

13 鶏マイコプラズマ病発症鶏2羽の病理学的及び細菌学的比較による供試検体選定への応用

中央家畜保健衛生所

○平野 晃司・中井 悠華・北島 絵理子

I はじめに

鶏マイコプラズマ病は *Mycoplasma gallisepticum* (MG) 及び *M. synoviae* (MS) による慢性呼吸器病である。採卵鶏では産卵低下、肉用鶏では発育不良のほか、気嚢炎により食鳥処理場で廃棄率が増加し、経済的損失を来す。通常は不顕性感染であり、飼育環境の悪化や他の微生物との混合感染により発症し、重篤化する^{1~4)}。

2014年12月、軍鶏を飼育する平飼い農場で呼吸器症状、削瘦及び死亡羽数増加がみられ、当所で行った病性鑑定の結果、鶏マイコプラズマ病と診断した。本事例について、解剖に供した2羽の病理所見の違いと、細菌学的検査及び免疫組織化学的検査の結果を比較し、今後の供試検体を選定する際への応用について考察した。

II 発生概要

1 農場概要

発生農場は肉用に軍鶏を約3,000羽飼育する農場で、従業員は3人である。1か月毎に1ロット約550羽を初生で入雛後、コンパネを利用した箱内で、保温管理の下で育雛し、廃温後は出荷日齢まで、ロット毎に区画された開放鶏舎にて平飼い飼育を行っている。出荷日齢は雄が約150日齢、雌が約240日齢で、ワクチンは孵化場にてMD(0日齢)、農場にてIBD(7日齢)、IB及びND(14日齢)、FP(30日齢)を接種している。

2 発生概要

2014年9月頃より、中雛から成鶏において、1群550羽あたり約100羽に呼吸器症状がみられ、削瘦して死亡する個体が散発した。同年12月、畜主からの依頼により、病性鑑定を実施した。

III 材料及び方法

削瘦の顕著な102日齢の雄2羽(No.1、No.2)を供試した。

1 血液検査

解剖時、血液を採取し、ヘマトクリット(Ht)値及びフィブリノーゲン値を測定した。

2 病理学的検査

剖検し、主要臓器等を採材、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬後、常法により病理切片

を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。特殊染色として、No. 1 と No. 2 の肺、No. 2 の気管、心臓、肝臓、十二指腸及び空腸の標本についてはPTAH染色を実施した。No. 1 と No. 2 の気管、肺、回腸、盲腸及び深胸筋については過ヨウ素酸シッフ (PAS) 反応を実施した。No. 1 と No. 2 の気管、回腸、盲腸及び深胸筋、No. 2 の肺、心臓、肝臓、十二指腸及び空腸についてはグラム染色を実施した。また、No. 1 と No. 2 の気管、肺について抗 MG 家兔血清 (全農)、抗 MS 家兔血清 (動衛研) 及び抗伝染性気管支炎ウイルス (IBV) マウスモノクローナル抗体 (MAb isotype: IgG2a、HyTest 社) を用いて、免疫組織化学的検査を実施した。

3 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺及び脳について、5%羊血液加寒天培地 (CO₂ 培養、48 時間) 及び DHL 寒天培地 (好気培養、24 時間) を用いて、細菌分離を実施した。また、No. 1 及び No. 2 の気管スワブ、No. 2 の気嚢拭い液を材料に、MG 及び MS 特異的 PCR 検査^{5,6)}を行った。さらに、同材料を用いて、直接塗抹と増菌培養によるマイコプラズマ分離検査を行った。

4 ウイルス学的検査

No. 1 と No. 2 の気管スワブ、肺及びクロアカスワブを材料として、発育鶏卵尿膜腔接種法によるウイルス分離を実施した。材料接種から2日、7日後時点で開卵し、尿膜腔液を採取、3代継代した。また、同材料を用いた IBV RT-PCR 検査を実施した⁷⁾。RT-PCR 産物は、*Hae* II、*EcoR* I⁷⁾ 及び *Pst* I (真瀬ら、未公表) を用いた RFLP 解析を実施した。

