

# 採卵鶏にみられた顔面巨大腫瘍の病理学的検索 ならびに感染実験

平田真美 御領政信<sup>†</sup> 岡田幸助

岩手大学農学部 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

(2004年12月20日受付・2005年4月12日受理)

## 要 約

顔面に巨大腫瘍が形成された鶏群を、病理学的・病因学的に検索した。野外例は顔面に腫瘍が形成された3養鶏場由来の採卵鶏6羽を用いた。病理組織学的に、顔面腫瘍は粘液腫および線維肉腫(粘液型)と診断された。免疫組織化学的検索において両腫瘍の腫瘍細胞はALV抗原陽性を示した。腫瘍組織のPCR法ではALV-A亜群に特異的な塩基配列の増幅が認められた。これらより、腫瘍形成にはALV-A亜群が関与している可能性が示された。感染実験では、腫瘍組織乳剤を接種した実験鶏および接種鶏から得られた垂直感染鶏について検索を行った。接種鶏には野外例と同様の病変は認められなかったが、垂直感染実験鶏に野外例類似の粘液腫が再現された。

——キーワード：線維肉腫(粘液型)、顔面巨大腫瘍、採卵鶏、粘液腫、ALV-A亜群。

日獣会誌 58, 671～675 (2005)

顔面の腫脹を主症状とする鶏の感染性疾患として、呼吸器系の炎症性疾患である頭部腫脹症候群(SHS) [3] および伝染性コリーザ(IC) [1] が、また、腫瘍を形成する疾患としてはトリ白血病ウイルスavian leukosis virus (ALV) に起因する骨髄球腫 [7] が知られている。トリ白血病・肉腫ウイルスはレトロウイルス科トリC型オンコウイルスに属するRNAウイルスで、病原性により、肉腫ウイルスと白血病ウイルスに分類され、さらにエンベロープ蛋白の性質から、A, B, C, D, EおよびJ亜群に細分類される [7]。内在性ウイルスであるE亜群以外は外来性のウイルスである [7]。ALV感染発症鶏では、単一なリンパ芽球様細胞の腫瘍性病変を形成するリンパ性白血病をはじめする種々な上皮系および非上皮系腫瘍が形成される [7]。伝播様式は介卵および同居感染で、ワクチンはなく、ALV排泄母鶏を摘発・淘汰することで清浄化される [7]。日本ではAおよびB亜群、最近では肉用鶏にJ亜群感染の報告がなされているが、野外ではA亜群の伝播が広く確認されている [5, 11]。今回、産卵前後の採卵鶏において顔面に巨大腫瘍を形成した症例に遭遇した。この疾患の特徴および本態を明らかにするために、病理組織学的、免疫組織化学的、分子生物学的検索および感染実験を行った。

## 材料および方法

**野外例：**検索材料は3採卵養鶏場(飼養羽数A養鶏場：1万羽、B養鶏場：3,500羽、C養鶏場：2万羽)で顔面あるいは羽翼部に腫瘍が形成された採卵鶏6羽[A養鶏場：1症例(258日齢)、B養鶏場：3症例(360日齢)、C養鶏場：2症例(210日齢)]を用いた。A養鶏場では258日齢時に顔面における巨大腫瘍の形成が0.5%において認められた。B養鶏場では360日齢時に顔面に巨大腫瘍の形成(0.7%)と羽翼部に腫瘍の形成(3%)が認められた。C養鶏場では、育成期に顔腫れを主訴に0.23%が淘汰され、育成率は低かった。発症鶏には腫瘍形成以外の臨床症状はほとんど認められなかった。

**感染実験：**SPF鶏(P2系白色レグホン種)初生雛26羽に野外例腫瘍組織から作製した10%乳剤を大腿部筋肉内接種し、356日間経過観察を行った。接種実験鶏由来の有精卵を孵化してえられた20羽を垂直感染実験鶏として経過観察を行った。

**病理組織学的検索：**野外例、接種実験鶏(356日齢)および垂直感染実験鶏1例(死亡鶏141日齢)は剖検後、腫瘍を含む臓器組織について採材後、10%ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン包埋ブロックを作

<sup>†</sup> 連絡責任者：御領政信(岩手大学農学部獣医学科獣医病理学研究室)

