

## 沖縄本島でみられた山羊における *Mycoplasma ovipneumoniae* 感染症の 1 例

中尾聡子<sup>1)†</sup> 仲村真理<sup>1)</sup> 荒木美穂<sup>2)</sup> 杉山明子<sup>3)</sup>

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

2) 沖縄県八重山家畜保健衛生所 (〒907-0243 石垣市宮良 1-2)

3) 沖縄県中央家畜保健衛生所 (〒901-1208 南城市大里字平良 2505)

(2016年9月9日受付・2017年2月3日受理)

### 要 約

沖縄本島で山羊 12 頭を飼養する肉用繁殖山羊農場において、発咳と起立困難を主徴とする 1 頭の山羊の病性鑑定を行った。剖検では、肺の肝変化と腫大、心嚢水貯留及び腸間膜リンパ節の出血と腫大がみられた。組織学的には、肺の気管支周囲のリンパ濾胞過形成、気管支粘膜過形成を伴う化膿性気管支肺炎及び間質性肺炎が認められた。細菌学的には、肺から *Mycoplasma ovipneumoniae* と *Bibersteinia trehalosi* が分離された。免疫組織化学的検査に供するため、分離された *M. ovipneumoniae* を用いて免疫血清の作製を試みた。代謝阻止試験による力価測定の結果、1,280 倍の高い力価が得られ、免疫組織化学的検査では病変部に *M. ovipneumoniae* の陽性抗原が認められた。以上のことから、本症例は *M. ovipneumoniae* と *B. trehalosi* による混合感染症と診断した。

——キーワード：山羊，免疫組織化学的染色，*Mycoplasma ovipneumoniae*。

-----日獣会誌 70, 303～307 (2017)

*Mycoplasma ovipneumoniae* はおもに羊に呼吸器症状を引き起こし、羊の肺からしばしば分離される [1, 2]。国内における羊の抗体保有状況は北海道、青森及び岩手の 246 頭での調査で 64 頭 (26%) であったことが報告されている [3]。一方、山羊にもまれに呼吸器症状を引き起こすことが知られており [4]、山羊への病原性も確認されている [5]。しかし国内において、1989 年まで *M. ovipneumoniae* による症例や分離報告はない [6]。今回、沖縄本島中部の肉用繁殖山羊農場において、山羊の肺炎を主徴とする症例に遭遇し、病理組織学的及び細菌学的に *M. ovipneumoniae* と *Bibersteinia trehalosi* (*Pasteurella trehalosi*) の混合感染症と診断されたため、その概要を報告する。

### 材料及び方法

**発生農場：**発生農場は沖縄県中部地域の肉用山羊繁殖農場で雄山羊 8 頭、雌山羊 2 頭、子山羊 2 頭の合計 12 頭を飼養していた。当該農場では近年外部から山羊の導入歴はなく、自家育成を行っていた。2014 年 1 月から

成山羊 5 頭が死亡しており、2014 年 7 月に 8 カ月齢の山羊 1 頭が死亡、同じく 8 カ月齢の当該雌山羊 1 頭が呼吸器症状と食欲不振を呈し、起立不能となったため、予後不良と判断し、麻酔薬 (ソムノペンチル、共立製薬株、東京) 投与後に放血殺を行い病性鑑定に供した。当該山羊はペニシリン系製剤 (動物用アミペニックス、共立製薬株、東京) とマクロライド系製剤 (タイロシン注 200、共立製薬株、東京) で 5 日間治療されており、外部寄生虫対策としてイベルメクチン製剤 (アイボメック®トピカル、メリアル・ジャパン株、東京) を 2 カ月ごとに使用されていた。

**一般細菌検査：**主要臓器を 5% 羊血液寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株、東京) に接種し、37℃ で 48 時間、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

**マイコプラズマ検査：**常法 [7] に基づき肺病変部を変法 Hayflick 寒天培地及び BHL 寒天培地に接種し、37℃ で 10 日間、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。マイコプラズマ様コロニーについて、BHL 液体培地の併用によりクローニングを行った。分離株の同定では、16S rRNA を

