

Mycoplasma gallisepticum 1RF株の気嚢内人工感染による 初生ヒナに対する virulence について

村田昌芳・藤井英明・矢野真二・三谷克之輔*・徳永三則*

広島大学生物生産学部 衛生微生物学講座

* 同附属農場

1980年4月30日 受理

On the Virulence of *Mycoplasma gallisepticum* Strain 1RF Artificially Induced into the Air Sac of Day-Old Chicks

Masayoshi MURATA, Hideaki FUJII, Shinji YANO,

Katsunosuke MITANI* and Mitsunori TOKUNAGA*

Department of Microbiology and Hygiene, and *Experimental Farm, Faculty of
Applied Biological Science, Hiroshima University, Fukuyama 720

(Figs. 1-9, Tables 1-11)

鶏の呼吸器性マイコプラズマ病^{2,5,15,20,24,31,32})は、*Mycoplasma gallisepticum* (MG)の感染によつて起こる疾患である。本菌の単独感染では鶏は通常軽度の呼吸器症状しか起こさないか、または殆ど無症状で経過する。

しかし、MG感染ヒナが *Escherichia coli*^{22,24}), *Haemophilus paragallinarum*^{8,11,22}) または種々のウイルス例えば infectious bronchitis virus^{1,22}), Newcastle disease virus^{22,25,26}), reovirus²²), および fowl pox virus¹⁹) などに曝露された場合に発症し、鼻汁の排出、咳、異常呼吸音などを呈し、鼻腔、眼窩下洞、気管および肺などに病変が見られ、さらにこの様な状況下では多くのヒナに気嚢炎 (air sacculitis) が認められる。その結果、病鶏は産卵能力、発育などの低下をきたすほか孵化率低下、弱雛増多、飼料効率低下、衛生管理費の増大など直接間接に養鶏経営に大きな被害を及ぼす。

また本病の発生には、以上のような他の細菌やウイルスなどの複合感染のみならず、ワクチン接種²⁵), ビタミンA欠乏飼料の給与、寒気、飼養管理失宜およびアンモニア・ガスの存在などの関連性が指摘されている。

従来、わが国におけるヒナのMG実験感染用菌株としては、村田ら¹⁷), 佐藤ら²⁵), 鈴木ら²⁷) は1RF株を用い、また吉田および国安³⁵) は同じくKP-13株を用いてきた。前述の佐藤ら²⁵) によるMG 1RF株と他の複合感染因子との関係について論じた報告以外は、現在までに本菌株の virulence または病原性に関する詳細な報告はなされていない。私どもが、今後本菌による種々のMG人工感染系を用いた実験を行う前提として、その virulence の詳細を明らかにしておく事は不可欠であると考えられた。

そこで、私どもはMG 1RF株が初生ヒナに対する virulence の程度を知る目的で本実験を行った。

材料と方法

供試ヒナ：エンヤ株式会社由来、ハバード系ブロイラー専用種の雄初生ヒナ200羽を購入して、餌付前に体重43g前後のものを120羽選び実験に供した。

飼料：市販ブロイラー肥育前期用 (日本農産工業株式会社製、ジョイスター) を使用した。

ヒナ飼育法：実験期間を通し平面式金網床育雛器を用い、2週令までは保温飼育 (35°C) し、それ以降

4週令までは室温で飼育した。

実験群別：実験ヒナは1群20羽とし、第1群はMG非接種対照、第2群はMG 1RF株の 4×10^6 ccu*接種、第3群は同菌の 4×10^2 ccu接種、第4群は同菌の 4×10^3 ccu接種、第5群は同菌の 4×10^4 ccu接種、第6群は同菌の 4×10^5 ccu接種、計6群120羽とした。

供試菌：供試菌は農林省家畜衛生試験場から分与を受けた *Mycoplasma gallisepticum* 1RF株²⁶⁾を使用した。本菌株の抗生物質感受性については村田ら(1980)¹⁸⁾が報告しているとおおり、最小発育阻止濃度(MIC)は tylosin (TS)において $0.03 \mu\text{g}/\text{ml}$, erythromycin (EM)で $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$, tetracycline (TC)で $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$, spectinomycin (SPCT)および chloramphenicol (CP)で $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

MG人工感染法：栄研化学社製のニワトリPPLO液体培地^{15,16)}で、供試菌株を 37°C 、48時間培養した原液と、 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ まで5段階の希釈液を調製し、各実験ヒナ群ごとに1羽当たり 0.4 ml ずつ(約 $4 \times 10^6 \text{ ccu} \sim 4 \times 10^5 \text{ ccu}$ のMGを含む)、右後胸部気嚢内に接種した。

観察項目：1週令時の測定により各群ヒナの平均増体量と飼料摂取量等を比較した。毎日、ヒナの臨床症状、死亡率等について4週間観察した。また、全実験群につき1週ごとに各群5羽ずつのヒナを心臓採血したのち、空気栓塞により殺し、剖検した。なお、観察時頻死のヒナはその時点で殺し、剖検した。剖検時には特に気管、気嚢ならびに心、肝、肺、腸における肉眼病変の有無を調べたのち、気嚢および気管からのMG分離、さらにMG血清凝集素価の推移についても調べた。

肉眼病変判定法：肉眼病変³⁸⁾の程度は、気嚢に関してはMG接種側気嚢に肥厚、混濁がみられたものを+、チーズ様滲出物がみられたものを++、全面にチーズ様滲出物がみられ、同時にMG非接種側気嚢が肥厚、混濁しているものを+++、さらに両側気嚢全面にチーズ様滲出物がみられ、線維素性心膜炎を併発したものを++++と記録した。なお病変陰性の場合には、“-”と記録した。

病理組織学的検査：典型的な頸部捻転ならびに脚麻痺のみられたヒナについては、脳の病理組織学的検査³⁷⁾を、通常の方法に従い組織をホルマリン固定後ヘマトキシリン・エオジン染色して調べた。

MG分離法：MG分離には気管および左右後胸部気嚢粘液を滅菌綿棒またはタンポンで拭い、前述の液体培地を 2 ml ずつ分注した小試験管内に投入し、常法のおおりの 37°C で3代盲継代を行い、培地が黄変したものをMG分離陽性と判定した。ただし1および2週令殺のヒナでは左右両気嚢を同一の滅菌タンポンで拭い、一括してMG分離を試みた。なお、必要に応じ、黄変液体培養につきMG集落の発育を確認した。

