

出水平野に飛来したツルの糞便から分離されたマイコプラズマ

佐藤 愛^{1)*}・田原口智士²⁾・小尾岳士¹⁾・高瀬公三^{1)†}

(¹⁾病態・予防獣医学講座微生物学分野, ²⁾麻布大学獣医学部獣医学科)

平成21年8月10日 受理

要 約

鹿児島県出水平野に、2006年12月から2007年2月に飛来したツルの糞便150検体（2個体ずつのプール）より鶏胚線維芽細胞（CEF）を用いてウイルス分離を試みる中、7例（4.7%）から寒天培地上でニップル状コロニーを形成するマイコプラズマが分離された。PCRで増幅された16S-rRNAの約1,000bp遺伝子のシーケンス解析により同定を試みたところ、*Mycoplasma iowae*（GenBank：AM073012）と97.9%の相同性を示した。さらに分離株の鶏胚への病原性を卵黄囊内接種により検討したところ、鶏胚の死亡率は50～83.3%と高かった。

キーワード：出水平野，ツル，マイコプラズマ，病原性

緒 言

出水平野には毎冬10月から翌年2月にかけて約12,000羽にも及ぶツルが飛来し、集団生活を営む。このようなツルの群れに、何らかの病原微生物が侵入し伝染病が発生するとツルは絶滅する恐れがある。また、ツルの保有する微生物が周辺の家畜・家禽へと伝播する可能性があり、またこれらの動物の病原体がツルに感染することも考えられる。このようなところから、ツルにどのような病原微生物が感染しているのかを知ることは重要なことである。

当研究室は過去にツルがサルモネラ（ST）に感染していることを報告している[2, 7]。ここでは、ツル糞便からウイルス分離を試みる中で分離されたマイコプラズマについて報告する。

材料および方法

材料：ツル糞便は、2006年の12月～翌年2月にかけての早朝、ツルの休遊地（荒崎）である田圃において、排泄されて間もないと思われる新鮮なものを

採取し、その後2例ずつをプールして得た150検体である（Table 1）。

マイコプラズマの分離およびクローニング：糞便をイーグルMEM培地（ニッスイ製薬）にて約10%乳剤とし、これを2,000rpmで20分遠心した。この上清に抗生物質（ゲンタマイシン，バンコマイシン）を少量加えて混和後室温で15分静置したのち、常法にて作成された鶏腎（CK）細胞に接種し、5%CO₂下で37℃、4日間培養した。その上清をCK細胞で3代継代し、3代目の上清をリン酸緩衝食塩液（PBS）で10倍段階希釈し、常法により培養した鶏胚線維芽細胞（CEF）の24穴マイクロプレート

Table 1. Isolation of *Mycoplasma* sp. from the crane feces

| Date of sampling | No. of samples (feces)* | No. of positive for <i>Mycoplasma</i> sp. (%) | Isolates |
|------------------|-------------------------|---|-----------------------|
| 2006.12 | 48 | 1 (2.1%) | D-9 |
| 2007.1 | 52 | 4 (7.7%) | J-9, J-10, J-28, J-48 |
| 2007.2 | 50 | 2 (4%) | F-38, F-47 |
| Total | 150 | 7 (4.7%) | |

*Two feces were pooled.

†：連絡責任者：高瀬公三（獣医学科病態・予防獣医学講座微生物学分野）

Tel: 099-285-8724, E-mail: ktakase@agri.kagoshima-u.ac.jp

²⁾ 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

*：現）大分県玖珠家畜保健衛生所

(NUNC) に各希釈当たり 4 穴ずつ接種した。その後、5 %CO₂ 下で 37℃、4 日間培養し、CPE の確認できた穴のうち、接種材料の希釈が最も高かった 1 穴を選択し、その培養上清を回収した。これをマイコプラズマ用 (PPLO) 寒天培地に接種したところ、同一形態を示すニップル状コロニーを多数確認した。その 1 コロニーを毛細管ピペットで培地ごと採取し、再び CEF で 4 日間培養した。これを 3 回繰り返して、3 度目に回収した 1 コロニーを分離株とした。この分離株をさらに CEF で培養、増殖させたものを小分け保存し、以下の実験に供試した。