† 連絡責任者：中尾聡子 (沖縄県北部家畜保健衛生所)

〒905-0012 名護市名護 4606-4 ☎ 0980-52-2939 FAX 0980-53-3311

E-mail : oohashsa@pref.okinawa.lg.jp

コードする遺伝子のシーケンスで行った。すなわち、純培養した菌液を核酸自動抽出機 (Magstration System 12GC Plus, プレジョン・システム・サイエンス(株), 千葉) を用いて DNA 抽出した後, 16S rRNA 遺伝子の一部を PCR にて増幅した。プライマーはすべての真正細菌の 16S rRNA に共通な配列から選出した Pag313 : 5' CACACTGGGACTGAGACACGG3' 及び Pag1128 : 5' AAGGATAAGGGTTGCGTCTCG3' を用いた。増幅産物約 800bp のうち確実な部分の 650bp について塩基配列を決定した。得られた配列の相同性解析は National Center for Biotechnology Information (NCBI) ウェブサイトの BLAST サーチで実施した。

**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, 肺由来の 3 株について, 微量液体希釈法により行った [6]。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 Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) とした。なお, 薬剤対照参照菌株として *M. ovipneumoniae* ATCC29419 株を用いた。

**兔免疫血清の作製:** 肺由来の 1 株について, BHL 液体培地で 5 日間増菌した菌液を PBS で 3 回洗浄し, 免疫抗原とした。兎は 2 カ月齢の日本白色家兎 (九動(株), 佐賀) 2 匹を使用した。初回及び 2 回目の免疫は免疫抗原 1.5ml と完全フロイントアジュバント (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 1.5ml を, 三方活栓でつないだ 2 本のロックタイプシリンジでよく混合し, 乳化した免疫抗原を兎の背最長筋部 4 カ所に接種した。その後, 免疫菌液 1ml を外縁耳静脈へ接種し, 十分な力価が得られるまで接種した。接種後, 外縁耳静脈から試採血した血清を用いて力価測定に供した。力価の測定は既報に基づき, 肺由来株を用い, 代謝阻止試験法にて行った。実験動物の取り扱いについては, 沖縄県家畜衛生試験場の動物実験ガイドライン (指針) に沿って動物に苦痛を与えないように実験を行った。

**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。肺については, グラム染色と免疫組織化学的染色を行った。免疫組織化学的染色は右肺病変部から分離した *M. ovipneumoniae* 株で免疫した家兎血清を用い, ポリマー法 (ニチレイバイオサイエンス(株), 東京) により行った。陰性コントロールとして免疫前の家兎血清を用いた。

## 成 績

**病理解剖検査:** 右肺の肝変化と腫大が顕著であり (図



図 1 症例の肺  
右肺の顕著な腫大と赤色肝変化が認められる。

1), 気管に泡沫性物質の貯留が認められた。その他, 心臓には心嚢水が 10ml 程度貯留しており, 腸間膜リンパ節の腫大及び出血が認められた。

**病理組織学的検査:** 右肺では肺胞への好中球及びマクロファージ浸潤, 気管支粘膜の増生, 気管支周囲にリンパ濾胞の過形成及び線維芽細胞がみられた。また変性した好中球が充満し膿瘍を形成, 肺胞にグラム陰性の菌塊を伴い, 化膿性気管支肺炎及び間質性肺炎が認められた (図 2)。

今回作製した抗 *M. ovipneumoniae* 兎血清による免疫組織化学的染色では, 病変部のおもに気管支上皮細胞表面に陽性反応が認められた (図 3)。陰性コントロールにおいて陽性反応は認められなかった。

**一般細菌検査:** 肺から *B. trehalosi* が分離され, 脳及び心臓から *Staphylococcus aureus* が分離された。

**マイコプラズマ検査:** 培養 10 日目に肺から大小不同の微小なマイコプラズマ様菌が分離されたが (図 4), 当該菌は発育速度が遅く, マイコプラズマに特徴的な fried egg 状のコロニーは形成しなかった。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であり, フィルムスポットを形成されなかった。マイコプラズマ様分離株は 16S rRNA をコードする遺伝子のシーケンスにより Accession number *M. ovipneumoniae* 06OR03.EU265779 と 100% 一致した。