〒020-8550 盛岡市上田3-18-8 ☎019-621-6217 FAX 019-621-6274



図1 野外例 No. 1 の外観。右側顔面に巨大腫瘍が形成されており、頭部より大きくなっている。

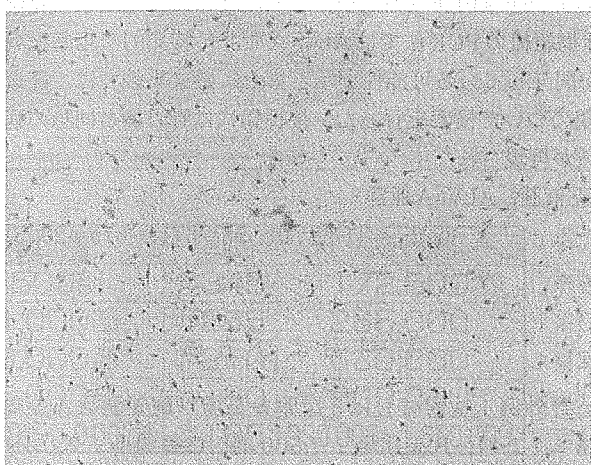


図2 野外例 No. 1 の顔面腫瘍。疎な膠原線維と弱好塩基性の粘液を伴う紡錘形の核を有する細紡錘形細胞の増殖が認められる。(HE 染色 × 80)

製した。これを4 $\mu$ mに薄切後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、光学顕微鏡にて検索した。特殊染色としてマッソン・トリクローム染色、渡辺鍍銀法、PAS 反応、アルシアンブルー染色、コロイド鉄染色を施した。

**免疫組織化学的検索：**野外例全例の腫瘍および1例の臓器 (肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、卵巣)、接種実験鶏に形成された腎腫瘍ならびに垂直感染実験鶏に形成された羽翼部腫瘍について、一次抗体にALV-Aの群特異抗原に対するウサギ抗血清 (独立行政法人動物衛生研究所、塚本健司博士より分与) を用いて、常法に従い、avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法を行った。

**Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR 法)：**ALV-A 亜群について、野外例腫瘍組織および接種実験鶏から得られた全血 (227日齢, 23例)、肝臓 (356日齢, 24例) および接種実験鶏から

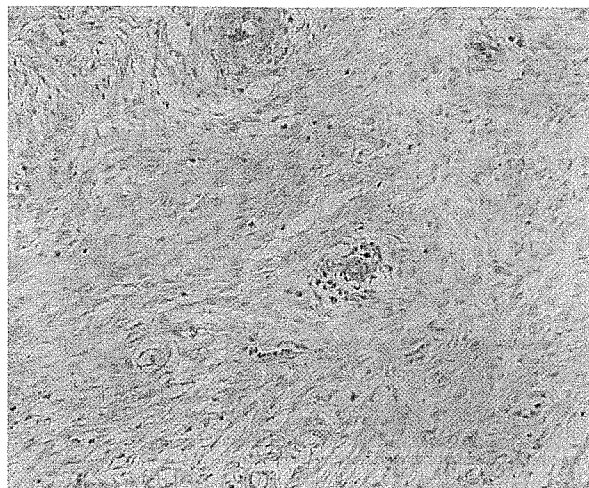


図3 野外例 No. 1 の顔面腫瘍。卵円形～紡錘形の核を有する線維芽細胞様細胞の密な増殖により構成されている。(HE 染色 × 80)

得られた有精卵の卵白 (5例)、鶏腎細胞 (5例)、初生雛肝臓 (5例) および垂直感染実験死亡鶏 (141日齢) の肝臓 (1例) を材料とし、ALV-A 亜群に特異的なPA1 (5'-CTACAGCTGTTAGGTTCCCAGT-3') およびPA2 (5'-GTCACCACTGTCGCCTATCCG-3') プライマー [8] を用いたRT-PCR法を行った。

**電子顕微鏡学的検索：**光学顕微鏡検索において封入体が観察された野外例心臓のホルマリン固定組織からの戻し材料を、常法に従いエポキシ樹脂包埋後、超薄切片を作製し、酢酸ウラニル溶液およびクエン酸鉛溶液により二重染色を施して透過型電子顕微鏡にて観察した。

## 成 績

**野外例の肉眼所見：**3養鶏場由来の6羽全例において顔面および羽翼部に拇指頭～鶏卵大の腫瘍が認められた (図1)。剖面では、腫瘍は被膜を有し、透明感のある白色～黄白色を呈し、粘液が認められた。その他の臓器において著変は認められなかった。

**野外例の病理組織学的所見：**症例1, 2, 4, 5, 6の腫瘍は厚い被膜を有し、疎な膠原線維および弱好塩基性の粘液を伴う細紡錘形細胞の疎な増殖により構成されていた (図2)。マッソン・トリクローム染色では、腫瘍細胞間の膠原線維が鮮やかな青色を呈していた。アルシアンブルー染色では全域の腫瘍間質に淡青色を呈する豊富な酸性粘液が認められた。