電子顕微鏡観察：CEF での培養上清を 10,000rpm で 10 分間遠心し、その沈渣を少量の蒸留水に再浮遊し、常法によりネガティブ染色後、電子顕微鏡で観察した。

PCR によるマイコプラズマの同定：前述のクロニングによって得られた分離株 (J-9 株、J-10 株) の寒天培地上コロニーを用い、Lierz ら [4] を参照して 16S-rRNA 領域のプライマー (Table 2) を選択し、PCR 法で遺伝子を増幅した。PCR 反応は、抽出した DNA 1.0μl に PCR 反応液 (10×PCR buffer, 2.5M dNTPs, 25M MgCl₂, それぞれ 0.020μM の 16F27 primer, MGSO primer, および 5u/mol TaKaLa ExTaq) を加え 20μl とし、94℃、2 分反応後、94℃/45 秒間、55℃/45 秒間、72℃/90 秒間を 35 サイクルにて行った。

塩基配列の決定：分離株 (J-10 株) の PCR 増幅産物からエタノール/酢酸ナトリウム沈殿により得た精製 DNA 2.0μl に反応液 (BigDye Terminator cycle sequencing kit の Premix 4μl および 3.2pmol の 16F27 primer または MGSO primer) を加え 20μl とし、96℃、10 秒、50℃ 5 秒、60℃ 240 秒の 25 サイクルで行った。精製には、エタノール/酢酸ナトリウム沈殿を用いて行い、鹿児島大学遺伝子実験施設にて、シーケンス解析を依頼した。シーケンス解析の結果より、FinchTV および Genetix を用いて近縁種の検索を行なった。

卵黄嚢内接種試験：J-10 株の 10^{3.5}, 10^{5.5}, 10^{7.5} TCID₅₀ /0.1ml をそれぞれ 6 個の 7 日齢 SPF 発育鶏卵の卵黄

嚢内に 0.1 ずつ接種し、37℃ 下で 17 日齢胚に達するまで孵卵した。対照群には、培地のみ、および菌液の 100℃ 15 分煮沸殺菌したものを、それぞれ 2 個の SPF 卵を用いて、同様に接種した。接種後、毎日検卵を行ない、死亡が確認された胚は即日剖検を行った。どの群も 17 日齢胚に達した個体は同様に胚の剖検を行った。剖検の際、肝の 10% 乳剤を作成し、2000rpm で 10 分遠心した上清を CEF に接種した後、37℃、5 %CO₂ 下で 4 日間培養を行い、CPE の出現を確認した。さらに CPE 陽性の穴の上清をマイコプラズマ寒天培地に接種、37℃、5 %CO₂ 下で 10 日間培養を行ない、ニップル状コロニー形成によるマイコプラズマの再分離を確認した。なお、24 時間以内に死亡した卵は、事故死として除外した。また、開卵直後の腔液の 1 白金耳分を血液寒天培地に接種し、37℃ で 24 時間培養することで、細菌による迷入汚染のないことも確認した。

成 績

分離成績：Table 1 に示すように、2006 年 12 月採材の 48 検体中 1 例 (分離率 2.1%)、2007 年 1 月採材の 52 検体中 4 例 (7.7%)、同 2 月の 50 検体中 2 例 (4%)、合計で 150 検体中 7 例 (4.7%) にマイコプラズマによると思われる CPE が観察された。これらの 7 例の CEF での CPE はいずれも同じ形態を示し、既知のウイルスに認められるものとは異なっていた (Figure 1)。これら 7 例の培養上清をマイコプラズマ用寒天培地に接種、培養したところ、ニップル状コロニーが確認された (Figure 2)。このうち 1 月に分離された 2 株を J-9 株、J-10 株と命名した。J-9 株の電子顕微鏡観察では 1μm 以下の大小の球状粒子が確認された (Figure 3)。

