 気管 (HE 染色) : リンパ濾胞過形成とリンパ球浸潤による気管粘膜の肥厚

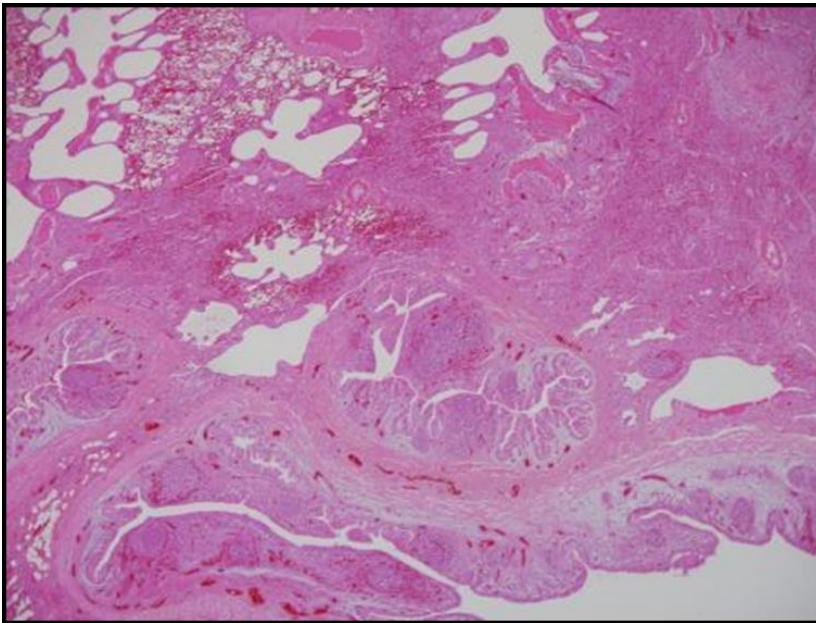


図4 肺 (HE 染色) : 1次気管支腔は、粘膜固有層のリンパ濾胞過形成による狭小化、偽好酸球浸潤と細胞退廃物の貯留により肺の固有構造が消失

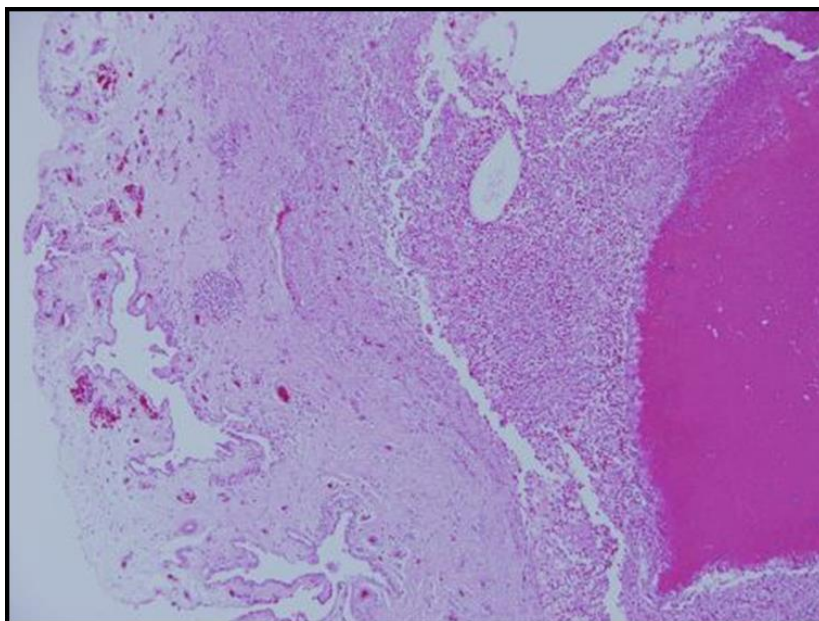


図 5 気嚢 (HE 染色) : 線維芽細胞増生による気嚢壁の顕著な肥厚と気嚢内の偽好酸球の高度な浸潤

2 細菌学的検査成績

ほとんどの主要臓器、心嚢水および気嚢拭いから大腸菌が分離された(表 1)。分離大腸菌株の薬剤感受性パターンは全ての供試株で同一であり、供試した 11 薬剤中ペニシリン系およびテトラサイクリン系の 4 薬剤に耐性が認められた(表 2)。マイコプラズマ PCR 検査では、発症鶏①の気管スワブと、発症鶏③の気管スワブ、肺乳剤、気嚢拭いから MG 特異遺伝子が検出された。分離培養では、全ての発症鶏の気管スワブ等から、中等量から多量に MG が分離された(表 3)。

表 1 細菌分離成績

由来	培地条件	肝脾腎	心臓	肺	脳	心嚢水	気嚢拭い	直腸内容
発症鶏①	BA(CO ₂)	++	-	NT	-	-	NT	NT
	DHL	++	-	NT	-	-	NT	+++
発症鶏②	BA(CO ₂)	++	++	+++	-	+++	NT	NT
	DHL	++	++	+++	-	+++	NT	+++
発症鶏③	BA(CO ₂)	-	-	++	-	-	+	NT
	DHL	-	-	++	-	-	++	+++
死亡鶏④	BA(CO ₂)	+++	+++	+++	+++	NT	NT	NT
	DHL	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++

+++:多量 ++:中等量 +:少量 -:陰性 NT:未実施
 ※分離された菌は全て大腸菌

表2 薬剤感受性試験成績

由来	ABPC	AMPC	CEZ	KM	OTC	DOXY	GL	SMX-TMP	OFLX	NFLX	ERFX
発症鶏① 肝	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
発症鶏② 肺	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
発症鶏③ 肺	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
死亡鶏④ 肝	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S

