

子山羊の *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* 感染による 多発性関節炎，化膿性気管支肺炎及び化膿性角膜炎を 主徴とした伝染性無乳症の3例

中尾聡子¹⁾ 荒木美穂¹⁾ 津波 修²⁾ 高木和香子²⁾ 片桐慶人³⁾
仲村真理³⁾ 荷川取秀樹³⁾ 又吉正直^{3)†}

1) 沖縄県家畜衛生試験場 (〒900-0024 那覇市古波蔵112)

2) 沖縄県北部家畜保健衛生所 (〒905-0012 名護市名護4606-4)

3) 沖縄県中央家畜保健衛生所 (〒901-1202 南城市大里字大里2505)

(2012年12月10日受付・2013年6月3日受理)

要 約

2012年4～5月にかけて沖縄本島の肉用繁殖山羊の2農場において，関節炎や呼吸器症状を主徴とする3頭の子山羊の病性鑑定を行った。解剖所見では肺のモザイク模様変化，多発性関節炎，胸膜肺炎及び角膜炎が見られた。組織学的検査において，症例1では軽度の肺胞中隔肥厚と肺胞へのマクロファージ浸潤が，症例2では手根関節及び足根関節に一部骨組織の壊死を伴う化膿性線維素性関節炎が，症例3では化膿性気管支肺炎及び化膿性角膜炎がそれぞれ認められた。細菌学的検査では3頭の肺，関節及び関節腔液から *Mycoplasma* 属菌種が分離され，生化学的性状，PCR及びPCR-RFLP検査の結果，いずれも *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc) と同定された。免疫組織化学的検査では病変部にMmcの陽性抗原が認められた。この結果，本症例はMmcによる多発性関節炎，化膿性気管支肺炎及び化膿性角膜炎を主徴とする伝染性無乳症（家畜伝染病予防法規則）と診断された。

——キーワード：気管支肺炎，伝染性無乳症，山羊，*Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*，多発性関節炎。

----- 日獣会誌 66, 539～544 (2013)

伝染性無乳症 (contagious agalactia) は，OIEの国際家畜伝染病の重要疾病リストにあげられており，わが国ではめん羊及び山羊を対象家畜とした監視伝染病（届出伝染病）に指定されている。伝染性無乳症の病原体は *Mycoplasma agalactiae*，*M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc)，*M. capricolum* subsp. *capricolum* 及び *M. putrefaciens* の4菌種である [1]。このうち *M. agalactiae* 以外はいわゆる *M. mycoides* (Mm) クラスタに属し，主として山羊に感染症を起こすとされている [2, 3]。法上では伝染性無乳症の疾病名で届け出ることになっているが，特に子山羊では関節炎や肺炎を主徴とする疾病である [3]。国内では1991年に沖縄県でMmcによる子山羊の発症例が初めて報告され（家畜衛生試験場年報，第27巻），その後散発的な発生が確認されている。今回，

本島中部及び北部の肉用繁殖山羊農場において，ほぼ同時期に多様な病型を呈する伝染性無乳症の症例に遭遇したため，その概要を報告する。

材料及び方法

発生農場：A農場，沖縄県中頭郡の肉用山羊繁殖農場で雄山羊2頭，雌山羊16頭，子山羊4頭の合計22頭を飼養。導入歴は2011年11月に6頭のザーネン種の導入があった。B農場，国頭郡の肉用繁殖農場で雌山羊4頭，子山羊2頭の合計6頭を飼養。導入歴は2012年2月に当該子山羊の母山羊1頭の導入があった。

病性鑑定症例：症例1。A農場で2012年4月上旬に双子で出産されたボア種で生後3週齢の雌子山羊1頭が4月29日元気食欲低下，介助すると起立するが後肢のふ

† 連絡責任者(現所属)：又吉正直 (沖縄調理師専門学校)