MG血清凝集素価の測定法：各週令殺の供試ヒナの血清につき、MG試験管凝集反応を行った。その方法は下記のおおりのとおりで、まず全例について、血清希釈10および20倍でスクリーニング・テストを行い、20倍希釈で凝集陽性を示した血清については、さらに血清の2倍希釈法で凝集素価を測定した。

試験管凝集反応の方法¹⁵⁾は、各希釈血清の 0.2 ml にMG急速凝集反応用菌液(日生研株式会社製)の12.5倍希釈を抗原として 0.2 ml 加え、全量を 0.4 ml とした。次いでこれを 37°C のwater bath中で2時間感作後、 4°C に1夜静置し、明瞭な特異凝集がみられたものを陽性とした。

なお、血清および抗原の希釈には0.1%アジ化ナトリウム加⁴⁾リン酸緩衝食塩液を用いた。

成 績

ヒナの臨床症状：全群全期間を通して呼吸器症状を呈したヒナはみられなかった。しかし、Table 1に示したとおりの頸部捻転、脚麻痺を主徴とするヒナ(Fig. 1, 2)が、実験開始後7日以内にそれぞれ第5群に1例(5%)、第6群に3例(15%)みられ、また8~15日令時に第6群に6例(30%)みられた。なお、この成績を実験群ごとにまとめてみると、頸部捻転および脚麻痺を示したものが第5群で1例、第6群で9例それぞれ認められた。これら頸部捻転のみられたヒナは、全て脚麻痺を併発していた(Table 1)。これらのヒナは脚麻痺の為の起立困難または不能ならびに頸部捻転の結果、重症のものでは採食不能に陥

* Colony forming unit.

り死亡した。本頸部捻転はヒナの頸部がラセン状に捻転したもので、重度の例では捻転の角度が180°に至り、その為ヒナの頭部が上下全く逆転する例もみられた (Fig. 1)。また第5群で左足間骨関節の腫脹が1例みられた (ヒナNo.99)。第6群で右足間骨関節に水腫様病変が2例みられた (ヒナNo.117, 120)。

ヒナの死亡率：第1～4群では死亡ヒナはみられなかった。しかし、Table 1に示したとおり第5群においては実験開始後7日以内に1例 (5%)、第6群においては実験開始後7日以内に3例 (15%)、以後8～14日間に5例 (25%) のヒナが死亡した。

Table 1. Incidence of the limberneck, leg weakness, and death observed in chicks of group 5 and 6.

Group of chicks	Inoculum size	Chick number	Limberneck	Leg weakness	Age in days of dead chicks
5	4×10^4 CCU	85	+	+	6
		102	+	+	4
		103	+	+	6
		104	+	+	5
		106	+	+	11
6	4×10^5 CCU	107	+	+	8
		108	+	+	9
		109	+	+	11
		110	+	+	9
		115	+	+	- 1)

1) The chick in a dying condition was killed 15 days post inoculation.

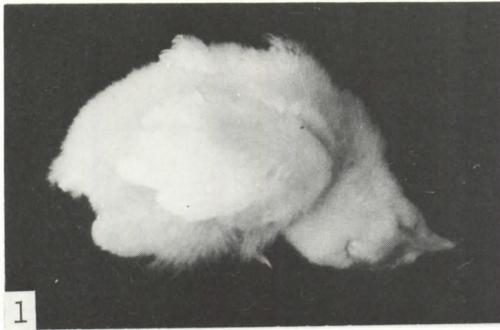


Fig. 1. Characteristic appearance of limberneck (the spiral neck brought the head upside down) in a 6-day-old chick that was killed 6 days post inoculation with 4×10^4 CCU of *M. gallisepticum* strain 1RF.

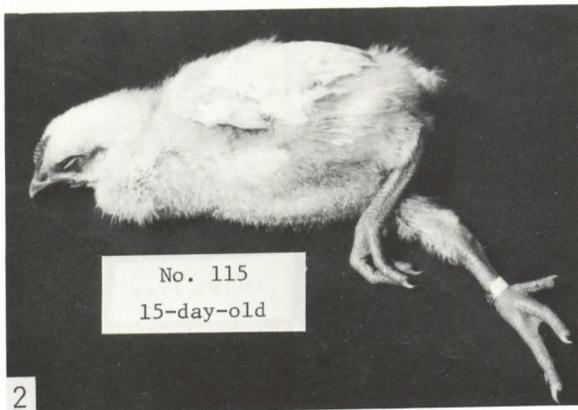


Fig. 2. Typical findings of so-called leg weakness (or leg paralysis) appeared in a 15-day-old chick that died 15 days post inoculation with 4×10^5 CCU of *M. gallisepticum* strain 1RF.

ヒナの平均増体量，平均飼料摂取量および飼料要求率：Table 2に示したとおり，餌付から1週令までの平均増体量は第1～4群に比べて第5・6群は少なく，第1群と第6群，第2群と第5・6群，第3群と第5・6群，第4群と第5・6群との間にそれぞれ5%の危険率で有意の差が認められた。第6群の平均飼料摂取量は他の群のそれに比べ少ない値を示した。第5・6群の飼料要求率は他の群のそれに比べて高い値を示した。

また，1週以降の実験期間においては，各週ごとに5羽ずつ剖検する事になり，各群のヒナ羽数が減少する為成績を出しても信頼度が低いので，以後の検討は行わなかった。

Table 2. Body weight gain, food intake, and feed conversion of chicks during day-old to one-week-old in age.

Group of chicks	Inoculum size	Mean weight of chicks (g)	Mean weight gain of chicks (g)	Mean food intake (g)	Feed conversion
1	Non-infected control	122.5 ¹⁾ 43.1 ²⁾	79.4 ± 12.1	107.2	1.35
2	4 × 10 ¹ CCU	122.6 43.2	83.4 ± 9.1	109.2	1.31
3	4 × 10 ²	124.8 43.7	81.2 ± 9.5	103.9	1.28
4	4 × 10 ³	124.9 44.1	80.8 ± 13.3	102.6	1.27
5	4 × 10 ⁴	113.1 42.3	70.7 ± 17.2	108.8	1.54
6	4 × 10 ⁵	104.7 43.1	61.4 ± 25.1	90.3	1.47

1) Mean body weight of chicks at one-week-old in age.

2) Mean body weight of chicks at day-old in age.

ヒナの肉眼病変：試験全期間における各群ヒナの肉眼病変出現率はTable 3に示したとおりである。

第1群では，全期間を通して気嚢および気管に病変がみられたヒナはなく，胸部膿胞がみられたヒナが4例（27%），肝に点状出血がみられたヒナが1例（7%），肝に巣状壊死がみられたヒナが1例（7%）であった。

第2群では，全期間を通して気嚢に病変がみられたヒナが2例（10%），気管に病変がみられたヒナが7例（35%），胸部膿胞がみられたヒナが4例（20%），気泡を伴う線維索性肝包膜炎がみられたヒナが1例（5%）であった。

Table 3. Gross lesion score of chicks in the each group through experimental period.

