

マイコプラズマ・シノビエによる卵殻尖端部の異常：野外及び実験室内試験

A. FEBERWEE, J.J. DE WIT and W.J.M. LANDMAN

要約

卵殻表面の異常、即ち卵殻尖端部における卵殻の粗糙化、卵殻の半透明化、疵や割れなどを特徴とする異常が採卵鶏群に最近増加傾向にある。2つの野外試験より、卵殻尖端部の異常（EAA：Eggshell Apex Abnormalities）とマイコプラズマ・シノビエとの関連性が示された。マイコプラズマ・シノビエは、EAA卵産卵鶏群の輸卵管からのみ分離され、対照鶏群の輸卵管からは分離されなかったが、両群ともマイコプラズマ・シノビエ抗体陽性であった。抗生物質治療により約12日間は正常な産卵が認められた。実験室内動物試験により、EAAとマイコプラズマ・シノビエの因果関係が確認された。この試験は、陰性対照群とマイコプラズマ・シノビエ輸卵管分離株を接種した4群（気管内接種2群と静脈内接種2群）より構成された。マイコプラズマ・シノビエ接種群の各接種経路の一方には、接種5日前にIBV D1466を感染させた。EAAは、主にマイコプラズマ・シノビエ気管内接種後に誘発され、IBV D1466を重感染させた鶏群で有意により高い頻度でみられた。マイコプラズマ・シノビエは、EAA卵産卵鶏群の輸卵管でのみ分離された。マイコプラズマ・シノビエ感染群では、1羽当りの1日平均産卵個数も減少した。走査電子顕微鏡検査による診断では、乳頭状層の消失と内卵殻膜の肥厚が認められた。

I. 緒言

マイコプラズマ・シノビエは、臨床的及び経済的観点からコマーシャル鶏にとって2番目に問題となるトリマイコプラズマ種と考えられる（Stipkovits and Kempf, 1996; Kleven and Ley, 2003）。鶏、七面鳥両方において、マイコプラズマ・シノビエは気嚢及び関節滑膜に親和性があり、気嚢や滑膜に病変を起こす。（Landman and Feberwee, 2001; Kleven and Ley, D, 2003; Landman and Feberwee 2004）。

2000年以降、オランダの採卵鶏群において、これまでに報告されていないEAAが増加傾向にある。観察されたEAAは、卵殻表面の異常（ざらざらにみえる）、卵殻厚の減少、卵殻の半透明化、ひび卵及び破卵の発生などを特徴とする。ここで述べる卵殻異常は、卵の尖端部の約2 cmまでの範囲に限定して認められ、非常にはっきりした境界線をもっている。

2つの野外試験が実施され、輸卵管のマイコプラズマ・シノビエ感染と異常卵産卵との関連性が示された。その後、実験室内動物試験により輸卵管のマイコプラズマ・シノビエ感染とEAA卵産卵の因果関係が立証された。筆者らの所見により、マイコプラズマ・シノビエと新たな卵殻異常及び産卵の低下が初めて関連付けられ、マイコプラズマ・シノビエに

よる経済的な関連性はさらに高まっている。

II. 材料及び方法

野外試験1. EAA卵を各々、3、10、及び25%産卵するEAA産卵白色採卵鶏群3群について試験を行った。対照群としてマイコプラズマ・シノピエ抗体陽性の3鶏群を使用した。1群あたり3~6羽を肉眼的検査、マイコプラズマ・シノピエ抗体検査、一般細菌学的検査及び輸卵管のマイコプラズマ培養に供した。全ての試験において、分離されたマイコプラズマについてはシノピエであることをPCRによって確認した。

野外試験2. EAA卵を産卵する70週齢の白色採卵鶏40羽を農場内の単飼ケージで飼育し、7週間の長期野外試験を実施した。試験開始後3週目(W3)にオキシテトラサイクリン100 mg(長時間持続型)を半数の鶏(n=20)に各々皮下注射した。マイコプラズマ・シノピエ抗体陽性でEAA卵が認められない採卵鶏群を対照群とした。