〒900-0033 那覇市久米1-18-7

☎098-861-7100 FAX 098-867-3096

E-mail : tom-nao@nirai.ne.jp

らつきが見られた。4月30日には体温は40.0℃に達し、ベンジルペニシリン・ジヒドロストレプトマイシンの合剤を投与した。翌日の体温は39.2℃で、前日同様の治療を行ったが、5月9日に起立意欲がなくなり、5月10日朝には死亡で発見された。症例2。A農場で4月30日に双子で出産されたザーネン種で生後5週齢の雌子山羊1頭が5月24日に左後肢の跛行が見られ、翌日から左前肢の跛行が認められたため、25日、28日、30日に症例1と同様の抗菌剤が投与された。6月6日、予後不良と判断し、鑑定殺を行った。症例3。B農場で3月下旬に双子で出産されたザーネン種のうち、生後2カ月齢の雄子山羊1頭が5月30日に元気消失、下痢で衰弱を呈した後、5月31日に死亡で発見された。投薬歴はなかった。なおB農場では4月上旬～5月下旬までに同居の成山羊及び本事例を含む子山羊の合計6頭が死亡した。

病理組織学的検査：剖検後、中枢神経及び各臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い鏡検した。肺、関節、脊髄及び眼球については、抗Mmc家兎血清(動物衛生研究所より分与)を用いた免疫組織化学的染色を行った。

一般細菌検査：主要臓器、関節及び関節液を5%羊血液寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン(株)、東京)と変法GAM寒天培地(日水製薬(株)、東京)に接種し、37℃で48時間、好気及び嫌気条件下で培養した。

マイコプラズマ検査：常法[4]に基づき症例1及び症例3の肺と症例2の肺、関節、関節腔液を変法Hayflick寒天培地に接種し、37℃で3日間、5%CO₂条件下で培養した。マイコプラズマ様分離株は変法Hayflick液体培地に接種し、37℃で1～2日間純培養した後、生化学的性状検査として、グルコース発酵性とアルギニン加水分解性を調べた。

分子学的生物検査：増菌培養した菌液1mlを遠心し、PBSで洗浄した菌体沈渣をInstaGene Matrix(Bio-Rad)でDNA抽出した。抽出されたDNAはMmクラスター検出用プライマー(MmF:5'-CGAAAGCGGCTTACTGGCTTGTT-3')、(MmR:5'-TTGAGATTAGCTCCCCTTCACAG-3')[5]及び*M. agalactiae*検出用プライマー(MagF:5'-CCTTTTAGATTGGGATAGCGGATG-3')、(MagR:5'-CCGTCAAGGTAGCGTCATTCCTAC-3')[6]を用いてPCRを行った。PCR産物は3%アガロースゲルで泳動し、切り出したゲルをDNA精製キット(QIAquick Gel Extraction Kit、(株)キアゲン、東京)で精製した。精製PCR産物は、制限酵素(*Pst* I、タカラバイオ(株)、東京)で処理し、37℃で1時間反応させた後、3%アガロースゲルで電気泳動し、泳動ゲルはエチジウムブロマイドで染色し観察した[5]。



図1 肺のモザイク模様変化(症例1)

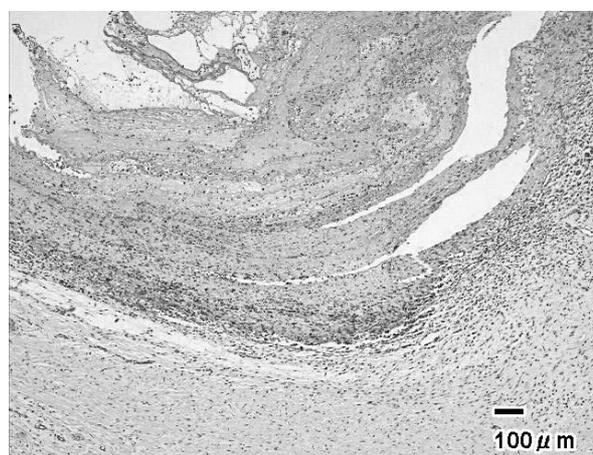


図2 Mmcによる左後肢関節包の化膿性線維素性関節炎(症例2)

疎性結合組織からなる滑膜に好中球等の炎症細胞が浸潤。関節腔内に線維素の析出が顕著(HE染色)

薬剤感受性試験：マイコプラズマの薬剤感受性試験は既報に基づき、症例1肺由来株、症例2肺由来株、関節由来株及び症例3肺由来株の合計4株について、微量液体希釈法により行った[7]。供試薬剤はエリスロマイシン、オキシテトラサイクリン、ストレプトマイシン(ナカライテスク(株)、京都)、タイロシン、チアムリン(和光純薬工業(株)、大阪)、リンコマイシン、エンロフロキサシン(Sigma, U.S.A.)とした。なお、薬剤対照参照菌株としてMmcのY-goat株を用いた。