Group of chicks	Inoculum size	Number of chicks examined	Air sac	Trachea	The otehr organs
1	Non-infected control	15	0 ¹⁾	0	5 (33) ²⁾
2	4 × 10 ¹ CCU	20	2 (10)	7 (35)	5 (25)
3	4 × 10 ²	20	5 (25)	8 (40)	3 (15)
4	4 × 10 ³	20	6 (30)	9 (45)	7 (35)
5	4 × 10 ⁴	20	11 (55)	15 (75)	9 (45)
6	4 × 10 ⁵	20	16 (80)	13 (65)	6 (30)

1) Number of chicks positive for gross lesions.

2) Percentage of chicks which gross lesions were observed.

第3群では、全期間を通して気嚢に病変がみられたヒナが5例（25%）、気管に病変がみられたヒナが8例（40%）、胸部膿胞がみられたヒナが3例（15%）であった。

第4群では、全期間を通して気嚢に病変がみられたヒナが6例（30%）、気管に病変がみられたヒナが9例（45%）、胸部膿胞がみられたヒナが6例（30%）、胸部皮下および肝に点状出血がみられたヒナが1例（5%）であった。

第5群では、全期間を通して気嚢に病変がみられたヒナが11例（55%）、気管に病変がみられたヒナが15例（75%）、胸部膿胞がみられたヒナが8例（40%）、肝に点状出血がみられたヒナが1例（5%）であった。

第6群では、全期間を通して気嚢に病変がみられたヒナが16例（80%）、気管に病変がみられたヒナが13例（65%）、胸部膿胞がみられたヒナが5例（25%）、肝に点状出血がみられたヒナが1例（5%）であった。

頸部捻転または脚麻痺を伴ったヒナの肉眼病変：頸部捻転症状のみられたヒナ（Table 1）の脳、および脚麻痺のみられたヒナの坐骨神経、関節、足蹠についても詳細に剖検を行った。その結果、頸部捻転のみられた殆ど全例の脳では、大脳皮質の黄白色軟化・融解、水腫様肥大、部分的なクモ膜下出血などが認められた（Fig. 3,4）。

また脚麻痺のみられたヒナについては、脚の各関節の異常や、剖検変状、または特に坐骨神経の腫大等についても調べたが著変はみられなかった。

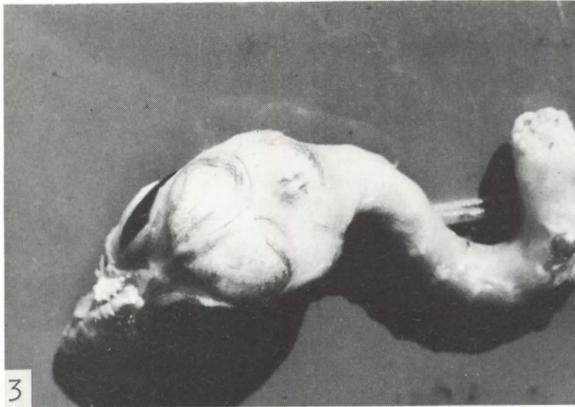


Fig. 3. Subarachnoid hemorrhages of a 15-day-old chick with limberneck killed 15 days post inoculation with 4×10^5 CCU of *M. gallisepticum* strain 1RF.

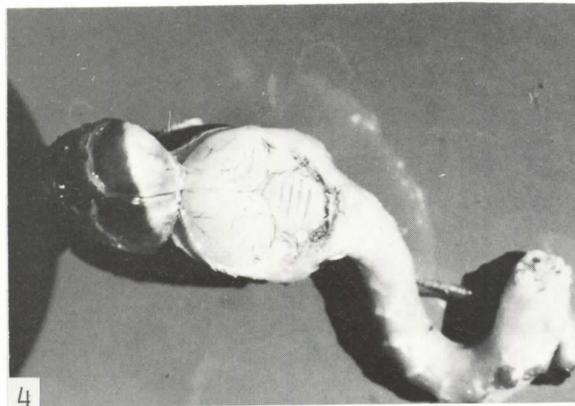


Fig. 4. Encephalomalacia and edematous swelling of the cerebral cortex, and partial hemorrhages in the subarachnoid of a chick which was shown in Fig. 3.

頸部捻転ヒナ脳の病理組織学的所見：典型的な頸部捻転ならびに脚麻痺のみられたヒナ2例（ヒナNo.85および115）の脳について、病理組織学的検討を行った結果、下記の所見が認められた。認められた病変の主なものは、大脳皮質の壊死巣（Fig. 5）、小脳プルキンエ細胞の変性脱落ならびに神経細胞層の粗鬆化（Fig. 6）、血管周囲性神経組織の類壊死病変（Fig. 7）、わずかに認められた血管の炎症反応（Fig. 8）、皮質神経細胞の濃縮（Fig. 9）などである。

以上、一般に炎症性変化は全くみられず、変性壊死病変のみが目立った。

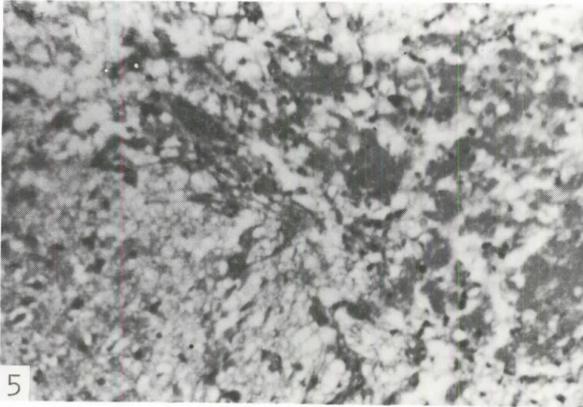


Fig. 5. Necrotic foci in the cerebral cortex of a 15-day-old chick killed 15 days post inoculation with 4×10^5 CCU of *M. gallisepticum* strain 1RF. H & E stain, $\times 232$.