IV 成績

1 血液検査

各検査数値は以下のとおり (表 1)。No. 2 において、Ht 値が低値、フィ브리ノーゲン値が高値を示した。

表 1 血液検査成績

No.	Ht (%)	フィ브리ノーゲン (mg/dl)
1	29	400
2	26 ↓	800 ↑
正常値 ⁸⁾ 成鶏♂	40.0	

2 病理学的検査

(1) 剖検所見

外貌検査において、2羽ともに元気消失及び消瘦がみられた。

剖検では、No.1に著変は認められなかった。No.2では、肺気嚢、腹気嚢等に肥厚とチーズ様物の付着、心外膜、肝臓の被膜及び十二指腸漿膜にチーズ様物の付着が顕著に認められた(図1)。また、体腔には腹水の貯留が軽度に見られた。

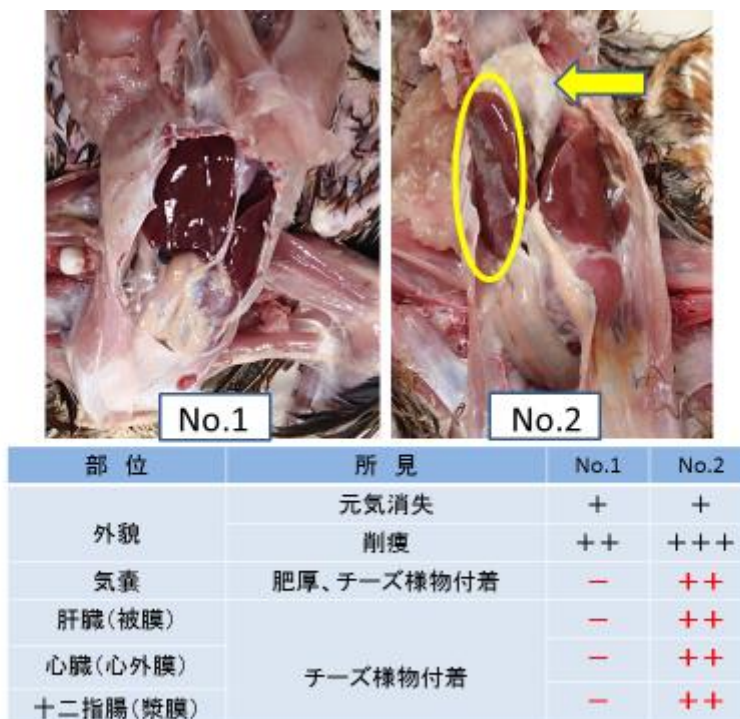


図1 剖検所見

(2) 病理組織学的検査

気管では、2羽に共通して気管粘膜に肥厚がみられ、粘膜上皮細胞の変性、重層化、剥離が認められた(図2、3)。粘膜固有層では、リンパ球、マクロファージの浸潤がみられた。また、気管上皮における線毛の消失は、2羽ともに認められたが、No.1でより重度であった。一方、肺での化膿性肺炎は、No.1で中等度、No.2で重度であり、さらにNo.2では多発性の膿瘍が顕著に認められた(図4)。No.2の肺におけるグラム染色では、一部の膿瘍中心部にグラム陰性桿菌の菌塊を認めた。その他、No.2では、No.1にはない線維素を伴った気嚢炎、化膿性心外膜炎、肝臓における被膜炎、小腸を中心とした消化管における漿膜炎等がみられた。各所に析出した線維素については、PTAH染色にて青染した。また、PAS反応では、肺炎、漿膜炎等の病変部に真菌症を疑う所見は認められなかった。

消化管では、2羽ともに、盲腸の粘膜上皮にコキシジウム、陰窩腔内にトリコモナスの寄生を認めたが、周囲に消化器疾患を疑う病変の形成は認められなかった。その

他、脾臓、腎臓、脳、末梢神経系（翼及び坐骨神経）、深胸筋等に著変は認められなかった。

抗MG家兎血清を用いた免疫組織化学的検査では、No.1の気管及び肺でのみ、気管支粘膜上皮細胞上部において陽性抗原を認めた（図5）。また、抗MS家兎血清を用いた同検査では、2羽の気管及び肺の気管支粘膜上皮細胞上部に陽性抗原を検出したが、その陽性像はNo.1と比較し、No.2では軽度であった。また、抗IBVマウスモノクローナル抗体を用いた同検査では、No.2の肺の二次気管支の粘膜上皮細胞で陽性抗原を検出したが、No.1の気管及び肺、No.2の気管では検出されなかった。