**薬剤感受性試験:** 分離された *M. ovipneumoniae* の最小発育阻止濃度 (MIC) はエリスロマイシン 8~32  $\mu\text{g/ml}$ , タイロシン 0.0125  $\mu\text{g/ml}$  以下, リンコマイシン 0.25~0.5  $\mu\text{g/ml}$ , チアムリン 0.125~0.5  $\mu\text{g/ml}$ , オキシテトラサイクリン 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , エンロフロキサシン 0.125  $\mu\text{g/ml}$  以下であり, リンコマイシンを除き, いずれの薬剤も ATCC29419 株と同等の値であった。エリスロ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。

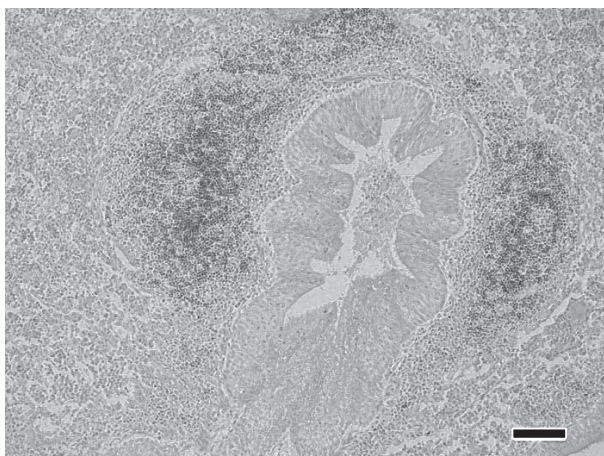


図2 肺の組織像  
気管支周囲のリンパ濾胞過形成，気管支粘膜増生，肺胞に好中球・マクロファージの浸潤が認められる (HE染色 Bar=100µm).

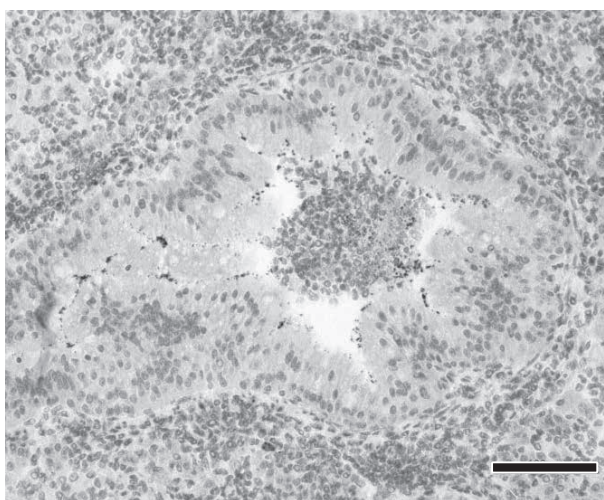


図3 肺病変部における抗 *M. ovipneumoniae* 家兎血清を用いた免疫組織化学的染色像  
気管支粘膜上皮細胞表面に陽性反応が認められる (Bar=100µm).

### 考 察

本症例では右肺全葉の肝変化と腫大が顕著であり，病理組織学的検査結果からマイコプラズマの関与が疑われた。当該農場では2012年に *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc) による伝染性無乳症の発生がみられており，本症例においても Mmc の関与が疑われた。Mmc は通常2日以内に fried egg 状のコロニーを形成するが，*M. ovipneumoniae* は他のマイコプラズマと比べて発育速度が遅く，マイコプラズマに典型的なコロニーを形成しない。本症例では病理組織学的検査成績を受けて，マイコプラズマの分離培養を長期間継続した結果，培養10日目に大小不同の微小なコロニーが確認された。単