PCR およびシーケンス解析による同定：J-9 株および J-10 株から約 1,000bp の PCR 増幅産物が確認された (Figure 4)。さらに J-10 株の PCR 産物についてシーケンス解析を行った結果、*M. iowae* (GenBank: AM073012) に対し最も高い 97.9% の相同性を示した (Table 3)。

卵黄嚢内接種試験：J-10 株を卵黄嚢内に接種後、鶏胚の死亡数の推移を観察した (Table 4)。J-10 株接種後、17 日齢までの死亡した個体、および生存した個体すべての肝乳剤からマイコプラズマが分離されたが、対照群からは検出できなかった。また、開卵直後の腔液を血液寒天培地に接種した結果、細

Table 2. Primer set for PCR

| Primer | Size of product (bp) |
|--|----------------------|
| 16F27: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' | 1000 |
| MGSO: 5'-TGCACCATCTGTCACCTCTGTTAACCTC-3' | |

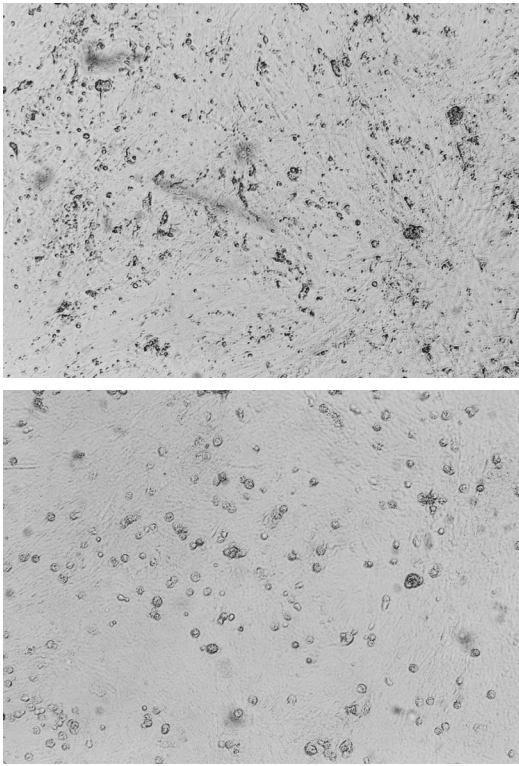


Figure 1. CPE observed in CEF monolayer culture infected with *Mycoplasma* sp. (strain J-10: upper) and non infected (lower), observed on 4th days after inoculation. (x200)

Table 3. Sequence analysis of strain J-10 to several *Mycoplasma* spp.

| <i>Mycoplasma</i> spp. | Identity (%) |
|-------------------------|--------------|
| <i>M. gallisepticum</i> | 84.4 |
| <i>M. synoviae</i> | 73.1 |
| <i>M. iowae</i> | 97.9 |
| <i>M. lipofaciens</i> | 74.3 |
| <i>M. meleagridis</i> | 74.1 |
| <i>M. glycophilum</i> | 72.8 |

菌は確認されなかった。なお、胚の死亡率は50～83.3%であり、胚の肉眼的病変は主に肝臓に見られ、白色壊死斑が全体の66.7%に、緑色変化が22.2%に認められた。

考 察

一般にマイコプラズマが分離される部位としては呼吸器、生殖器、関節などの粘膜組織であり、糞便

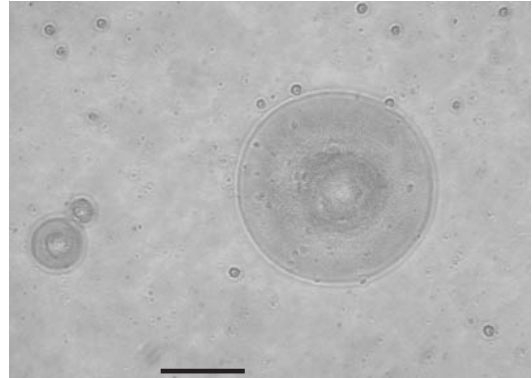


Figure 2. Nipple like colony observed on PPLO agar medium inoculated with *Mycoplasma* sp. (strain J-10). Bar=100μm