成 績

病理解剖検査：症例1は左肺のモザイク模様変化(図1)、肝臓及び腎臓の軽度腫脹が観察された。症例2は右肺後葉の暗赤色充血、左手根関節及び左足根関節の腫大



図3 膿瘍を伴う化膿性気管支肺炎 (症例3) (HE染色)

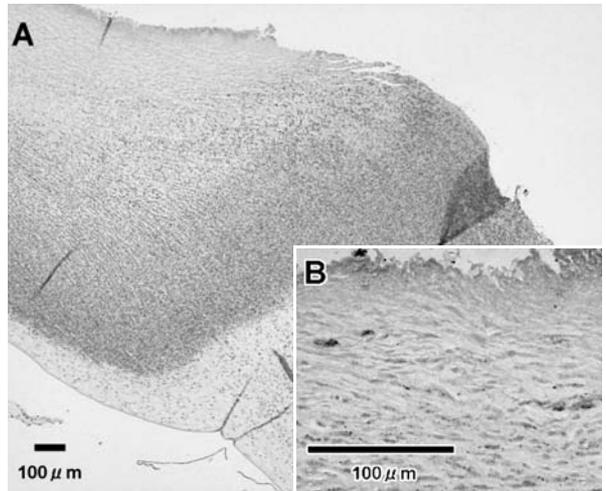


図5 A:化膿性角膜炎 (HE染色) (症例3)
B:同部位の抗Mmc血清による免疫組織化学的染色像

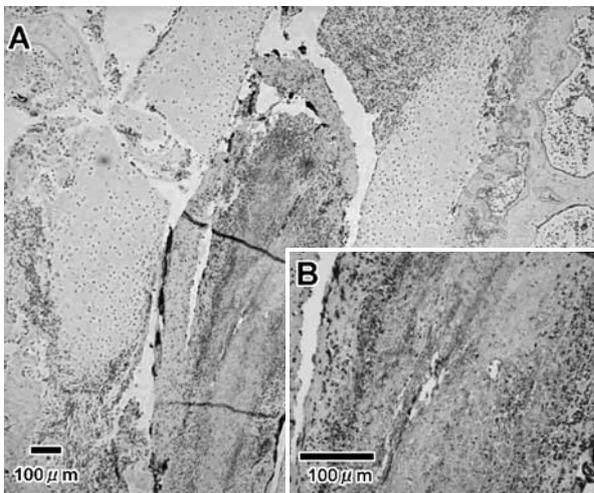


図4 左後肢関節腔内の免疫組織化学的染色像 (症例2)
A:左後肢関節腔内の抗Mmc免疫組織化学的染色像
B:拡大図

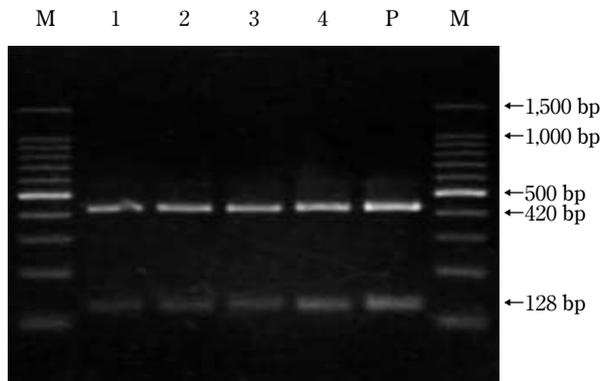


図6 分離株のPCR-RFLP解析
1:症例1(肺) 2:症例2(肺) 3:症例2(関節)
4:症例3(肺) P:Y-goat株 M:分子量マーカー

と関節腔の腫脹及び乾酪様物の貯留が観察された。また症例3では肺の中葉の肝変化と白色結節散在，多発性漿膜炎及び角膜炎が観察された。

病理組織学的検査: 症例1は軽度の肺胞中隔肥厚と肺胞へのマクロファージ浸潤，症例2は左手根関節及び左足根関節で，一部骨組織の壊死を伴う化膿性線維索性関節炎 (図2)，症例3では肺前葉及び中葉で辺縁部に膿瘍が多発し，内部に化膿性気管支肺炎が認められた (図3)。また，角膜表層に化膿性角膜炎が認められた。