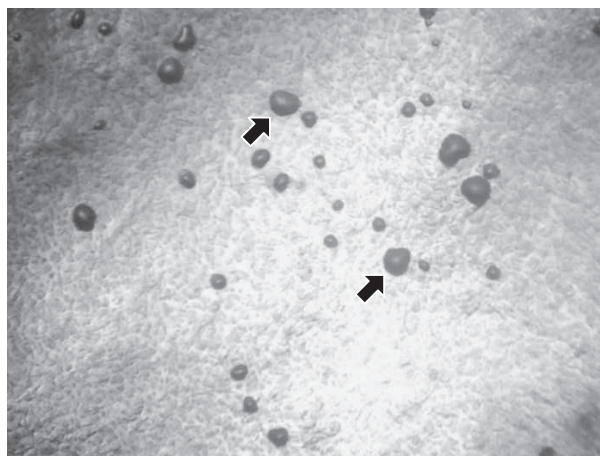


図4 分離された *M. ovipneumoniae* のコロニー性状 (矢印).

離したコロニーは液体培地中で増菌がみられたため，菌種同定のためにシーケンスを行ったところ，*M. ovipneumoniae* と一致したことから，本症例において *M. ovipneumoniae* の感染を確認した。

めん羊や山羊のマイコプラズマ感染症は病性鑑定マニュアル (全国家畜衛生職員会，第4版) によると，*Mycoplasma agalactiae*，*M. capricolum* subsp. *capricolum*，Mmc，及び *M. putrefaciens* による伝染性無乳症と *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* による山羊伝染性胸膜肺炎が知られている。一方，*M. ovipneumoniae* による感染症はこれまで国内での症例報告がほとんどなく，一般的にあまり知られていない。しかし，海外ではおもに羊に肺炎や乳房炎を引き起こすマイコプラズマとして広く知られており [8-10]，山羊への病原性も確認されている [5]。*M. ovipneumoniae* は健康な羊から分離されることもあり，羊での保菌率は高いとされている [11]。しかし，若齢の羊に感染すると発熱や気管支肺炎を引き起こすことがあり，さらに混合感染が起こると重篤化し，致死性肺炎を引き起こす [8]。

今回われわれは山羊の肺病変から *M. ovipneumoniae* を分離することに成功した。また，肺胞にグラム陰性桿菌を伴う化膿性気管支肺炎及び間質性肺炎を確認し，病変部の免疫組織化学的染色により *M. ovipneumoniae* に対する陽性反応を確認したことから，本症例を *M. ovipneumoniae* と *B. trehalosi* の混合感染症と診断した。また，脳及び心臓から *S. aureus* が分離されているが，病理組織所見で菌体や本菌による病変は確認されていないため，本症例への関与はないと考えられた。沖縄県では山羊のマイコプラズマ感染症として Mmc による伝染性無乳症の発生報告があり，発症山羊はいずれも3カ月齢以内の子山羊である [12]。本症例において成山羊5頭の死亡原因は不明であるが，病性鑑定に供した山羊は8カ月齢であり，山羊のマイコプラ

ズマ感染症は子山羊が最も発症しやすいものと考えられた。マイコプラズマ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の存在が指摘されている [13]。今回、本農場では発症前に山羊の導入はなく、同居山羊の保菌実態は調査できていないため、感染経路については不明である。しかし本農場では2年前に Mmc による伝染性無乳症が発生しており、マイコプラズマの存在が確認されているため、今後も注視していきたい。山羊のマイコプラズマ感染症は国内でも症例報告が少ないため、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。本症例は国内初の山羊の *M. ovipneumoniae* 感染症として貴重である。

稿を終えるに当たり、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(国研)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 疾病対策部 小林秀樹博士に深謝する。