S:感性 R:耐性 ※菌種は大腸菌

表3 マイコプラズマ検査成績

由来	材料	PCR		分離培養	
		MG	MS	直接塗抹	増菌培養
発症鶏①	気管スワブ	+	-	++	+
発症鶏②	気管スワブ	-	-	++	+
発症鶏③	気管スワブ	+	-	+++	+
	肺乳剤	+	-	+++	+
死亡鶏④	気管スワブ	-	-	-	-
	気嚢拭い	+	-	+++	+

+++:多量 ++:中等量 +:少量(PCR法は陽性) -:陰性
 直接塗抹:Freyの寒天培地(CO₂)
 増菌培養:Freyの液体培地(好気)→Freyの寒天培地(CO₂)
 ※分離培養された菌は全てMG

3 ウイルス学的検査成績

AIV 迅速診断キットは陰性であった。ウイルスは分離されず、RT-PCR 検査において、AIV、NDV 及び IBV に特異的な遺伝子は検出されなかった。

V まとめおよび考察

今回、検査に供した発症鶏全ての気管スワブから MG が中等量から多量に分離され、気管スワブと気嚢拭い等から MG 特異遺伝子が検出された。

一般に、MG や MS は単独感染しても健康な鶏では臨床症状を示さず発病しないが、他の微生物との複合感染や飼育環境の悪化などのストレスによって臨床症状を示し、病勢が悪化することが知られている。まれだが、MG 単独発症が死亡の原因となった可能性が示唆される報告⁸⁾もあり、複合感染としては、野外では *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum*⁹⁾ や大腸菌の感染¹⁰⁾、強毒な伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの感染¹¹⁾

による免疫抑制に起因する場合、生ワクチンウイルス (ND と IB¹²⁾) やアンモニアによる粘膜の損傷¹³⁾に起因する場合が知られている。

今回はさらに、主要臓器から大腸菌が分離され、病理組織学的にも化膿性気嚢炎や化膿性心外膜炎が認められたため、発症要因に少なからず大腸菌が関与していると考えられた。鶏に病気を起こす大腸菌は鶏病原性大腸菌 (APEC) と呼ばれ、上皮細胞付着性、血清抵抗性、鉄捕捉因子、血清抵抗性因子、毒素など多くの病原因子を保有する株が多い¹⁴⁾。今回分離株の病原性を正確に評価するためには、これら病原因子の検索が必要であると考えられる。

環境要因では、呼吸器症状が認められた 12 月下旬ころから農場周辺の外気の最低気温は氷点下を示す日が続いており、寒さによるストレスが考えられた。また寒さ対策でカーテンを締め切っており、発生時鶏舎内は、敷料に使用している戻し堆肥の塵埃が舞い上がるような乾燥した状態で、かつ軽度にアンモニア臭を感じたことから、鶏舎内飼育環境の悪化が考えられた。また当該農場では通常鶏舎内はオールアウト後水洗のみで消毒はしておらず、不適切な飼養管理も考えられた。

以上の結果から、今回、呼吸器症状を示し死亡羽数が増加した要因としては飼育環境の悪化により MG の病勢が悪化し、さらに常在する大腸菌が混合感染し重篤化したと考えられた。また、当該農場は、抗生物質や合成抗菌剤を基本的に使用しない飼養形態であり、ワクチンも最低限しか接種しないため、MG ワクチンが未接種であったことも発症要因の一つとして考えられた。

鶏マイコプラズマ病の感染予防対策としては、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り、さらに、その他の感染症や環境要因の悪化による重篤化を防止する必要がある。そのためには、呼吸器病予防を目的とした適切なワクチンプログラムや、適切な鶏舎内環境を維持するように指導することが重要である。

当該農場に対してはその後の対策として、鶏舎の水洗後の消毒実施を指導し、また、通常の衛生管理として、若齢鶏から管理するといった鶏舎内管理の順番の変更や、各鶏舎における手指や長靴消毒の徹底などを指導したところ、当該鶏舎のみの発生で終息し、その後発生はみられてない。

VI 引用文献

- 1) 佐藤静夫, 片山宜朗: 鶏のマイコプラズマ病の現状と防疫. 鶏病研報 48 巻 2 号, 63-84 (2012)
- 2) 全国家畜衛生職員会, 病性鑑定マニュアル, 第 3 版, 338-340 (2008)
- 3) Kiss, I. et al.: Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay, Vet. Microbiol., 58, 23-30 (1997)

- 4) Lauerma, L. H. et al. : Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*, *Avian Dis.*, 37, 829-834 (1993)
- 5) Lee, M. S., P. C. Chang, J. H. Shien, M. C. Cheng, and H. K. Shieh. : Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR, *J Virol Methods*. 2001 ; 97(1-2) : 13-22.
- 6) Mase M, Inoue T, Imada T. Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2001 to 2007 in Japan. *J Vet Med Sci.* ; 71 : 1101-1104. (2009)
- 7) 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)
- 8) 小高真紀子, 深水大, 石田剛, 小河大輔, 横山敦史, 芝原友幸 : 肉用鶏における *Mycoplasma gallisepticum* の野外感染例, *日獣会誌*, 66, 474-478 (2013)
- 9) 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)
- 10) Ando K : Respiratory mycoplasmosis in chickens [in Japanese], *Natl Inst Anim Hlth Q*, 62, 108-121 (1971)
- 11) Naoya T, Yagihashi T, Tajima M, Nagasawa Y : Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens, *Vet Pathol*, 32, 11-18 (1995)
- 12) 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)
- 13) Sato S, Shaya S, Kobayashi H : Effect of ammonia on *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens, *Natl Inst Anim Hlth Q*, 13, 45-53 (1973)
- 14) 秋庭正人, *医学のあゆみ*, 医歯薬出版株式会社, 235 巻 4 号, 345-350 (2010)