免疫組織化学的検査: 症例2の関節腔内 (図4) と症例3の肺膿瘍辺縁部，気管支，肺胞内及び角膜にMmc抗原を認めた (図5)。

一般細菌検査: 症例1, 2では有意な細菌の分離はなかったが，症例3の肺から *Bibersteinia trehalosi* (*Pasteurella trehalosi*)，*Streptococcus bovis*，*Escherichia coli* が分離された。

マイコプラズマ検査: 症例1の肺，症例2の肺，関節，

関節腔液及び症例3の肺から培養性状がよく類似したマイコプラズマ様菌が分離された。当該菌は発育速度が速く，培養48時間後，寒天培地にfried egg状のコロニーを形成した。生化学的性状検査では，分離菌はいずれもグルコース発酵陽性，アルギニン加水分解陰性であり，フィルムスポットを形成しなかった。

分子生物学的検査: マイコプラズマ様分離菌株はMmクラスターを検出可能なPCRで548bpに特異バンドが認められたが，*M. agalactiae*の特異PCRには反応がなかった。特異遺伝子が検出されたPCR増幅産物を制限酵素 *Pst* I で処理した結果，420bp及び128bpバンドを確認し，分離株をMmcと同定した (図6)。

薬剤感受性試験: 分離されたMmc及びY-goat株のMICはエリスロマイシン0.06 μg/ml，タイロシン0.016 μg/ml，リンコマイシン (分離株: 1 μg/ml，Y-goat株: 2 μg/ml)，チアムリン0.125 μg/ml，オキシテトラサイクリン1 μg/ml，エンロフロキサシン

0.125 $\mu\text{g/ml}$ 及びストレプトマイシン 64 $\mu\text{g/ml}$ であり、リンコマイシンを除き、いずれの薬剤も Y-goat 株と同値であった。ストレプトマイシンには耐性を示したが、それ以外の薬剤に対する耐性は認められなかった。

考 察

2012年6月まで、Mm クラスタは、*M. mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (MmmSC), MmmLC, Mmc, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* 及び *M. leachii* の5菌種としていた [1]。このうち MmmLC と呼ばれていた生物型は Mmc と生化学的性状及び遺伝学的性状が同一で、わずかな血清学的相違で区別されていたが、2009年にこれらを同一菌種とする提唱が行われ、現在ではこの2菌種は Mmc としてみなされている。このことにより MmmSC と MmmLC の生物型による区分が解消された [1, 8]。

沖縄県では1991年2月に子山羊の胸膜肺炎及び多発性関節炎の症例から Mm クラスタに属する菌が分離され。その後、Kobayashiら [9] による詳細な生化学的性状及び遺伝学性状解析により、当該菌は MmmLC と同定された。Mmc による伝染性無乳症は、乳房炎、無乳症、多発性関節炎、胸膜肺炎、髄膜炎及び角結膜炎などさまざまな病型がある [1, 10-15]。今回の症例は A 農場では多発性関節炎が、B 農場では化膿性気管支肺炎及び化膿性角膜炎が認められた。このうち、A 農場の症例1における病理組織学的検査では肺病変が軽度であったものの、肺胞中隔肥厚や肺胞へのマクロファージの浸潤が認められたこと、肺から有意な菌数で Mmc のみが純培養的に分離されたことなどから、この肺病変についても Mmc が関与したものと考えられた [2]。Mmc による伝染性無乳症は、沖縄県ではその後、2006年及び2010年にも各1例発生しており (家畜衛生週報No. 2925)、今回は4~6例目の発症例である。症例3に認められた化膿性角膜炎は過去の症例には確認されておらず、今回が初めての病理所見であった。過去の症例を含めてこれらはいずれも10日齢~3カ月齢の子山羊に発症しており、この日齢が最も発症しやすいものと考えられた。さらにすべての症例の発症時期は春先から初夏に集中していた。季節要因と疾病発生の因果関係は明らかではないが、好発する日齢と季節が一致している場合は、Mmc 感染を強く疑う必要があると考えられた。

Mmc の感染経路としては、無症状保菌山羊の導入、汚染された母山羊乳及びレゼルボアとしてのダニ (*Psoroptes cuniculi* 及び *Raillietia capri*) の存在が指摘されている [16]。今回、A 農場では発症の約5カ月前に成山羊の導入があり、B 農場では約2カ月前に母山羊の導入が確認されたが、残念ながらこれらの導入山羊