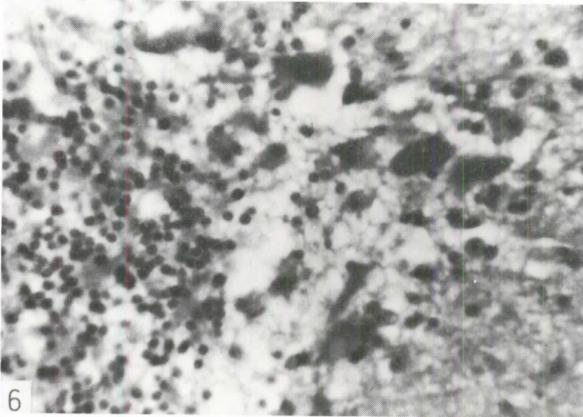


Fig. 6. Degeneration and disappearance of Purkinje's cells, and loosening of ganglion cell layer in the cerebellum of a 15-day-old chick killed 15 days post inoculation with 4×10^5 CCU of *M. gallisepticum* strain 1RF. H & E stain, $\times 464$.



Fig. 7. Necrobiosis in nervous tissue surrounding blood vessels in the cerebral cortex of a 15-day-old chick killed 15 days post inoculation with 4×10^5 CCU of *M. gallisepticum* strain 1RF. H & E stain, $\times 116$.

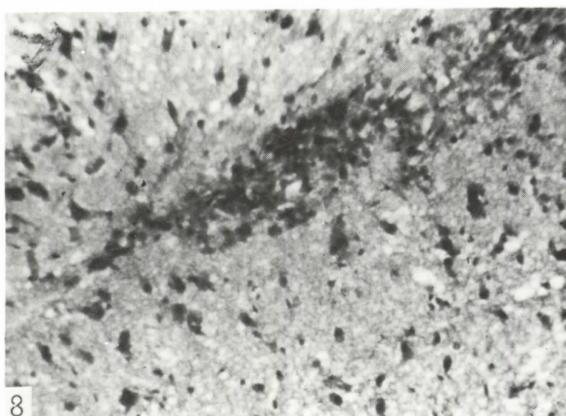


Fig. 8. Slight inflammatory reactions of blood vessels observed in the brain of a 15-day-old chick killed 15 days post inoculation with 4×10^5 CCU of *M. gallisepticum* strain 1RF. H & E stain, x232.

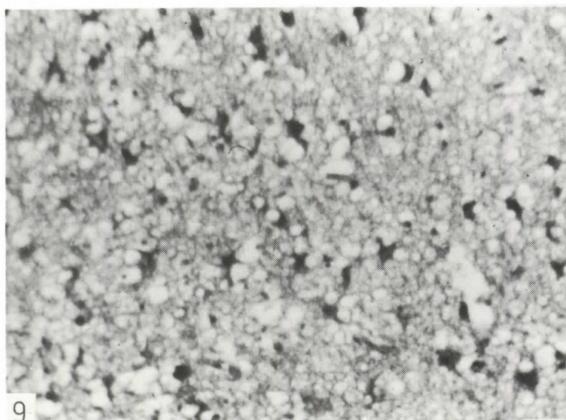


Fig. 9. Contracted nerve cells in the cerebral cortex of a 15-day-old chick killed 15 days post inoculation with 4×10^5 CCU of *M. gallisepticum* strain 1RF. H & E stain, x232.

MG分離：試験全期間中の各群ヒナからのMG分離率のまとめはTable 4に示したとおりである。

第1群では、1週令殺のヒナではMG分離を試みなかった。その後2～4週令時における各部位からのMG分離は、全例陰性であった。

Table 4. Recovery of *M. gallisepticum* from chicks in the each group through experimental period.

Group of chicks	Inoculum size	Number of chicks examined	Air sac			Trachea
			Both sides ¹⁾	Left ²⁾	Right ²⁾	
1	Non-infected control	15	0 ³⁾	0	0	0
2	4×10 CCU	20	6 (30) ⁴⁾	6 (30)	6 (30)	18 (90)
3	4×10^2	20	7 (35)	6 (30)	5 (25)	20 (100)
4	4×10^3	20	9 (45)	5 (25)	7 (35)	19 (95)
5	4×10^4	20	10 (50)	7 (35)	10 (50)	20 (100)
6	4×10^5	20	10 (50)	5 (25)	9 (45)	20 (100)

1) Specimens collected and cultured together from both sides of the air sac of a chick.

Five and ten chicks out of group 1 and 2–6 were examined within 2 weeks post inoculation, respectively.

2) Specimens collected and cultured individually from the left and right sides of the air sac of a chick. Ten chicks per group were examined 3 and 4 weeks post inoculation, respectively.

3) Number of chicks positive.

4) Percentage positive for number of chicks examined.

第2群では、全期間を通してのMG分離は、1および2週令殺ヒナの気嚢（左右いずれか不明）から6例（30%）、左気嚢から6例（30%）、右気嚢から6例（30%）、気管から18例（90%）であった。

第3群では、全期間を通してのMG分離は、1および2週令殺ヒナの気嚢（左右いずれか不明）から7例（35%）、左気嚢から6例（30%）、右気嚢から5例（25%）、気管から20例（100%）であった。

第4群では、全期間を通してのMG分離は、1および2週令殺ヒナの気嚢（左右いずれか不明）から9例（45%）、左気嚢から5例（25%）、右気嚢から7例（35%）、気管から19例（95%）であった。

第5群では、全期間を通してのMG分離は、1および2週令殺ヒナの気嚢（左右いずれか不明）から10例（50%）、左気嚢から7例（35%）、右気嚢から10例（50%）、気管から20例（100%）、脳から1例（5%）であった。

第6群では、全期間を通してのMG分離は、1および2週令殺ヒナの気嚢（左右いずれか不明）から10例（50%）、左気嚢から5例（25%）、右気嚢から9例（45%）、気管から20例（100%）、脳から1例（5%）であった。

以上の成績をもとに実験ヒナ群からのMG分離率を調べると、5%の危険率で気嚢（左右いずれか不明）は第1群と第3～6群との間に、左気嚢は第1群と他の全群との間に、右気嚢は第1群と他の全群との間に、気管は第1群と他の全群との間にそれぞれ有意差がみられた。

ヒナ脚部からのMGおよびMS*の分離：第5群4週令殺ヒナ1例（ヒナNo.99）の腫脹がみられた左足間骨関節嚢液からMGが分離されたが、MSは分離されなかった。

第6群4週令殺ヒナで右足間骨関節に水腫様病変がみられた2例（ヒナNo.117, 120）の関節嚢液からMGが分離されたが、MSは分離されなかった**。

MG血清凝集素価：第1群ヒナのMG血清凝集反応は全例陰性で、その凝集素価の幾何平均値は<10であった。

第2群各週令殺ヒナのMG血清凝集反応についての成績は、それぞれTable 5, 10に示したとおりである。第2群の全期間を通しての凝集素価幾何平均値は、11であった。

Table 5. Progressive observation on the serum agglutinin titer of chicks in group 2.