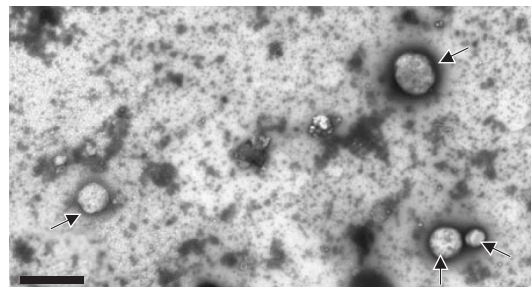


Figure 3. Electron microphotograph of *Mycoplasma* sp., strain J-10 (arrows). Bar=1μm

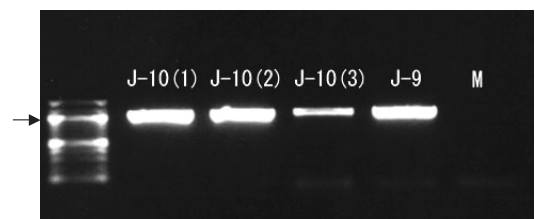


Figure 4. PCR amplification. Left: 100-base pair ladder (arrow=1,000bp), J-10(1)(2)(3): sub-clone of strain J-10, J-9: strain J-9, M: mock.

を分離材料にすることは少ない[8]。今回は糞便からのウイルス分離をCK細胞で試みる中でマイコプラズマが分離された。分離菌は、その16S-rRNAシーケンス解析から *M. iowae* に近縁な菌と考えられた。*M. iowae* の寄生部位は呼吸器および生殖器とされている[8, 9]ことから、今回の *M. iowae* 様菌は、ツルの生殖器で増殖した菌が総排泄腔で糞便と混ざって排泄された後に分離されたと考えられる。ツルの糞便よりマイコプラズマが分離されたのはこれが最初の報告と思われる。

Table 4. Pathogenicity of strain J-10 to chicken embryonating eggs

| Strain J-10 (TCID ₅₀ /egg) | Eggs inoculated | Days post-inoculated/No. of dead embryos | | | | | | | | | | Mortality (%) |
|--|--------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| 10 ^{7.5} | 6 | 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 83.8 |
| 10 ^{5.5} | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 83.3 |
| 10 ^{3.5} | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 50.0 |
| — | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 |

*No. of embryos died

分離菌J-10株の卵黄囊内接種試験による鶏胚への病原性は高く、鶏胚の死亡率は10^{3.5~5.5}TCID₅₀/卵において50~83.3%であった。このことは、由来の異なる七面鳥と鶏より分離された*M. iowae*の4株を用いたBradburyら[1]の卵黄囊内接種試験の結果と照らし合わせると、5週齢の鶏の気管より分離されたB10/80株とほぼ同様の病原性であろうと推測できる。今回の実験でも、彼ら[1]同様に長期間孵卵していれば、死亡率はさらに高くなった可能性はある。肉眼的変化は、Lierzら[3]の*M. lipofaciens*を用いた卵黄囊内接種試験と同様に、胚では変色や浮腫が、あるいは発育遅延(低成長)が確認されたが、これらは分離菌に特徴的な病変とはいえないであろう。

マイコプラズマ種の中には垂直伝播するものがあり、胚に病態を作り、死亡させることもある[3]。*M. gallisepticum*株を採卵種鶏に接種すると2~3%の産卵率低下を示し、その雛に垂直感染が起こることが確認されている[5]。また、*M. gallisepticum*や*M. synoviae*はそれぞれ10%、4%の産卵率の低下を引き起こすことも報告されている[9]。マイコプラズマ種のツルに対する病原性については全く報告がなく、今回の分離菌のツルに対する病原性は不明である。鶏胚はマイコプラズマの病原性を決定する動物モデルとして価値があるとの報告[6]から考えれば、今回の分離菌の病原性はある程度推察できるかもしれない。