マイコプラズマ・シノピエ抗体検査は、試験開始後0日目(D0)、3週目(W3)、W4及びW7に実施した。試験開始後4週目に薬剤処置群10羽及び薬剤無処置群10羽を、剖検、抗体検査、一般細菌学的検査及び輸卵管のマイコプラズマ培養に供した。残りの鶏についても、抗生物質治療後3週後(W7)に同様の検査を行った。

卵殻尖端部の異常、無卵殻卵及び破卵の産卵については、農家が7週間毎日記録した。W3、W4及びW7に、EAA卵産卵農場及び対照農場由来の相当数のサンプルにおける卵殻強度(ニュートン)及び内部卵質パラメータ(ハウユニット及び卵白高)を卵品質測定装置FUTURA 3/A型で定量的に測定した。

実験室内動物試験計画. 野外試験1の農場3の鶏群における輸卵管由来のマイコプラズマ・シノピエ分離株を用いた。アデノウイルス(EDS)、トリインフルエンザ、マイコプラズマ・ガリセプチカム、及びマイコプラズマ・シノピエフリーの18週齢のコマーシャル白色採卵鶏を11週間の実験に供した。鶏は、陰圧のHEPAアイソレーターで飼育した。試験群は以下の5群とした：① マイコプラズマ実験用(ME)プロス2 mLを静脈内接種(i.v.)した陰性対照群(n=12)、② マイコプラズマ・シノピエ 10^6 cfu/mLを含むMEプロス2 mLを静脈内接種したマイコプラズマ・シノピエi.v.群(n=18)、③ マイコプラズマ・シノピエ 10^6 cfu/mLを含むMEプロス2 mL静脈内接種し、5日前にIBV D1466 ($10^{6.6}$ EID₅₀/mLを含む尿膜腔液1 mL気管内及び0.5 mL皮下)を接種したマイコプラズマ・シノピエ静脈内接種したi.v./IBV D1466群(n=17)、④ マイコプラズマ・シノピエ 10^6 cfu/mLを含むMEプロス1 mLを投与したマイコプラズマ・シノピエ気管内接種(i.t.)群(n=18)、及び⑤ マ

イコプラズマ・シノビエ 10^6 cfu/mLを含むMEプロス1 mLと、5日前にIBV D1466($10^{6.6}$ EID₅₀/mLを含む尿膜腔液1 mL気管内及び0.5 mL皮下)接種したマイコプラズマ・シノビエ i.t./IBV D1466群 (n=17)。

D0、W4、W8 及びW11に、マイコプラズマ・シノビエとIBV D1466の抗体検査を実施した。D0とW11 には鶏の体重を個別に測定した。W11に、全ての鶏について剖検、抗体検査、一般細菌学的検査及び子宮のマイコプラズマ培養を行った。EAA卵産卵鶏3羽及びEAA卵の産卵が認められない鶏3羽に対して輸卵管の組織学的検査を行った。相当数の卵についてW4からW6まで、及びW9からW11までの卵殻強度を測定した。

最後に、EAA卵 (n=2) と正常対照 (n=2) の両方の卵殻の構造を走査電子顕微鏡検査 (SEM) により診断した。画像解析ソフトAnalysis FIVEに基づくオリンパスソフトイメージングシステムの一般的SEM画像診断プラットフォームであるスカンジウムを用い、卵1個当たり6視野の6~7カ所で石灰化層の厚さを測定した。

統計分析. 輸卵管由来のマイコプラズマ培養陽性率は2標本の比率の検定(Proportion Two-Sample-Test)を用いて解析した。卵質パラメータ、卵重、産卵個数、EAA卵産卵データ及び石灰化卵殻層の厚さをKruskall-Wallis一元配置分散分析を用いて解析した。post hoc解析としてKruskall-Wallis全対比較検定を行った (Statistix®, 2005)。