の保菌実態は調査できなかった。2006年の県内2例目の発症例において、当該発生農場を含めた飼養山羊を対象とした Mmc の ELISA による過去5年間の遡り調査では、抗体陽性率は2002年：19%、2004年：52%、2005年：52%、2006年：66%と経年的に上昇している (第37回 沖縄県獣医学会)。今後県内の山羊飼養農場を対象とした Mmc の抗体調査を行い、その浸潤状況の把握に努めたいと考えている。

マイコプラズマは単純な細胞構成で複雑な代謝経路をもたないため、有効薬剤が限定的である反面、伝達性の薬剤耐性株も出現しにくいと考えられている [17]。伝染性無乳症の治療には、テトラサイクリン系、マクロライド系及びニューキノロン系の薬剤が有効であるとされる [18]。なかでもマクロライド系薬剤であるタイロシンの20mg/kg、2回/日の筋肉内注射が推奨されている [19]。分離菌を用いた薬剤感受性試験でもタイロシンの MIC は0.016 $\mu\text{g/ml}$ でありきわめて高い感受性が認められた。これまで Mmc の薬剤感受性に関する報告は見あたらないが、今回の分離株に関しては、上記の推奨薬剤はどれも効果があるものと考えられた。また今回分離された4株はすべて同じ MIC 値であり、同一クローン由来である可能性も示唆される。この点については疫学的にも重要と考えられるので、菌株の詳細な解析を実施したいと考えている。

一般的に小規模な山羊農家において飼料添加剤や抗菌薬による治療が行われることはほとんどなく、今回の薬剤感受性試験の結果からも耐性株は出現していないものと考えられた。今回発症した症例1, 2の子山羊では治療にベンジルペニシリン・ジヒドロストレプトマイシンの合剤が使用されていた。しかし元来ペニシリン系薬剤はマイコプラズマに効果はなく、またストレプトマイシンも薬剤感受性試験の成績から効果が期待されないものであったため、子山羊に対して治療効果がなかったものと考えられた。Mmc 感染症の国内発生事例はきわめて少なく、また Mmc 感染症は発症までの潜伏期間が短いため、早期診断が難しく、治療効果のある抗菌薬の投与が遅れる可能性がある。今回本症例から得られた新たな知見が、今後の治療方針の一助になれば幸甚である。

稿を終えるにあたり、マイコプラズマの分離同定法について、多くの助言をいただいた(独)農研機構動物衛生研究所疾病対策センター 小林秀樹博士に深謝する。

引用文献

- [1] Manso-Silván L, Vilei EM, Sachse K, Djordjevic SP, Thiaucourt F, Frey J: *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, Int J Syst Evol