ツルがどのような病原微生物に感染しているかを把握しておくことは、ツルの保護対策上重要と考えられる。今後もツルあるいはツル休遊地の環境中から微生物の分離を行うなど継続して調査を実施していく必要がある。

最後に本研究に協力いただいた鹿児島県環境技術協会、およびSPF発育鶏卵やマイコプラズマ用(PPLO)寒天培地を提供いただいた(財)化学及血清療法研究所の関係各位さらに電子顕微鏡写真を撮影していただいた基礎獣医学講座解剖学分野の松元光春准教授

に深謝する。なお、本研究は鹿児島県ツル保護会との共同研究である。

引用文献

- [1] Bradbury JM, McCarthy JD: Pathogenicity of *Mycoplasma iowae* for chick embryos, *Avian Pathol.*, 12(4), 483-496 (1983)
- [2] 穂満康弘・室賀紀彦・田原口智士・中馬猛久・高瀬公三・塩谷克典・毛利資郎：出水平野に飛来するツル糞便からの *Salmonella* Typhimurium の分離および分離株の性状，*日獣会誌*，58(6)，411-414 (2005)
- [3] Liert M, Stark R, Brokat S, Hafez HM: Pathogenicity of *Mycoplasma lipofaciens* strain ML64, isolated from an egg of a Northern Goshawk (*Accipiter gentilis*), for chicken embryos, *Avian Pathol.*, 36(2), 151-153 (2007)
- [4] Lierz M, Hagen N, Harcourt-Brown N, Hernandez-Divers SJ, Lüscho D, Hafez HM: Prevalence of mycoplasmas in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific mycoplasma polymerase chain reaction, *Avian Pathol.*, 36(2): 145-150 (2007)
- [5] Lin MY, Kleven SH: Egg transmission of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens, *Avian Dis.*, 26(3). 487-495 (1982)
- [6] Lockaby SB, Hoerr FJ, Kleven SH, Lauerma LH: Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryos, *Avian Dis.*, 43(2), 331-337 (1999)
- [7] Maeda Y, Tohya Y, Nakagawa Y, Yamashita M, Sugimura T: An occurrence of *Salmonella* infection in cranes at the Izumi Plains, *J. Vet. Med. Sci.*, 63(8), 943-944 (2001)
- [8] 尾形学 (監修)，興水馨・清水高正・山本孝司 (編集)：pp.1-19, マイコプラズマとその実験法，近代出版 (1998)
- [9] 佐藤静夫：疾病とその診断，予防，治療，養鶏衛生ハンドブック，pp.182-184，(社)全国家畜産物衛生指導協会刊 (1996)

Isolation of *Mycoplasma* sp. from Feces of Wild Cranes on the Izumi Plains

Ai SATO¹⁾, Satoshi TAHARAGUCHI²⁾, Takeshi OBI¹⁾ and Kozo TAKASE¹⁾†

⁽¹⁾Laboratory of Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Medicine,

⁽²⁾Faculty of Veterinary Medicine, Azabu University)

Summary

Twelve thousand or more cranes migrate from Siberia to the Izumi plains in the northern part of Kagoshima prefecture every winter and stay there from November to February. *Mycoplasma* sp. was isolated from crane feces samples collected in 2006-2007, with an isolation ratio of 7/150 (4.7%). The isolates were identified as *Mycoplasma* sp. by *Mycoplasma* genus-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. Gene-targeted sequencing (GTS) analysis of part of 16S-rRNA gene showed that the isolate was *Mycoplasma iowae* or similar. The pathogenicity of the isolate in specific pathogen free chicken embryos was found to be pathogenic, causing a high mortality.

Key words: wild crane, Izumi plains, *Mycoplasma* sp., pathogenicity.

†: Correspondence to : Kozo TAKASE (Laboratory of Veterinary Microbiology)

Tel: 099-285-8724, e-mail: ktakase@agri.kagoshima-u.ac.jp