III . 結果

野外試験1. マイコプラズマ・シノビエは、EAA卵を産卵した鶏またはEAA卵産卵鶏群に属している鶏の輸卵管からのみ分離された。

野外試験2. マイコプラズマ・シノビエは、W4にEAA卵産卵鶏群の薬剤処置群10羽中7羽及び薬剤無処置群の10羽中8羽の輸卵管から大量に分離された。W7には薬剤処置群及び薬剤無処置群ともに10羽中9羽から分離された。マイコプラズマ・シノビエは、EAA鶏群に属しているもののEAA卵の産卵が認められない鶏10羽中2羽より分離されたが、対照農場の鶏 (n=9) からは分離されなかった。一般細菌学的検査では陽性結果は得られなかった。

本試験で対象とした全ての鶏はほとんど常時EAA卵を産卵した。抗生物質治療により約12日間は正常卵殻の卵を産卵した。卵加圧試験による卵殻強度は、対照群 (n=20) の34.1N (SEM 6.9) に対して、EAA卵 (n=15) では平均15.9N (SEM 2.2) と有意に低かった (P<0.05)。抗生物質治療後、卵殻強度は一時的に改善し、未治療群との顕著な差が認められた (治療後1週間 = 30.4 N (SEM 10.8 (n=13))。内部卵質に関してはEAA卵と正常卵の間に有意

差は確認されなかった。

剖検時、両野外試験ともに肉眼的異常は観察されなかった。

実験室内動物試験. マイコプラズマ・シノビエ抗体は、マイコプラズマ・シノビエ接種群においてのみ検出された。またIBV D1466接種群のみがHI試験において血清抗体に陽転がみられた。

マイコプラズマ・シノビエi.t./IBV D1466群の輸卵管からのマイコプラズマ・シノビエ分離陽性率(7/17)は、対照群(0/12)、マイコプラズマ・シノビエi.v.接種群(0/17)及びマイコプラズマ・シノビエi.v./IBV D1466接種群(1/16)と比べて有意に高かったが($P<0.05$)、マイコプラズマ・シノビエi.t.接種群(6/17)との有意差は認められなかった。

D0における全試験群の平均体重には有意差は認められなかった。試験期間終了時(W11)においてマイコプラズマ・シノビエ(i.v.とi.t.)/IBV D1466を接種した両群の増体量(368 g (SEM 17.6) と372 g (SEM 20.4))は、対照群(473 g (SEM 19.7))及びマイコプラズマ・シノビエi.t.接種群(486 g (SEM 28.4))と比べて有意に低かった。しかし、マイコプラズマ・シノビエi.v.接種群(384 g (SEM 20.9))とその他の試験群間の増体量に有意差は認められなかった。

マイコプラズマ・シノビエi.t.群の1羽当り1日平均産卵個数(0.49 (SEM 0.02))は、他の群と比べて有意に少なかった:対照群0.75 (SEM 0.02)、マイコプラズマ・シノビエi.v.群0.61 (SEM 0.03)及びマイコプラズマ・シノビエi.v./IBV D1466接種群0.62 (SEM 0.03)。ただし、マイコプラズマ・シノビエi.t./IBV D1466群は例外だった(0.54 (SEM 0.03))。

EAA卵は、マイコプラズマ・シノビエi.v./IBV D1466 (n=15)、マイコプラズマ・シノビエi.t. (n=49)及びマイコプラズマ・シノビエi.t./IBV D1466 (n=96)接種群の3群でみられた。

EAA卵の産卵は、マイコプラズマ・シノビエ接種後3~5週間に始まった。

マイコプラズマ・シノビエi.t./IBV D1466群の1羽当りの1日平均EAA卵産卵個数(0.1 (SEM 0.009))は、マイコプラズマ・シノビエi.t.群(0.06 (SEM 0.006))及びマイコプラズマ・シノビエi.v./IBV D1466群(0.02 (SEM 0.004))と比べて有意に高かった。

