

## 10. 肉用鶏で発生した鳥マイコプラズマ症と分子疫学解析

大分家畜保健衛生所・1) 宇佐家畜保健衛生所

○病鑑 梅田麻美・長谷部恵理<sup>1)</sup>

### 【はじめに】

鳥マイコプラズマ症は *Mycoplasma gallisepticum* (MG)、*Mycoplasma synoviae* (MS) を原因とし、鳥に慢性呼吸器病を引き起こす届出伝染病であり、国内では減少傾向にあるものの現在も継続的に発生がみられる<sup>[1]</sup>。2024年3月、県内で48,000羽を飼養する肉用鶏農場（発生農場）においてMGによる鳥マイコプラズマ症が発生（本症例）。鳥マイコプラズマ症の対策等に資するため、発生農場分離株、県内他農場分離株、既報告の国内分離株やワクチン株の分子疫学解析を実施し、発生事例間での疫学的ならびに遺伝学的関連を考察した。

### 【本症例についての概要】

#### 1 農場概要および経過

発生農場は開放鶏舎6棟からなり、肉用鶏48,000羽を飼養。ワクチンは初生でコクシジウム、鶏伝染性気管支炎（IB）、13日齢でIB、伝染性ファブリキウス嚢病（IBD）、ニューカッスル病（ND）を接種していた。発生農場では2010年にMGによる鳥マイコプラズマ症が発生していた。

2024年3月23日、5号鶏舎にて死亡羽数が増加。現地家保が立ち入り、鳥インフルエンザ簡易検査陰性を確認。翌24日に死亡羽数が減少したものの、25日に再び死亡羽数が増加し、鶏舎内では呼吸器症状を呈する鶏が散見されたことから、衰弱鶏3羽の病性鑑定を実施した。

#### 2 材料および方法

47日齢の衰弱鶏3羽を用いた病性鑑定を実施。病性鑑定の概要を表1に示した。病理検査は剖検後、定法に従い実施。また、3羽の気管について免疫組織化学的にMG及びIBウイルス（IBV）抗原の検出を試みた。なお、MGについては動物衛生研究部門に検査を依頼した。ウイルス検査は呼吸器および免疫抑制関連ウイルスの遺伝子検査・分離検査を実施。細菌検査は一般細菌分離検査、マイコプラズマ（MGおよびMS）

表1. 材料・方法（本症例）

【材料】	47日齢の衰弱鶏3羽（主要臓器、脳、F嚢、気管、消化器官）
【方法】	
病 理	剖検後、定法に従い実施（HE染色、免疫組織化学染色：MG、IBV）。
ウイルス	①遺伝子検査 IBV、ILTV、CAV、IBDV、FAV ②分離検査 AIV、NDV、IBV、ILTV、FAV 鳥インフルエンザウイルス(AIV)、ニューカッスル病ウイルス(NDV)、鶏貧血ウイルス(CAV) 伝染性気管支炎ウイルス(IBV)、伝染性喉頭気管支炎ウイルス(ILTV)、鶏アデノウイルス(FAV) 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)
細 菌	①一般細菌検査 ②マイコプラズマ検査 遺伝子検査：PCR法（OIEマニュアル） 分離検査：Frey's培地 ③微量液体希釈法によるMG薬剤感受性試験 （対照：県内過去分離株3株+基準株1株） タイロシン（TS）、リンコマイシン（LCM）、チルミコシン（TMS）、カナマイシン（KM）、 エンロフロキサシン（ERFX）、フロルフェニコール（FFC）、チアンファンコール（TP）、 オキシテトラサイクリン（OTC）

遺伝子検査・分離検査を実施し<sup>[2]</sup>、分離された MG について薬剤耐性状況の変化等を確認するため、発生農場の過去分離株を含む県内分離株 3 株および MG の基準株を対照に微量液体希釈法による薬剤感受性試験を実施。