図2 No.1 気管（HE染色、低倍）

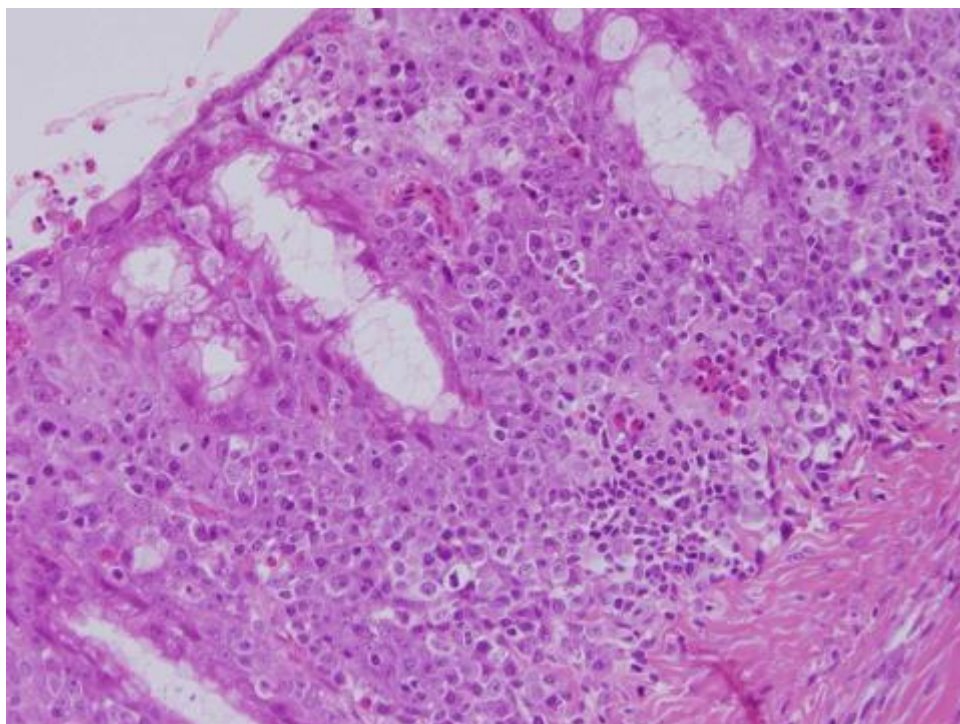


図3 No.1気管(HE染色、高倍)

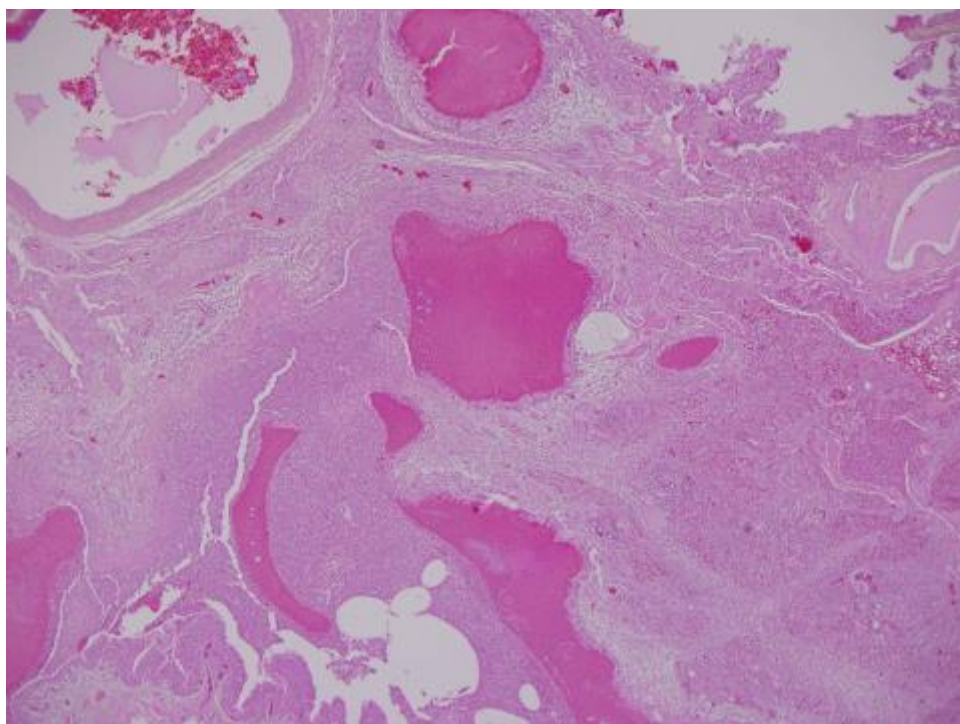


図4 No.2の肺膿瘍(HE染色、低倍)