症例1, 3, 5の腫瘍の一部では、被膜は認められず、腫瘍組織は、比較的境界明瞭で豊富な膠原線維を伴う線維芽細胞様細胞の密な増殖により構成されていた (図3)。マッソン・トリクローム染色では、腫瘍細胞の豊富な膠原線維束は鮮やかな青色を呈していた。コロイド鉄染色では、一部に青色を呈する酸性粘液が認められた。

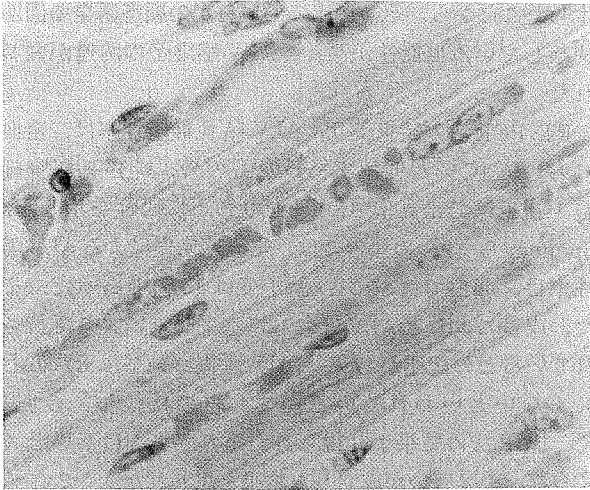


図4 野外例No. 6の心臓に認められた細胞質内封入体。両染色性を示す封入体が、心筋線維の筋形質に群在して認められる。(HE染色 ×825)

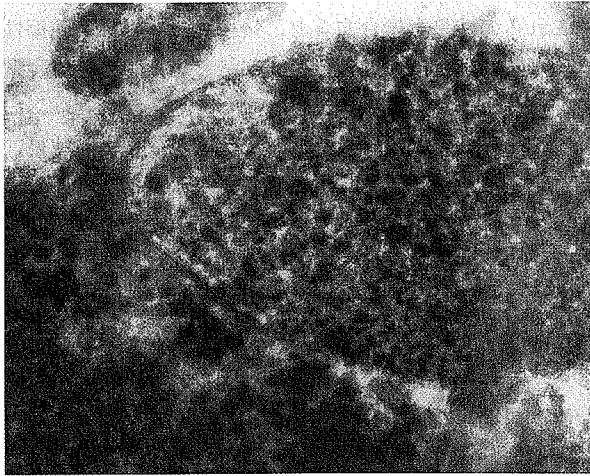


図5 野外例No. 2の心臓に認められた細胞質内封入体の電子顕微鏡写真。電子密度の高い球状物と微細粒子から構成されている。(酢酸ウラン・鉛染色 ×60,000)

その他の特殊染色では特徴的な所見は認められなかった。

線維肉腫の増殖巣内には鶏固有の機械受容器であるヘルプスト小体に類似した構造の増生が認められた。

野外例全例の心筋細胞においてHE染色で両染色性を示す細胞質内封入体が観察された(図4)。

野外例の免疫組織化学的所見：粘液腫および線維肉腫において腫瘍細胞はALV抗原陽性を示した。また、心筋細胞の細胞質内に認められた封入体もALV抗原陽性を示した。その他の免疫組織化学的検索では有意な所見は認められなかった。

野外例の電子顕微鏡学的検索：心筋細胞の細胞質内に認められた封入体は電子密度の高い球状物(直径50～80nm)から構成され、ALV感染で認められる基質封入体に類似していた(図5)。

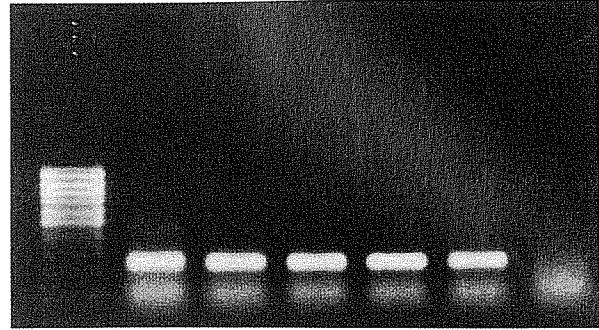


図6 RT-PCR法の電気泳動像。  
ALV-A亜群に特異的な246bpの増幅産物が認められる。  
M：サイズマーカー (Stable 100bp DNA Ladder)  
Nos. 1～5：検体の腫瘍組織  
N：陰性対照鶏の肝臓