### 3 結果

剖検では、1/3 羽で気嚢の混濁や心膜への癒着、3/3 羽で心膜の白濁や肝包膜炎がみられた（写真 1）。病理検査では 3 羽に共通して気管の粘膜上皮細胞の増生やリンパ球浸潤を認め、心臓や脾臓の線維索性炎もみられた。また、MG 及び IBV の免疫組織化学的検査の結果、1/3 羽の気管で MG 抗原が陽性であった。細菌検査では 2/3 羽で大腸菌を分離し、マイコプラズマ検査では 3/3 羽で MG の遺伝子を検出、うち 1 羽で MG が分離された。ウイルス検査では 3/3 羽で鶏貧血ウイルス（CAV）、IBDV 遺伝子を検出、1/3 羽で鶏アデノウイルス（FAV）遺伝子を検出。IBDV 遺伝子については RFLP 型別にてワクチン株と同一であることを確認。これらの結果から、No. 1：鳥マイコプラズマ症【届出】、鶏大腸菌症、No. 2：鳥マイコプラズマ症疑い、鶏大腸菌症、No. 3：鳥マイコプラズマ症疑いと診断（表 2）。MG の薬剤感受性試験では、4 株ともに同様の傾向を示した。基準株と比較し耐性と思われる薬剤はなく、既報<sup>[3]</sup>と比較すると、リンコマイシンやカナマイシンがやや低感受性であった（表 3、4）。

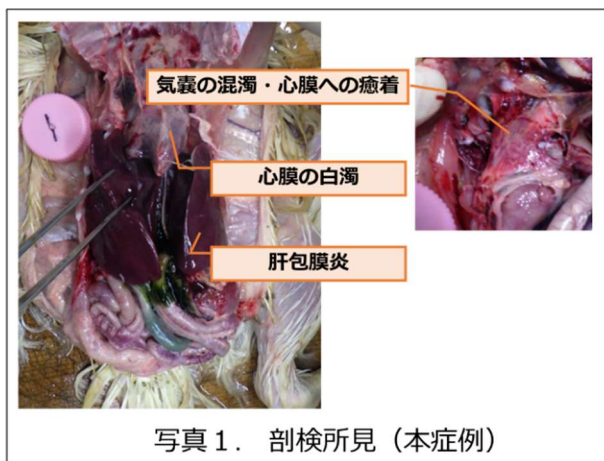


写真 1. 剖検所見（本症例）

表 2. 病性鑑定結果（本症例）

個体No.	No.1	No.2	No.3
剖検所見	心膜の白濁 心膜・肝臓の癒着	心膜の白濁 肝包膜炎	気嚢の混濁、 気嚢の心膜への癒着
病理検査	気管：粘膜上皮細胞の増生、粘膜炎有層へのリンパ球浸潤 心臓：線維索性心外膜炎 脾臓：線維索性析出 肝臓の線維索性被膜炎 肝臓の壊死巣、菌塞栓 肝臓の壊死巣、血栓		
免疫組織化学染色（MG/IBV）	+/-	-/-	±/-
細菌検査	大腸菌（主要臓器、脳）		菌分離陰性
マイコプラズマ検査	遺伝子	+	+
	分離	+	-
ウイルス検査	CAV、IBDV <sup>※</sup> 遺伝子検出		
	FAV 遺伝子検出		
※IBDVはRFLP型別によりワクチン株と同一			
診断名	No.1：鳥マイコプラズマ症【届出】、鶏大腸菌症 No.2：鳥マイコプラズマ症疑い、鶏大腸菌症 No.3：鳥マイコプラズマ症疑い		

表 3. MG薬剤感受性試験結果（本症例）

菌株	最小発育阻止濃度（μg/ml）				
	2024年発生農場株	2010年発生農場株	2019年大分株	2021年大分株	MG基準株
TS	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
LCM	8	2	2	4	2
TMS	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
KM	32	16	32	32	16
ERFX	0.125	0.125	0.125	0.0625	0.125
FFC	4	2	4	16	4
TP	4	1	4	8	2
OTC	0.5	0.125	0.0625	0.5	0.125

表 4. MG薬剤感受性試験結果（本症例）

菌株	最小発育阻止濃度（μg/ml）				
	2024年発生農場株	2010年発生農場株	2019年大分株	2021年大分株	MG基準株
TS	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
LCM	8	2	2	4	2
TMS	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
KM	32	16	32	32	16
ERFX	0.125	0.125	0.125	0.0625	0.125
FFC	4	2	4	16	4
TP	4	1	4	8	2
※既報の薬剤感受性試験結果 LCM：0.25～1（μg/ml） KM：8～16（μg/ml）					

【発生事例間の疫学的検討】

MG の単独感染では不顕性感染の経過をたどるのが一般的とされており<sup>[4][5]</sup>、本症例については、大腸菌との混合感染により重篤化したものと推察。発生農場では過去にも MG による鳥マイコプラズマ症が発生しており、過去分離株との関連や侵入経路の考察、再発防止のためのワクチン接種など、今後の対策について検討するため分子疫学解析による発生事例間の疫学的、遺伝学的関連について調査した。