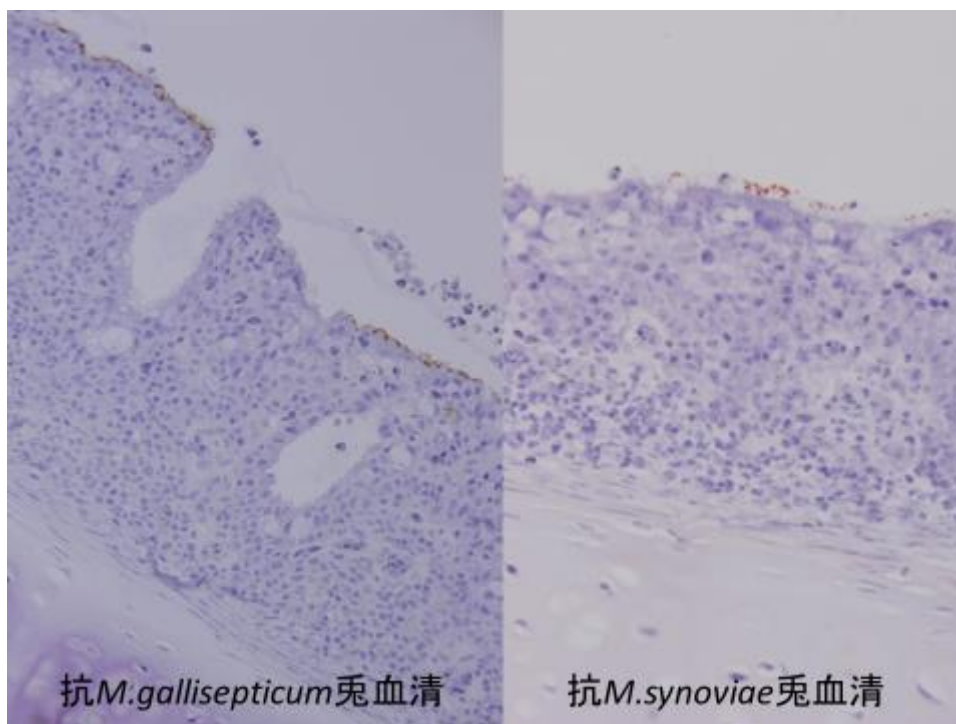


図 5 No. 1 の気管 (免染組織化学的検査)

3 細菌学的検査

細菌分離検査では、有意な菌は分離されなかった。マイコプラズマ PCR 検査では、No. 1 の気管スワブから MG 及び MS 特異遺伝子が検出された。No. 2 では、気管スワブから MS 特異遺伝子のみが検出され、気嚢拭い液は陰性であった。同材料を用いたマイコプラズマ分離培養において、直接塗抹では、全て陰性であり、増菌培養では、No. 1 の気管スワブから MG 及び MS が分離された (表 2)。

表 2 マイコプラズマ検査 (PCR 検査成績及び増菌培養を用いた分離成績)

No.	材料	検査法	<i>M. gallisepticum</i>	<i>M. synoviae</i>
1	気管スワブ	PCR検査	+	+
		直接塗抹	-	-
		増菌培養	+	+
2	気管スワブ	PCR検査	-	+
		直接塗抹	-	-
		増菌培養	-	-
	気嚢拭い液	PCR検査	-	-
		直接塗抹	-	-
		増菌培養	-	-

4 ウイルス学的検査

ウイルス分離検査では、2羽ともにウイルスは分離されなかった。IBV RT-PCR 検査では、No. 1 の肺及びNo. 2 のクロアカスワブから IBV 特異遺伝子が検出された(表 3)。RT-PCR

産物の RFLP 解析で、制限酵素による切断パターンが当該農場で使用している IBV ワクチン株 (ON/74 株) と一致したため、検出した遺伝子はワクチン由来と推定した。