Inoculum size 4 × 10 CCU	Chick No.	Agglutinin titer					Geometric mean of agglutinin titer
		1:10	20	40	80	160	
Age in weeks of chicks 1	21	— 1)					<10 ²⁾
	22	—					
	23	—					
	24	—					
	25	—					
2	26	—					<10
	27	—					
	28	—					
	29						
	30	—					
3	31						184
	32						
	33						
	34						
	35						
4	36						77
	37						
	38						
	39	—					
	40						

1) Agglutinin titer: <1:10.

2) The value less than ten indicates negative reaction for the diagnostic criterion of *M. gallisepticum* infection.

* *Mycoplasma synoviae*

** 胸部膿胞からのMG, MS, 一般細菌の分離は全て陰性であった。

第3群各週令殺ヒナのMG血清凝集反応についての成績は、それぞれTable 6, 10に示したとおりである。第3群の全期間を通しての凝集素価幾何平均値は、15であった。

Table 6. Progressive observation on the serum agglutinin titer of chicks in group 3.

Inoculum size 4×10^3 CCU	Chick No.	Agglutinin titer							Geometric mean of agglutinin titer
		1:10	20	40	80	160	320	640	
Age in weeks of chicks 1	41	- 1)							<10 ²)
	42	-							
	43	-							
	44	-							
	45	-							
2	46	-							11
	47	-							
	48								
	49								
3	50								70
	51								
	52								
	53								
4	54								70
	55								
	56								
	57								
4	58								70
	59								
	60								

1) Agglutinin titer: <1:10.

2) The value less than ten indicates negative reaction for the diagnostic criterion of *M. gallisepticum* infection.

第4群各週令殺ヒナのMG血清凝集反応についての成績は、それぞれTable 7, 10に示したとおりである。第4群の全期間を通しての凝集素価幾何平均値は、34であった。

Table 7. Progressive observation on the serum agglutinin titer of chicks in group 4.

Inoculum size 4×10^3 CCU	Chick No.	Agglutinin titer							Geometric mean of agglutinin titer
		1:10	20	40	80	160	320	640	
Age in weeks of chicks 1	61	- 1)							<10 ²)
	62	-							
	63	-							
	64	-							
	65	-							
2	66								320
	67								
	68								
	69								
3	70								121
	71								
	72								
	73								
4	74								35
	75								
	76								
	77								
4	78								35
	79								
	80								

1) Agglutinin titer: <1:10

2) The value less than ten indicates negative reaction for the diagnostic criterion of *M. gallisepticum* infection.

第5群各週令殺ヒナのMG血清凝集反応についての成績は、それぞれTable 8, 10に示したとおりである。第5群の全期間を通しての凝集素価幾何平均値は、29であった。

Table 8. Progressive observation on the serum agglutinin titer of chicks in group 5.

Inoculum size 4×10^4 CCU	Chick No.	Agglutinin titer						Geometric mean of agglutinin titer
		1:10	20	40	80	160	320	
Age in weeks of chicks 1	81	- 1)						<10 ²⁾
	82							
	83	-						
	84	-						
	85	Dead 6 days post inoculation						
2	86							92
	87							
	88							
	89							
3	91							61
	92							
	93							
	94							
4	96							35
	97							
	98							
	99							
	100							

1) Agglutinin titer: <1:10.

2) The value less than ten indicates negative reaction for the diagnostic criterion of *M. gallisepticum* infection.

第6群各週令殺ヒナのMG血清凝集反応についての成績は、それぞれTable 9, 10に示したとおりである。第6群の全期間を通しての凝集素価幾何平均値は、56であった。

Table 9. Progressive observation on the serum agglutinin titer of chicks in group 6.

Inoculum size 4×10^5 CCU	Chick No.	Agglutinin titer						Geometric mean of agglutinin titer
		1:10	20	40	80	160	320	
Age in weeks of chicks 1	101	- 1)						<10 ²⁾
	102	Dead 4 days post inoculation						
	103	Dead 6 "						
	104	Dead 5 "						
	105							
2	106	Dead 11 days post inoculation						
	107	Dead 8 "						
	108	Dead 9 "						
	109	Dead 11 "						
	110	Dead 9 "						
3	111							92
	112							
	113							
	114							
	115 ³⁾							
4	116							92
	117							
	118							
	119							
	120							

1) Agglutinin titer: <1:10.

2) The value less than ten indicates negative reaction for the diagnostic criterion of *M. gallisepticum* infection.

3) The chick in a dying condition was killed 15 days post inoculation.

以上に述べた各観察項目、すなわちヒナの肉眼病変、MG分離、MG血清凝集素価についての成績を各ヒナ群内で相互に比較し、また同一項目別に各ヒナ群間の成績を比較したものが、Table 11である。

Table 10. Distribution of serum agglutinin titers of chicks in the each group through experimental period.

Group of chicks	Inoculum size	Number of chicks examined ¹⁾	Agglutinin titer							Geometric mean of agglutinin titer
			1:<10	10	20	40	80	160	320	
1	Non-infected control	15	15 ²⁾							<10 ³⁾
2	4 × 10 ⁰ CCU	20	10		1	1	3	5		11
3	4 × 10 ²	20	7			4	9			15
4	4 × 10 ³	20	5		1	4	4		5	34
5	4 × 10 ⁴	19	3	1	2	4	7	2		29
6	4 × 10 ⁵	12	1		2	3		5	1	56

1) Numbers do not contain dead chicks.

2) Number of chicks which showed the serum agglutinin titer.

3) The value less than ten indicates negative reaction for the diagnostic criterion of *M. gallisepticum* infection.

Table 11. Gross lesions, recovery of *M. gallisepticum*, and serum agglutinin titer of chicks in the each group through experimental period.

Group of chicks	Inoculum size	Number of chicks examined	Gross lesions		Recovery of <i>M. gallisepticum</i>			Geometric mean of agglutinin titer	
			Air sac	Trachea	Air sac				
					Both sides ¹⁾	Left ²⁾	Right ²⁾		
1	Non-infected control	15	0 ³⁾	33	0	0	0	13	<10 ⁴⁾
2	4 × 10 ⁰ CCU	20	10	35	30	30	30	90	11
3	4 × 10 ²	20	25	40	35	30	25	100	15
4	4 × 10 ³	20	30	45	45	25	35	95	34
5	4 × 10 ⁴	20	55	75	50	35	50	100	29
6	4 × 10 ⁵	20	80	65	50	25	45	100	56

1) Specimens collected and cultured together from both sides of the air sac of a chick. Five and ten chicks out of group 1 and 2-6 were examined within 2 weeks post inoculation, respectively.