1 材料および方法

MG 基準株 1 株、国内製造ワクチン株 4 株、発生農場分離株、その他県内分離株、他県分離株の 11 株、計 16 株を材料とした (表 5)。

16 株について、Multi locus sequencing typing (MLST) および Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) による分子疫学解析を既報<sup>[6][7]</sup>に従い、動物衛生研究部門にて実施。なお、MLST については、データベースが構築されている 2 つの方法にて実施したが、結果については Ghanem の MLST 結果および系統樹解析結果を示した。

表 5. 発生事例間の疫学的検討

【材料】 MG 16株

No.	分離年	備考	分離場所	株名
1	1960	基準株	米国	PG31T
2		ワクチン株	英国	6/85
3		ワクチン株	豪州	ts-11
4	1984	ワクチン株	米国	K5831b-19
5		ワクチン株		g210
6	2010	分離株	大分	大分 (2010・発生農場)
7	2011	分離株	福岡	福岡 (2011)
8	2012	分離株	徳島	徳島 (2012)
9	2013	分離株	埼玉	埼玉 (2013)
10	2015	分離株	岐阜	岐阜 (2015)
11	2015	分離株	広島	広島 (2015)
12	2019	分離株	大分	大分 (2019)
13	2019	分離株	長崎	長崎 (2019)
14	2021	分離株	大分	大分 (2021)
15	2022	分離株	山口	山口 (2022)
16	2024	株	大分	大分 (2024・発生農場)

2 結果

MLST の結果、16 株は大きく 3 つのグループとその他に分類された (表 6)。2024 年発生農場大分株および 2021 年大分株は Pub MLST データベース上に一致するものがなく、本調査にて新規にアレル番号やシーケンスタイプ (ST) が指定されたが (表 6 の赤字部分)、いずれも各グループのアレル番号と類似の配列を示し、違いはいずれも 1 塩基のみであり近縁な関係にあると考えられた。また、同時期に分離された近隣県由来株が同一の ST であった (表 7)。

表 6. 発生事例間の疫学的検討

MLST結果 (Ghanem)

株名	遺伝子	ugaA	atpG	DUF3196	mraW	plsC	dppC	lgT	ST
PG31 <sup>1</sup>		1	2	2	1	10	25	26	ST23
大分 (2010・発生農場)		6	1	2	1	10	24	31	ST58
福岡 (2011)		6	1	2	1	10	24	31	ST58
G210		1	1	2	1	10	25	31	ST59
長崎 (2019)		1	5	5	12	13	26	30	ST60
大分 (2019)		1	5	5	12	13	26	30	ST60
大分 (2024・発生農場)		1	5	5	11	34	26	48	ST99
埼玉 (2013)		1	5	5	11	13	26	32	ST57
K5831b-19		1	5	5	11	13	26	32	ST57
岐阜 (2015)		22	2	4	21	20	3	30	ST56
徳島 (2012)		22	2	4	21	20	3	30	ST56
広島 (2015)		22	2	4	21	20	3	30	ST56
大分 (2021)		22	5	32	21	20	26	30	ST98
山口 (2022)		22	2	4	21	20	3	47	ST96
6/85		9	8	10	12	14	6	19	ST10
ts-11		6	4	2	3	17	24	1	ST19

ST : Sequence type

- 3つのグループとその他に大別
- 新規アレルシーケンスや新規STがみられたがいずれの遺伝子も配列は同一グループのアレル番号の配列と類似しており、違いは1塩基のみ

表 7. 発生事例間の疫学的検討

MLST結果 (Ghanem)

株名	遺伝子	ugaA	atpG	DUF3196	mraW	plsC	dppC	lgT	ST
PG31 <sup>1</sup>		1	2	2	1	10	25	26	ST23
大分 (2010・発生農場)		6	1	2	1	10	24	31	ST58
福岡 (2011)		6	1	2	1	10	24	31	ST58
G210		1	1	2	1	10	25	31	ST59
長崎 (2019)		1	5	5	12	13	26	30	ST60
大分 (2019)		1	5	5	12	13	26	30	ST60
大分 (2024・発生農場)		1	5	5	11	34	26	48	ST99
埼玉 (2013)		1	5	5	11	13	26	32	ST57
K5831b-19		1	5	5	11	13	26	32	ST57
岐阜 (2015)		22	2	4	21	20	3	30	ST56
徳島 (2012)		22	2	4	21	20	3	30	ST56
広島 (2015)		22	2	4	21	20	3	30	ST56
大分 (2021)		22	5	32	21	20	26	30	ST98
山口 (2022)		22	2	4	21	20	3	47	ST96
6/85		9	8	10	12	14	6	19	ST10
ts-11		6	4	2	3	17	24	1	ST19