表 3 IBV RT-PCR 検査成績

No.	材料	結果
1	気管スワブ	—
	肺	+
	クロアカスワブ	—
2	気管スワブ	—
	肺	—
	クロアカスワブ	+

V まとめと考察

本症例 2 羽の検査成績の比較について、本病診断の主要な項目である免疫組織化学的検査と細菌学的検査の結果で、より有意な結果を示したのは No.1 であった。一方で、剖検及び病理組織学的検査では、No.1 よりも No.2 にマイコプラズマに特徴的な病変が認められており、病変の進行については、No.2 がより進んでいるものと考えられた(図 6)。また、ほぼ全ての項目で No.2 の組織学的所見が重度な中、気管の線毛の消失の程度は、唯一、No.2の方が軽度であった。しかし、気管の病変の進行だけが、他の臓器とは異なっていたとは考えにくく、同様に No.2 でより進行が早かったと考えると、気管で認めた所見は、一度は粘膜上皮の変性、剥離や線毛の消失を呈した後の、線毛の回復像と考察した。

気管の病態悪化後
⇒線毛の回復像？

検査項目	部位	所見	No.1	No.2
剖検	気囊	肥厚、チーズ様物付着	—	++
	心・肝・十二指腸	チーズ様物付着	—	++
病理組織検査 (一般染色)	気管	線毛の消失	+++	++
	肺	膿瘍	—	+++
		化膿性肺炎	++	+++
	心・肝・十二指腸	被膜炎、漿膜炎	—	++
	気囊	気囊炎	—	++
免疫組織化学的検査	気管・肺	<i>M.gallisepticum</i>	+++	—
		<i>M.synoviae</i>	++	+
PCR検査	気管スワブ	<i>M.gallisepticum</i>	+	—
		<i>M.synoviae</i>	+	+
菌分離	気管スワブ	<i>M.gallisepticum</i>	+	—
		<i>M.synoviae</i>	+	—

図 6 2 羽で差が認められた検査項目

鶏マイコプラズマ病は、農場に入雛後、おもに農場内のマイコプラズマに感染した古いロット鶏やその汚染物を介して不顕性感染し、その後、環境要因等のストレスがかかることにより、発症する²⁾(図7)。病変形成までの過程として、病原体が上部気道に感染し、気管上皮における線毛の運動能の低下または線毛の消失を来す⁴⁾。そして、気管の防御能が低下することにより、易感染状態となる。気管では、粘膜固有層にリンパ球主体の細胞浸潤を伴った肥厚や粘膜上皮細胞の剥離等が起こる^{1,2,3,9)}。また多くは、気管から気管支を経由し、肺に病変が波及し、細菌の混合感染を伴う、化膿性肺炎を形成する。同様に、気管及び肺の病変が気嚢へ波及し、気嚢炎、さらに漿膜炎を形成すると、剖検時、チーズ様物の付着として認められる。図7では、病変形成の流れと2羽の病態ステージの考察を図示した。本症例では、剖検所見及び病理組織学的検査結果から、No.1は気嚢に病変が波及する前の病態ステージであり、No.2はNo.1よりもさらに進行した、気嚢炎及び漿膜炎がみられる段階と考察した。マイコプラズマは気管の粘膜上皮に付着し、粘膜上皮に障害を与える^{1,4,2,3,9)}。上皮細胞の剥離・脱落と同時に、上皮に付着したマイコプラズマ自体も脱落するので、気管や肺における保菌量が減少する⁴⁾。免疫組織学的検査でも、上皮細胞が脱落したところには、抗原が検出されなかった。以上から、病態ステージが進んでいるNo.2よりも病態ステージ初期と考えられるNo.1の方が、免疫組織学的検査及び細菌学的検査において、有意な結果を示したと考察した。