2) Specimens collected and cultured individually from the left and right sides of the air sac of a chick. Ten chicks per group were examined 3 and 4 weeks post inoculation, respectively.

3) Percentage positive for number of chicks examined.

4) The value less than ten indicates negative reaction for the diagnostic criterion of *M. gallisepticum* infection.

考 察

餌付から1週令の期間では、非接種対照の第1群および第2～4群に比べて第5・6群は平均増体量が少なく、また飼料要求率が高かった。この事はMG接種菌数の違いによるものと考えられ、接種菌数が少くなるにつれ、ヒナの発育が抑制される事が実験的に明らかにされた。

ヒナの死亡率は、第5群で1例(5%)、第6群で8例(40%)であり、これら9例は脳軟化に起因する脚麻痺による起立困難または歩行不能、ならびに頸部捻転の結果、採食不能となり死亡したものと考えられる。

臨床症状で頸部捻転のみられたヒナは、MG接種菌数の多い群に多発している事から、ヒナ体内におけるMGの増殖が本症状発生にかかわる何らかの原因になっている可能性も考えられる。例えば、ヒナ体内

でのMGの増殖や、ビタミンEの破壊（脳軟化症）等の可能性も考えられる¹²⁾が、これらの点についての考察は後述する。

肉眼病変においては、MG接種菌数の多い第5・6群のヒナの気嚢・気管共に病変の出現率は高く、その程度は気嚢では左右両気嚢に粘液の貯溜が認められ、気管では粘液の貯溜や点状出血が認められる例が多かった。これに反して、非接種対照の第1群および接種菌数の少ない第2～4群のヒナの気嚢・気管共に病変の出現率は低く、その程度は弱かった。これらの事は接種菌数が多くなるにつれて、病変の出現率や程度が重くなる事、またこれらのMG接種菌数と病変の程度との間には相関関係のある事が明らかにされた。

なお、第1群に1例ずつの肝の巣状壊死ならびに気泡を伴った線維索性肝包膜炎がみられ、また肝の点状出血が接種菌数の多少にかかわらずみられた。以上の事から、MG接種菌数とこれらの病変出現率との間には相関関係はみられなかった。

また、頸部捻転および脚麻痺のみられたヒナの脳の病理組織学的検査の結果、その病変は炎症性変化はみられず、変性壊死病変を特徴とするもので、従来記載されている鶏の脳軟化病変¹²⁾に一致した。その結果、今回の実験にみられたヒナの頸部（椎）捻転ならびに脚麻痺は、以上の臨床、肉眼ならびに病理組織学的所見^{3,9,10,13,23,29,34)}、また実験ヒナ群すなわちMG接種菌数等と病鶏の発生状況との関係などの疫学的所見から、一種の鶏の脳軟化によるものと考えられるが、その他の鶏脳脊髄炎、ニューカッスル病、マレック病などの罹患は否定された。

今回、MG大量接種ヒナにみられた脳病変像と、非接種または少数菌接種ヒナ群で発症例がみられない事など、病鶏発生状況等を考えると、これらの脳病変は気嚢内に大量接種された1RF株に起因するものと思われる。なお、すでにCORDYら⁶⁾、YAMAMOTOら³³⁾は、MGの菌株によっては七面鳥の自然または人工感染例で脳病変が起こりうる事を報告しており、その際の脳の病理変状と今回のそれとは概ね一致するものと認められた。

一方、FABRICANT⁷⁾はMGの気嚢内接種により、多数の鶏に脳炎が認められたと報告している。

著者らは今回の実験のみならず、従来も何度か1RF株の大量気嚢内接種によって初生ヒナに斜頸などの脳症状が発生する事を経験している。

これらの病変は、接種MGの血液移行による脳血管栓塞の結果惹起された脳軟化と推定される。それらのヒナの一部の脳からMGが分離されながら脳に炎症反応がみられなかった事は興味深く、この点については、THOMASら³⁰⁾によりMGの毒素による作用も論じられているので、この点も含めてMGの起病性と病理学については今後更に検討する必要がある^{3,7,9,10,21,23,34)}。

実験ヒナからのMG分離についてみると、第2～6群においてはその分離率は左右両後胸部気嚢に比べて気管において高く、この事は松井ら¹⁶⁾、久葉ら¹⁴⁾および村田ら¹⁷⁾が既に指摘している事と一致した。気嚢におけるMG分離率は、実験開始後14日までは接種菌数の多いヒナ群の順に高かった。また15日以降の実験期間においては、MG非接種側気嚢（左後胸部気嚢）よりもMG接種側気嚢（右後胸部気嚢）の方が分離率が高かった。これらの事からMG分離率は、その接種菌数に概ね比例する傾向にあると思われる。

なお、MG血清凝集反応についてみると、7日令殺ヒナ群ではMG血清凝集素価はほとんどのヒナで陰性であった。この事は、ヒナにMG感染後1週間では抗体が生産されない事を示し、この成績は従来認められているMGの初生ヒナ実験感染例とよく一致している^{4,15,27)}。

MG凝集素価は、接種MG菌数の多いヒナ群では平均して高い値がみられたが、それらの凝集素価と接種菌数が少ない群の凝集素価との間で大きな差は認められなかった。この事から、一定量以上のMGを接種されたヒナではMG血清凝集素価は接種MGの菌数に左右されない事が明らかにされた。

なお、ここで用いた実験系における1RF株のAID₅₀は、正確には算出していないが、先の佐藤ら^{23,26)}、柚木ら³⁶⁾による成績と同様10ccu前後とみられる。

結論として、供試1RF株は*M. gallisepticum*としては、ヒナに対し比較的強毒な菌株³⁶⁾である事が知られた。

要 約

in vivo での抗菌剤効果の基礎的検討の為に、初生ヒナを用いた一実験感染系を確立する目的で、以下の実験を試みた。

供試菌 *Mycoplasma gallisepticum* (MG) 1 R F 株の新鮮液体培養 10 倍段階希釈の 0.4 ml/ヒナを、ブローラー初生ヒナ、雄の右後胸部気嚢内に接種し、4 週間観察し、接種菌の virulence の程度を調べた。実験群は 20 羽/群とし、非感染対照を含む 6 群を設定した。接種菌数は $4 \times 10^{1-5}$ ccu の 5 段階とした。各実験群のヒナについては、臨床症状を観察し、増体量、飼料要求率を調べて、毎週各群 5 羽ずつを殺して剖検し、MG 分離、MG 血清凝集素価の推移、肉眼ならびに組織病変等について経時的観察を試みた結果、下記の成績が得られた。