ST : Sequence type

- 同時期に分離された近隣県由来株が同一のST

得られた Ghanem の MLST 解析結果をもとに系統樹解析を実施したところ、本調査にて新規 ST となった 2024 年発生農場大分株は 2013 年埼玉株および k5831b-19 ワクチン株に近縁であり、2021 年大分株は 2012 年徳島株、2015 年岐阜株、2015 年広島株と近縁であることが判明 (図 1)。

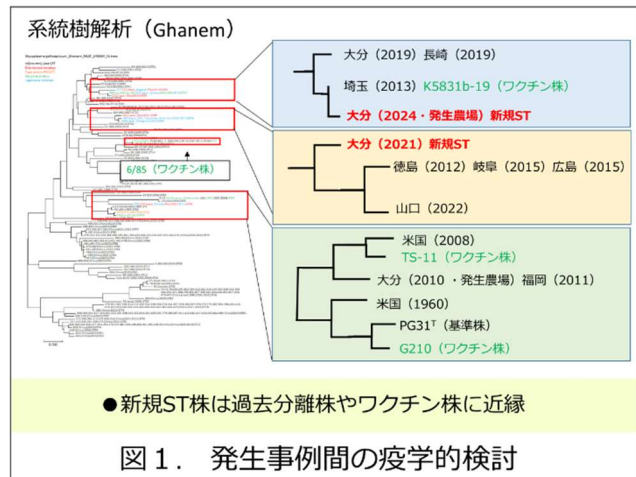


図 1. 発生事例間の疫学的検討

PFGE の結果、16 株は大きく 4 つのグループとその他に分類され、それぞれのグループ内で同一または類似のパルスパターンを示した (図 2)。特に 2010 年発生農場大分株と 2011 年福岡株、2019 年大分株と 2019 年長崎株、2024 年発生農場大分株と 2013 年埼玉株および k5831b-19 ワクチン株、2015 年岐阜株、広島株、2021 年大分株についてはそれぞれが同一のパルスパターンを示した (図 3)。

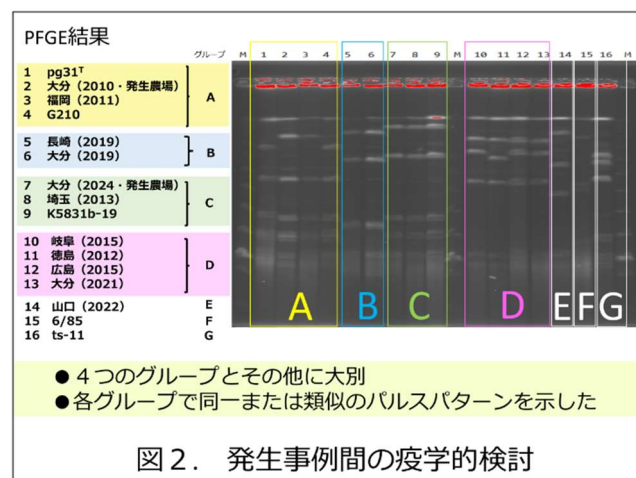


図 2. 発生事例間の疫学的検討

### 3 考察

分子疫学解析の結果、発生農場株間については、2010 年分離株と 2024 年分離株で疫学的な関連は認められず、同一株による発生の可能性は低いと推察された。一方で、同時期に近隣県で分離された MG については疫学的な関連が示唆された。また、一部の国内分離株はワクチン株と遺伝学的に近縁であり、ワクチン株類似の野外株の浸潤の可能性を示唆するものだった。さらに、新規 ST となった株