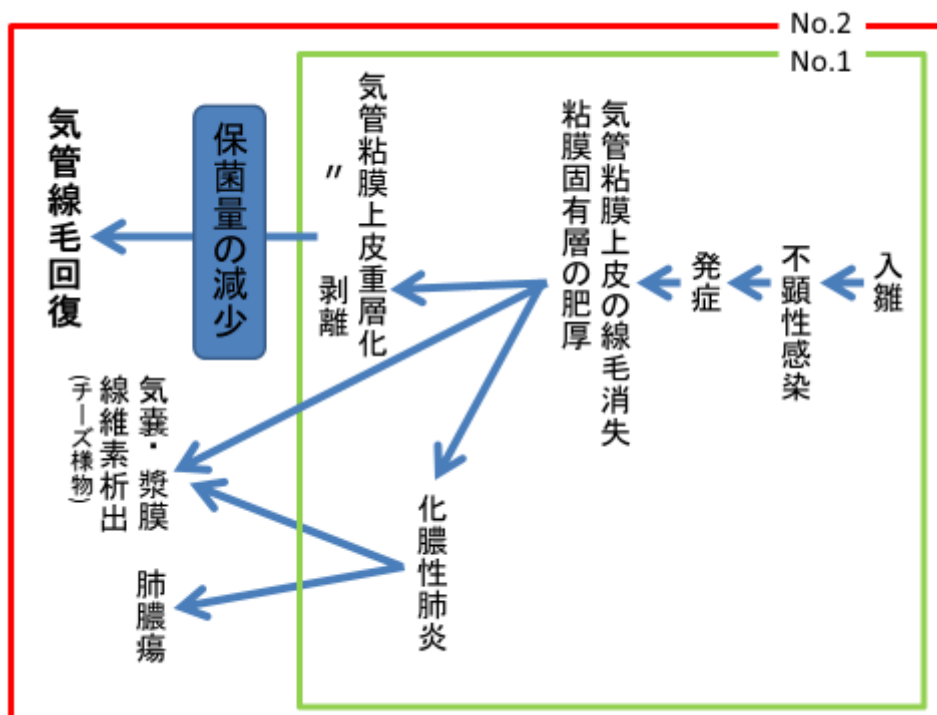


図7 病変形成の流れと2羽の病態ステージの考察

野外の肉用鶏のMG感染症の報告例は少なく、免疫組織学的検査における陽性事例も、採卵鶏¹⁰⁾と比較し、報告はまれである⁴⁾。さらに、小高ら⁴⁾は、本病の確定診断に至らない

事例が多いことについて、他の病原体との混合感染が分離培養を難しくしていることが原因の一つと考察している。このことから、混合感染の少ない感染初期の個体の方が、有意な診断ができる可能性が高いと考えられる。

当該農場では、鶏マイコプラズマ病発生後、MG感染症生ワクチンをワクチンプログラムに追加し、その後終息している。本症例では、No.2の肺の二次気管支において、抗IBVマウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検査で軽度の陽性を示した。しかし、本検査陽性がNo.2のみであったこと、陽性像も軽度であったこと、No.2の肺を用いたIBV RT-PCR検査では陰性であったこと、RT-PCR RFLP法検査において、接種ワクチン由来と推定していること、MG生ワクチン導入後、発生が終息したこと等の根拠から、本事例におけるIBVの影響については軽度であり、群全体としては、マイコプラズマと細菌の二次感染が主因であると考察した。

以上から、本病における供試検体選定の際は、呼吸器症状の顕著な個体だけに偏らず、感染初期と思われる個体を検体に追加することが効果的と考えられ、今後、類似した事例の病性鑑定の際に活用していきたいと考える。

VI 謝辞

最後に、今回の発表にあたり、御助言及び免疫組織化学的検査に御協力頂いた国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所の生澤充隆先生に深謝いたします。

VII 参考文献

- 1) 鶏病研究会：カラーマニュアル 鳥の病気 第6版, 58-61(2008)
- 2) 明石博臣ら：動物の感染症第3版, 近代出版, 223-224(2011)
- 3) 全国家畜衛生職員会：病性鑑定マニュアル第3版, 農林水産省消費安全局監修, 日本ハイコム, 174-175 (2008)
- 4) 小高真紀子ら：肉用鶏における *Mycoplasma gallisepticum* の野外感染症例, 日獣会誌 66, 474-478(2013)
- 5) Kiss I et al: Vet Microbiol 58(1), 23-30 (1997)
- 6) Leuerman LH et al: Avian Dis 37(3) :829-834(1993)
- 7) Mase, M. et al. Arch Virol. 149(10), 2069-2078 (2004)
- 8) 堀内貞治ら：鶏病診断, 社団法人 家の光協会, 544-545(1982)
- 9) 板倉智敏ら：鶏病病理学カラーアトラス, 学窓社, 64-66(1988)
- 10) Nunoya T et al: Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens, VetPathol, 32, 11-18 (1995)