1) 全期間、全実験群において呼吸器症状はみられなかった。しかし、接種菌数の多い群で頸部捻転と脚麻痺を主徴とする死亡ヒナがみられ、これらのヒナの脳病変は病理組織学的検査の結果、脳軟化のそれに一致した。それらヒナの一部の脳からは MG が分離された。2) 接種菌数の多い群では、ヒナの増体量は少なく飼料要求率は悪かった。3) 接種菌数の少ない群での死亡率は極めて低く、接種菌数の多い群で 14 日令まで高く、その後 28 日令までは死亡ヒナはみられなかった。4) 気嚢および気管の病変出現率は、MG 接種菌数の多い群で高く、また病変の程度も強いものが多かった。なお低率ながら各群のヒナに肝の点状出血や、線維索性肝包膜炎、壊死巣などが、MG 接種菌数の多少にかかわらず認められた。5) MG 分離率は、気嚢よりも気管において高く、また MG 非接種側気嚢よりも MG 接種側気嚢において高かった。6) MG 血清凝集素価は、1 週令殺時のヒナ群では低く、2 週令時以後の殺ヒナ群で上昇がみられた。MG 接種群間では接種菌数の多少にかかわらず凝集素価に大きな差は認められなかった。7) 供試菌株の A I D₅₀ は 10 ccu 前後とみられた。

結論として、供試 1 R F 株は *M. gallisepticum* としては、ヒナに対し比較的強毒な菌株である事が知られた。

謝 辞

供試菌株の分与ならびに種々御助言を賜った佐藤静夫博士（農林水産省家畜衛生試験場）、および病理組織学的検討を賜った佐伯百合夫博士（東京農工大学、家畜病理学教室）に深謝する。

本論文の要旨は、第 85 回日本獣医学会（1978 年 4 月）で口頭発表した。

文 献

- 1) ADLER, H. E., McMARTIN, D. A. and ORTMAYER, H. : The effect of infectious bronchitis virus on chicken infected with *Mycoplasma gallisepticum*, *Avian Dis.*, **6**, 267-274 (1962).
- 2) ADLER, H. E. : Avian mycoplasmal diseases, pp. 240-261, *In* SHARP, J. T. (ed.) : The role of mycoplasmas and L forms of bacteria in disease, Charles C. Thomas·Publisher, Springfield, Ill. (1970).
- 3) 安藤敬太郎、藤原 弘：鶏の呼吸器性マイコプラズマ病, pp. 640-661, *In* 農林省家畜衛生技術者集談会 (編), 家畜伝染病の診断, 文永堂, 東京 (1967).
- 4) CHASE, M. W. : Collection and handling of serum, 245 p., *In* WILLIAMS, C. A. and CHASE, M. W. (eds.) : Methods in immunology and immunochemistry, Vol. 1. Acad. Press, New York and London (1967).
- 5) Clyde, W. A. J. : Pathogenic mechanisms in mycoplasma diseases, pp. 143-146, *In* SCHLES-SINGER, D. (ed.) : Microbiology-1975, Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C. (1975).
- 6) CORDY, D. R. and ADLER, H. E. : The pathogenesis of the encephalitis in turkey poults produced by a neurotropic pleuropneumonia-like organism, *Avian Dis.*, **1**, 235-245 (1957).

- 7) FABRICANT, J. : Avian mycoplasmas, pp. 621-641, *In* Hayflick, L. (ed.): The mycoplasmatales and the L-phase of bacteria, Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corp., New York (1969).
- 8) HORIUCHI, T., SHOYA, S., SATO, S., KAWAMURA, H. and Ito, F. : Chronological observation of respiratory disease in a field chicken flock, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **7**, 153-163 (1967).
- 9) JORDAN, F. T. W. : Avian mycoplasma and pathogenicity - a review, *Avian Pathol.*, **4**, 165-174 (1975).
- 10) JORDAN, F. T. W. : Avian mycoplasmas, pp. 1-48, *In* TULLY, J. G. and WHITCOMB, R. F. (eds.): The mycoplasmas, Vol. II. Human and animal mycoplasmas, Acad. Press, New York, San Francisco, London (1979).
- 11) KATO, K. : Infectious coryza of chickens. V. Influence of *Mycoplasma gallisepticum* infection on chicken infected with *Haemophilus gallinarum*, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **5**, 183-189 (1965).
- 12) 勝屋茂實：鶏脳軟化症, pp. 321-329, *In* 堀内貞治, 川村 齊, 関 令二 (編)：鶏病図説, 日本畜産振興会, 東京 (1968) .
- 13) 久葉 昇, 橋本和典, 佐藤多津雄, 稲口利次：鶏の実験的マイコプラズマ病に関する研究. II. *Mycoplasma gallisepticum* (S₆ 株) の後胸気嚢および静脈内接種における病理学的所見, 日獣誌, **35**, 487-498 (1973).
- 14) 久葉 昇, 橋本和典, 佐藤多津雄, 佐伯一郎, 稲口利次, 小松基宏：鶏の実験的マイコプラズマ病に関する研究. I. *Mycoplasma gallisepticum* の気嚢および静脈内接種鶏における臨床観察および接種種の回収について, 日獣会誌, **21**, 316-321 (1968) .
- 15) 松井光蘭, 佐藤静夫, 国安主税：鶏の呼吸器性マイコプラズマ病 (技術の手引き 6) , 日本獣医師会, 東京 (1967) .
- 16) 松井光蘭, 吉田佳充, 安藤敬太郎：鶏の呼吸器性マイコプラズマ病鶏からの *Mycoplasma gallisepticum* 分離成績, 家畜衛試研究報告, 第 53 号, 10-13 (1966) .
- 17) 村田昌芳：鶏マイコプラズマ症の抗生物質による予防, 治療に関する最近の知見, — 特に *Mycoplasma gallisepticum* 及び大腸菌による, 単独または混合実験感染ヒナを用いた実験成績を中心として —, 家畜の耐性菌研究会報, 第 1 号, 16-21 (1980) .
- 18) 村田昌芳, 梶川道治, 国安主税, 吉田佳充：1969-1971 年に分離された *Mycoplasma gallisepticum* の主な抗生物質感受性, 広大生物生産紀要, **19**, 55-68 (1980) .
- 19) 岡 基, 古谷 武, 旭 興正：ニワトリの呼吸器性マイコプラズマに関する研究. I. *Mycoplasma gallisepticum* と鶏痘ウイルスとの混合感染について, 日獣誌, **28** (学会号), 438-439 (1966) .
- 20) PIRIE, N. W. (chairman) : Pathogenic mycoplasmas, A Ciba Foundation Symposium, Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland (1972).
- 21) RAZIN, S. : The mycoplasmas, *Microbiol. Rev.*, **42**, 414-470 (1978).
- 22) 佐藤静夫：*Mycoplasma gallisepticum* と他の微生物との混合感染について, 獣医界, 第 102 号, 10-19 (1972) .
- 23) 佐藤静夫：鶏のマイコプラズマ症, 日獣会誌, **30**, 421-430 (1977) .
- 24) SATO, S., NONOMURA, I. and HASHIMOTO, K. : *Escherichia coli* serotypes isolated from chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **12**, 63-68 (1972).
- 25) SATO, S., NONOMURA, I., SHIMIZU, F., SHOYA, S. and HORIUCHI, T. : Mixed infection with *Mycoplasma gallisepticum* and the B1 strain of Newcastle disease virus in chickens, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **10**, 58-65 (1970).
- 26) SATO, S., SHOYA, S., HORIUCHI, T. and NONOMURA, I. : An outbreak of synovitis caused by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **12**, 54-62 (1972).