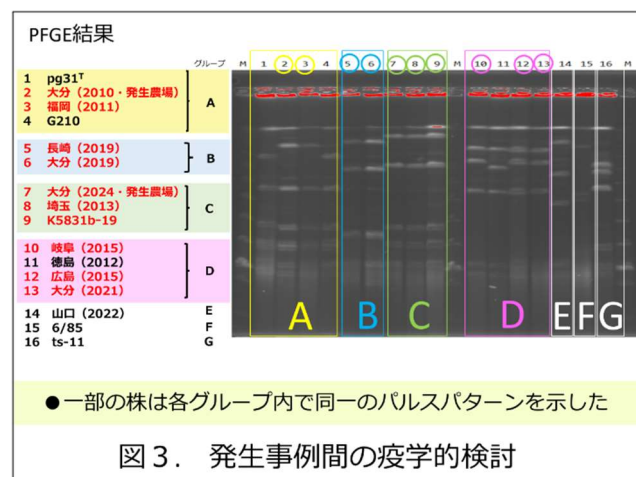
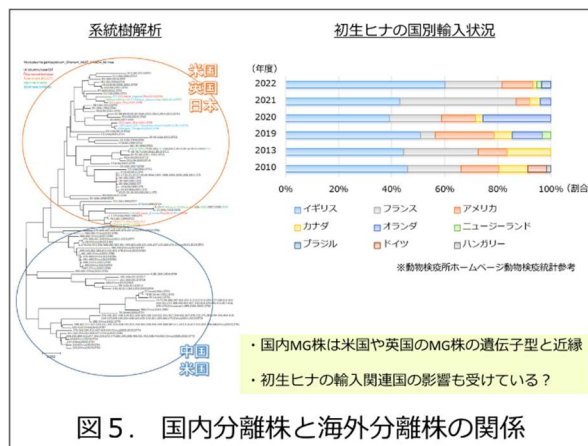
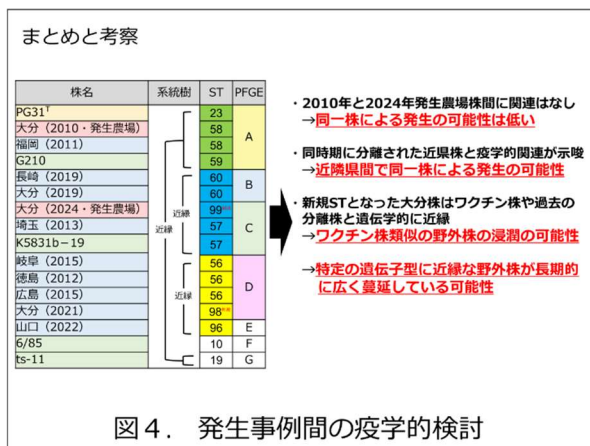


図 3. 発生事例間の疫学的検討

は過去の国内分離株と遺伝学的に近縁であったことから、これらに近縁な遺伝子型の野外株が国内に長期的に広く蔓延していることが示唆された (図 4)。また、系統樹解析の結果から国内の MG 株はアメリカやイギリスの MG 株と遺伝学的に近縁であり、これらは日本のヒナの輸入上位国と関連が深いように思われた (図 5)。



### 【まとめ】

2024年3月にMGによる鳥マイコプラズマ症が発生したことをきっかけに、発生事例間の疫学的、遺伝学的関連の調査のため分子疫学解析を実施した。解析の結果、発生農場については過去のMG株との関連は認められなかった。一方で、同時期に近隣県で発生した事例間に疫学的関連を認め、病原体の持ち込みや同一野外株による発生の可能性が示唆された。また、本解析にて新規STとなった株は過去の国内分離株やワクチン株に遺伝学的に近縁であり、特定の遺伝子型やワクチン株に類似した野外株の長期的な国内浸潤の実態が明らかとなった。さらに、国内MG株はアメリカやイギリス株に遺伝学的に近縁で、輸入関連国の影響も示唆された。以上のことから、鳥マイコプラズマ症の対策として、各段階でのバイオセキュリティの強化や疾病発生時の近隣自治体間でのリアルタイムな情報共有が重要であると考えられた。

### 【参考文献】

- [1] 佐藤静夫、片山宜郎, 鶏のマイコプラズマ症の現状と防疫, 鶏病研究会報 48 巻 2号 p.63-84 (2012)
- [2] WOA, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2011)
- [3] 浦川ら, 肉用鶏から分離された *Mycoplasma gallisepticum* の薬剤感受性及び疫学解析, 長崎県業績発表会 (2022)
- [4] 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, 66h69, 鶏病研究会, 茨城 (2010)
- [5] 小高ら, 肉用鶏における *Mycoplasma gallisepticum* の野外感染症例, 日獣会誌 66, 474 ~478 (2013)
- [6] Ghanem, M. and Hl-Gazzar, M. 2019. Avian Dis. 63: 693-702.; Bekō, K. et al., 2019. Vet Microbiol. 231:191-196.
- [7] Maoris, C., et al. 2001. Vet Microbiol. 79:1-9.