- Microbiol, 59, 1353-1358 (2009)
- [2] DaMassa AJ, Wakenell PS, Brooks DL : Mycoplasmas of goats and sheep, J Vet Diagn Invest, 4, 101-113 (1992)
- [3] 小林秀樹 : Mycoplasma mycoides cluster (Mycoides cluster) の分類, 日本マイコプラズマ学会雑誌, 24, 9-15 (1997)
- [4] 潘 英仁 : ヤギとヒツジのマイコプラズマ, マイコプラズマとその実験法, 興水 馨, 清水高正, 山本孝史編, 第1版, 131-142, 近代出版, 東京 (1988)
- [5] Bascunāna CR, Mattsson JG, Bölske G, Johansson K : Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR, J Bacteriol, 176, 2577-2586 (1994)
- [6] Cháves González YR, Ros Bascunāna C, Bölske G, Mattson JG, Fernández Molina C, Johansson KE : In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR, Vet Microbiol, 47, 183-190 (1995)
- [7] Kobayashi H, Morozumi T, Munthali G, Mitani K, Ito N, Yamamoto K : Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets, Antimicrob Agents Chemother, 40, 1030-1032 (1996)
- [8] Vilei EM, Korczak BM, Frey J : *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies, Vet Res, 37, 779-790 (2006)
- [9] Kobayashi H, Munthali G, Kaiga M, Morozumi T, Mitani K, Ito N, Shiono H, Yamamoto K : Genetic Properties of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* LC strains isolated from a goat in Japan in 1991, J Vet Med Sci, 595-598 (1996)
- [10] DaMassa AJ, Brooks DL, Adler HE : Caprine Mycoplasmosis: widespread infection in goats with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type), Am J Vet Res, 44, 322-325 (1983)
- [11] Ruhnke HL, Rosendal S, Goltz J, Blackwell TE : Isolation of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* from polyarthritis and mastitis of goats in Canada, Can Vet J, 24, 54-56 (1983)
- [12] East NE, Damassa AJ, Logan LL, Brooks DL, McGowan B : Milkborne outbreak of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* infection in a commercial goat herd, J Am Vet Med Assoc, 182, 1338-1341 (1983)
- [13] Damassa AJ, Brooks DL, Holmberg CA : Induction of Mycoplasmosis in goat kids by oral inoculation with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, Am J Vet Res, 47, 2084-2089 (1986)
- [14] Hernandez L, Lopez J, St-Jacques M, Ontiveros L, Acosta J, Handel K : *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* associated with goat respiratory disease and high flock mortality, Can Vet J, 47, 366-369 (2006)
- [15] Schumacher VL, Hinckley L, Liao X, Tulman E, Geary SJ, Smyth JA : Meningitis caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in a goat, J Vet Diagn Invest, 23, 565-569 (2011)
- [16] Cottew GS, Yeats FR : Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats, Aust Vet J, 59, 77-81 (1982)
- [17] 小林秀樹 : 牛・豚由来マイコプラズマのマクロライド耐性機構と耐性株の現状, 動物用抗菌剤研究会報, 32, 25-31 (2010)
- [18] 江口正志 : 伝染性無乳症, 獣医感染症カラーアトラス, 見上 彪編, 第2版, 252-253, 文永堂, 東京 (2006)
- [19] Matthews J : Diseases of the mammary gland, Diseases of the Goat, Matthews J, 3rd ed, 221, Blackwell Publishing Ltd, Oxford (2009)

Three Cases of Caprine Polyarthrititis, Pyogenic Bronchopneumonia and Purulent Keratitis Infections in Goat Kids due to *Mycoplasma mycoides* Subspecies *Capri*

Satoko NAKAO¹⁾, Miho ARAKI¹⁾, Osamu TSUHA²⁾, Wakako TAKAGI²⁾, Yoshito KATAGIRI³⁾,
Mari NAKAMURA³⁾, Hideki NIKADORI³⁾ and Masanao MATAYOSHI^{3)†}

1) *Okinawa Prefectural Institute of Animal Health, 112 Kohagura, Naha, 900-0024, Japan*

2) *Okinawa Hokubu Livestock Hygiene Service Center, 4606-4 Nago, Nago, 905-0012, Japan*

3) *Okinawa Chuou Livestock Hygiene Service Center, 2505 Oozato, Oozato, Nanjo, 901-1202, Japan*

SUMMARY

Three goat kids aged 24 days to three months old at two goat-breeding farms in Okinawa Prefecture, Japan were from April to May 2012 examined for the diagnosis of respiration and arthritic diseases. Polyarthrititis, pleuropneumonia and keratitis were observed via necropsy. The major histopathological lesions shown were as follows – case 1: infiltration of macrophages in the alveoli with thick alveolar septa; case 2: suppurative fibrinous arthrititis in the carpal joint and tarsal joint; case 3: suppurative bronchopneumonia in the lung lobes and purulent keratitis. *Mycoplasma* spp. were isolated from all three of the lungs, several joints and synovial fluids in the kids. The mycoplasma isolates were identified as *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* (Mmc) by the biological properties, PCR and PCR-RFLP analysis. Immunohistochemically, Mmc antigens were detected in the joint cavities, bronchi, alveoli and cornea. The cases were diagnosed as polyarthrititis, pyogenic bronchopneumonia and purulent keratitis by Mmc infections.

— Key words : bronchopneumonia, contagious agalactia, goat, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, polyarthrititis.

† Correspondence to (Present address) : Masanao MATAYOSHI (OKINAWA Culinary Institute)

1-18-7 Kume, Naha, 900-0033, Japan

TEL 098-861-7100 FAX 098-867-3096 E-mail : tom-nao@nirai.ne.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 539 ~ 544 (2013)