- 27) SUZUKI, K., OMURO, M., SATO, S., KUNIYASU, C. and GOROYA, K. : Influence of Newcastle disease and infectious bronchitis live vaccines on chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **11**, 94–99 (1971).
- 28) 田島正典, 宮本 猛, 長島治男: 鶏の慢性呼吸器病 (CRD) に関する研究. I. 野外例および実験的感染例の臨床, 病理学的所見, 日獣会誌, **11**, 16–22 (1958).
- 29) TAJIMA, M., NUNOYA, T. and YAGIHASHI, T. : An ultrastructural study on the interaction of *Mycoplasma gallisepticum* with the chicken tracheal epithelium, *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 1009–1014 (1979).
- 30) THOMAS, L. : The toxic properties of *M. neurolyticum* and *M. gallisepticum*, pp. 104–109, *In SHARP, J. T. (ed.) : The role of Mycoplasmas and L forms of bacteria in disease*, Charles C. Thomas, Springfield, Ill. (1970).
- 31) TULLY, J. G. and WHITCOMB, R. F. (eds.) : The mycoplasmas, Vol. II. Human and animal mycoplasmas, Acad. Press, New York, San Francisco, London (1979).
- 32) WHITTLSTONE, P. : Pathogenicity of mycoplasmas in animals, pp. 217–250, *In SMITH, H. and PEARCE, J. H. (eds.): Microbial pathogenicity in man and animals*, Twenty-second Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge Univ. Press, London (1972).
- 33) YAMAMOTO, R. and BIGLAND, C. H. : Experimental production of airsacculitis in turkey poults by inoculation with the 'N' type mycoplasma, *Avian Dis.*, **9**, 108–118 (1965).
- 34) YODER, H. W. Jr. : *Mycoplasma gallisepticum* infection, pp. 236–250, *In HOFSTAD, M. S., CALNEK, B. W., HELMBOLDT, C. F., REID, W. M. and YODER, H. W. Jr. (eds.): Diseases of poultry*, 7th ed., Iowa State Univ. Press, Ames., Iowa (1978).
- 35) 吉田佳充, 国安主税 : *Mycoplasma gallisepticum* 感染鶏由来の卵黄と母鶏血清の凝集抗体, 家畜衛試研究報告, 第68号, 7–11 (1974).
- 36) 柚木弘之, 佐藤静夫, 尾崎雄一, 小林広幸, 鈴木正雄 : 凍結乾燥マイコプラズマの病原性について, 凍結及び乾燥研究会会誌, **20**, 41–45 (1974).
- 37) 榎本 真, 林 裕造, 田中寿子 (編) : 実験動物の病理組織 —その検査法と観察の要点—, pp. 221–234 ほか, ソフトサイエンス社, 東京 (1980).
- 38) 堀内貞治, 川村 斉, 関 令二 (編) : 鶏病図説, pp. 187–211, 437–454, 日本畜産振興会, 東京 (1968).

SUMMARY

In order to establish an experimental system using chicks for the fundamental observation on efficacy *in vivo* of the antibacterial agents that control the avian respiratory mycoplasmosis, the present experiments were conducted to investigate the virulence of *Mycoplasma gallisepticum* strain 1RF²⁶) induced artificially into the air sac of day-old chicks.

The inocula of 0.4 ml/chick of ten-fold serial dilutions of broth culture of the organisms were artificially induced into the right posterior thoracic air sac of day-old male broiler chicks, and the chicks were observed during 4 weeks. The experimental groups were designed as group of 20 chicks each, 6 groups included a non-infected control and 5 infected groups. The inoculum sizes of the organisms to the chicks ranged from 4×10

to 10^5 CCU* in 5 dilutions of the broth culture. The following results were obtained.

1) Clinical symptoms were observed only death with characteristic findings of limberneck and leg weakness in the chicks inoculated with a large number of the organisms. According to the results of the histopathological examinations, the cerebral lesions appearing in these chicks were similar to those of the encephalomalacia. The inoculated organisms were recovered from the brain of some of those chicks.

2) Low weight gains and high feed conversions were observed in the group of chicks inoculated with a large number of the organisms.

3) The mortality rate was very low in the group of chicks inoculated with a small number of the organisms. In the group of chicks inoculated with a large number of the organisms, the mortality of chicks was comparatively high up to 14 days post inoculation, but no mortality was observed during the 15 to 28 days post inoculation.

4) Incidence and severity of macroscopic lesions in the air sac and the trachea of the chicks inoculated with a large number of the organisms were comparatively high and severe. Under low incidence of the macroscopic lesions including petechiae, fibrinous perihepatitis and necrotic foci *etc.* in the liver of chicks were observed to be not depending on the inoculum size of the organisms.

5) Recovery ratio of the organisms from the chicks was found to be higher in the trachea than that in the air sac, and furthermore was higher on the inoculated side than on the other side of air sac.

6) Serum agglutinins against *M. gallisepticum* were observed to be at a low titer in the chicks killed 1 week post inoculation, and increased titers were observed in the chicks killed after 2 weeks post inoculation. No remarkable difference of the serum agglutinin titers depending on inoculum size of the organisms was observed in the chicks.

7) The AID_{50} of the organisms was estimated as *ca.* 10 CCU.

Consequently, it was proved that the strain 1RF examined is comparatively high virulent against chicks, among the strains of *M. gallisepticum*.

* Color changing unit.