#### 引用文献

- [1] Alley MR, Quinlan JR, Clarke JK : The prevalence of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in the respiratory tract of sheep, NZ Vet J, 23, 137-141 (1975)
- [2] Stipkovits L, Belák S, Pálfi V, Túry E : Isolation of *Mycoplasma ovipneumoniae* from sheep with pneumonia, Acta Vet Acad Sci Hung, 25, 267-273 (1975)
- [3] Giangaspero M, Nicholas RA, Hlusek M, Bonfini B, Osawa T, Orusa R, Tatami S, Takagi E, Moriya H, Okura N, Kato K, Kimura A, Harasawa R, Ayling RD : Seroepidemiological survey of sheep flocks from Northern Japan for *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma agalactiae*, Trop Anim Health Prod, 44, 395-398 (2012)
- [4] Adler HE, Brooks DL : *Mycoplasma* infections-the cause of arthritis, mastitis and pneumonia of dairy goats in the United States, In Proceedings of the third international conference on goat production and disease, Scottsdale, Arizona, Dairy Goat Publishing Co, 212-216 (1982)
- [5] Goltz JP, Rosendal S, Mccraw BM, Ruhnke HL : Experimental studies on the pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* for the respiratory tract of goats, Can J Vet Res, 50, 59-67 (1986)
- [6] 清水高正 : マイコプラズマ属, 獣医微生物学, 梁川 良, 笹原二郎, 坂崎利一, 波岡茂郎, 清水悠紀臣, 伊沢久夫, 大林正士, 長谷川篤彦編, 320-344, 養賢堂, 東京 (1989)
- [7] 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)
- [8] Masalski N, Ivanov I, Dikova TS, Pavlov N : Respiratory diseases in sheep due to *Mycoplasma ovipneumoniae*, Vet Med Nauki, 19, 8-14 (1982)
- [9] Bocklisch H, Pfützner H, Zepezauer V : Natural and experimental infections of lambs with *Mycoplasma ovipneumoniae*, Arch Exp Veterinarmed, 43, 755-761 (1989)
- [10] Jones GE : The pathogenicity of some ovine or caprine mycoplasmas in the lactating mammary gland of sheep and goats, J Comp Pathol, 95, 305-318 (1985)
- [11] Brogden KA, Rose D, Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Tully JG : Isolation and identification of mycoplasmas from the nasal cavity of sheep, Am J Vet Res, 49, 1669-1672 (1988)
- [12] 中尾聡子, 荒木美穂, 津波 修, 高木和香子, 片桐慶人, 仲村真理, 荷川取秀樹, 又吉正直 : 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, 日獣会誌, 66, 539-544 (2013)
- [13] Cottew GS, Yeast FR : Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats, Aust Vet J, 59, 77-81 (1982)

*Mycoplasma ovipneumoniae* Infection in a Goat on Okinawa Island

Satoko NAKAO<sup>1)†</sup>, Mari NAKAMURA<sup>1)</sup>, Miho ARAKI<sup>2)</sup> and Akiko SUGIYAMA<sup>3)</sup>

- 1) HOKUBU Livestock Hygiene Service Center of Okinawa Prefecture, 4606-4 Nago, Nago, 905-0012, Japan
- 2) YAEYAMA Livestock Hygiene Service Center of Okinawa Prefecture, 1-2 Miyara, Ishigaki, 907-0243, Japan
- 3) Livestock Hygiene Service Center of Okinawa Prefecture, 2505 Taira, Ohzato, Nanjyo, 901-1208, Japan

SUMMARY

A goat with clinical signs of cough and dysstasia on a goat-breeding farm in Okinawa Prefecture that had bred 12 goats was examined. At the necropsy, hyperemia and swelling of the lungs, retention of pericardial fluid, and bleeding and swelling of the mesenteric lymph nodes were observed. Histopathological examinations revealed lymphoid follicular hyperplasia around the bronchus, suppurative bronchial pneumonia and interstitial pneumonia with hyperplasia of the bronchial mucosa. *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Bibersteinia trehalosi* were isolated from the lung lesions. Rabbit immune serum against *M. ovipneumoniae* was prepared using the isolate from the present case. In the metabolic inhibition test, the titer was estimated to be 1,280. Immunohistochemically, *M. ovipneumoniae* antigens were detected in the lesional areas of the lung. Based on these findings, the case was diagnosed as mixed infections of *M. ovipneumoniae* and *B. trehalosi*.

— Key words : goat, immunohistochemical staining, *Mycoplasma ovipneumoniae*.

† Correspondence to : Satoko NAKAO (HOKUBU Livestock Hygiene Service Center of Okinawa Prefecture)

4606-4 Nago, Nago, 901-0012, Japan

TEL 0980-52-2939 FAX 0980-53-3311 E-mail : oohashsa@pref.okinawa.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 303 ~ 307 (2017)