W4~5及びW9~11の卵加圧試験では、どちらのサンプリング時期でもEAA卵の平均卵殻強度(それぞれ、16.8 N (SEM 0.9) n=60及び12.7 N (SEM 1.0) n=30)は、対照群(それぞれ、37.7 N (SEM 1.4) n=60及び31.7 n (SEM 1.8) n=30)に対して有意に減少していることが示された($P<0.05$)。また、W4~5のEAA卵の産卵がみられた3試験群由来でEAAが認められない卵(n=60)及び、W9~11の各試験群由来のEAAが認められない卵(n=30/群)に対しても有意差が認められた。対照群の卵と試験群のEAAが認められない卵

の卵殻強度は、どちらのサンプリング時期による有意差は認められなかった。

いずれの供試鶏の輸卵管からも組織病理学的病変は確認されなかった。

卵殻サンプルのSEM解析により、EAA卵では乳頭状層の完全な消失が認められた。棚状層の一部も消失していたが、内卵殻膜は肥厚していた。

EAA卵尖端部における卵殻石灰化層の厚さの平均値は、対照群と比べて有意に減少していた ($P < 0.05$) (野外試験EAA卵群 $212 \mu\text{m}$ (SEM 1.5) ($n=42$) 及び対照群 $311 \mu\text{m}$ (SEM 1.7) ($n=38$); 実験室内試験EAA卵群 $246.9 \mu\text{m}$ (SEM 1.7) 及び対照群 $286.7 \mu\text{m}$ (SEM 1.7) (両群とも $n=42$))。

IV . 考察

新たな卵殻異常が発見された。卵質に関する研究により、重度の卵殻強度の低下が認められ、肉眼的に観察された半透明化及びSEM所見 (乳頭状層の消失及び棚状層の一部消失) が一致していた。さらに、SEMによる石灰化層の厚さの測定により、EAA卵では正常卵と比べて石灰化層が有意に減少していることが示された。

両野外試験により、輸卵管のマイコプラズマ・シノピエとEAA卵の産卵の関連性が示された。新たに報告された卵の異常とマイコプラズマ・シノピエとの因果関係が、実験室内動物試験により立証された。EAA卵の産卵は、マイコプラズマ・シノピエi.v.群を除いた全てのマイコプラズマ・シノピエ接種群で認められた。EAA卵の産卵個数はマイコプラズマ・シノピエi.t./IBV D1466群が最も多かった。増体量は、マイコプラズマ・シノピエi.t./IBV D1466群とマイコプラズマ・シノピエi.v./IBV D1466群で有意に低下した。

今回の実験室内動物試験で認められたマイコプラズマ・シノピエとIBV間の相乗作用は、以前に他のマイコプラズマ・シノピエ株で明らかにされていたので、予想されないものではなかった (Landman and Feberwee, 2004; Springer *et al.*, 1974; Hopkins and Yoder, 1982)。

マイコプラズマ・シノピエによるEAA卵産卵の誘発は接種経路に関連しており、i.t.経路が最も高率であった。マイコプラズマ・シノピエの気道 (気嚢) から輸卵管への移行は、全身循環を介した輸卵管でのコロニー形成よりも効率的と見られる。

抗生物質治療による効果は限定的であり、食卵への残留の危険性があることから、マイコプラズマ・シノピエによるEAA卵産卵をコントロールするための別の方法 (根絶計画、ワクチン接種など) を検討する必要がある。

参考文献

- Hopkins, S.R. and Yoder, Jr. H.W. (1982). *Avian Dis.* **26**:741-752.
- Kleven, S.H. and Ley. D. (2003). *Diseases of Poultry* 11th Edition, 719-744 and 756-766.
- Landman, W.J.M. and Feberwee, A. (2001). *Avian Pathol.* **30**:629-639.
- Landman, W.J.M. and Feberwee, A. (2004). *Avian Pathol.* **33**:591-598.
- Springer, W.T., Luskus, C. and Pourciau, S.S. (1974). *Infect. Immun.* **10**:578-589.
- Statistix® (2005). User.s Manual. Analytical software version 8.0. Tallahassee, FL.
- Stipkovits, L. and Kempf. I. (1996). *Rev. Sci. Tech.* **15**:1495-1525.