野外例のRT-PCR法の結果：野外例6例全例から、ALV-A亜群に特異的な246bpの増幅産物が認められた(図6)。

接種実験例の肉眼所見：26例すべてが356日齢まで生存し、著変は認められなかった。

接種実験例の病理組織学的所見：実験鶏のうち7/26例(27%)の心筋細胞において細胞質内封入体が、9/26例(35%)で多発性腎嚢胞が、3/26例(12%)で腎腫瘍(線維腺腫2例、腺腫・線維腺腫混在1例)が認められた。

接種実験例の免疫組織化学的所見：2例で認められた腎腫瘍の腫瘍細胞はいずれもALV抗原陰性を示した。

接種実験例のRT-PCR法の結果：全血4/23例(17%)、肝臓21/24例(88%)および接種実験例の有精卵から得られた卵白4/5例(80%)、鶏腎細胞5/5例(100%)、初生雛肝臓5/5例(100%)においてALV-A亜群に特異的な246bpの増幅産物が認められた。

垂直感染実験例の肉眼所見：死亡鶏(141日齢)の羽翼部に最大直径3cmに至る腫瘤が2カ所に認められた。剖面では、腫瘤は被膜を有し、透明感のある黄白色を呈し、粘液が認められた。その他19羽の実験鶏(171日齢)に著変は認められていない。

垂直感染実験例の病理組織学的所見：羽翼部に形成された腫瘤は、粘液腫と診断された。腫瘤は、厚い被膜を有し、疎な膠原線維および弱好塩基性の粘液を伴う細紡錘形細胞の疎な増殖により構成されていた。マッソン・トリクロム染色では、腫瘍細胞間の膠原線維は鮮やかな青色を呈していた。アルシアンブルー染色では全域の腫瘍間質には淡青色を呈する豊富な酸性粘液が認められた。心筋細胞にHE染色で両染色性を示す細胞質内封入体が認められた。その他の臓器では著変は認められなかった。

垂直感染実験例の免疫組織化学的所見：1例で認めら

れた羽翼部皮下腫瘍の腫瘍細胞がALV抗原陽性を示した。

垂直感染実験例のRT-PCR法の結果：垂直感染実験鶏1例（死亡鶏141日齢）の肝臓1/1例においてALV-A亜群に特異的な246bpの増幅産物が認められた。

## 考 察

今回3採卵養鶏場の鶏群に認められた顔面および羽翼部の腫瘍は、組織学的検索の結果から粘液腫あるいは線維肉腫（粘液型）と診断された。免疫組織化学的検索において、両腫瘍の腫瘍細胞はALV抗原陽性を示したことから、腫瘍の病因としてALVが関与していることが示唆された。さらに、腫瘍組織のRT-PCR法の結果、ALV-A亜群に特異的な塩基配列の増幅が認められたことから、顔面および羽翼部の腫瘍形成に関与するALVはA亜群であると考えられる。

一部の線維肉腫の増殖巣内に鶏固有の機械受容器であるヘルプスト小体に類似した構造の増生が認められた。ヘルプスト小体は、哺乳類におけるファーテル・パチニ小体の相同器官といわれている [11]。ヘルプスト小体は鶏の皮膚および粘膜に分布し、おもに振動および食物に関する情報を得る機能を果たすといわれる [11]。現在までヘルプスト小体の腫瘍性病変の報告はなされていないが、医学分野では、ファーテル・パチニ小体の腫瘍性病変の報告があるため [6]、線維肉腫内で認められたヘルプスト小体類似構造の増生が腫瘍である可能性は否定できず、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

野外例全例の心筋細胞において両染色の細胞質内封入体が観察された。封入体は、光学顕微鏡および電子顕微鏡的にも、ALV感染で認められる基質封入体 [4] に一致していること、また、免疫組織化学的検索によりALV抗原陽性を示したことから、これらはALV感染により形成されたものと考えられる。

接種実験においては、顔面および羽翼部における腫瘍の形成は認められなかったものの、7/26例（27%）の心筋細胞にALVに起因する細胞質内封入体が、9/26例（35%）に多発性腎嚢胞が、3/26例（12%）に腎腫瘍がみられた。心筋細胞の細胞質内封入体は野外例に比較して数的に高頻度に認められた（野外例：1/30視野、実験鶏：1/5視野）ことより、実験鶏は野外例に比較してALVに濃厚感染しているのではないかと推察された。腎嚢胞については、通常、加齢性変性として捉えられるが、接種実験では、比較的若齢で認められたこと、多発性であることなどから、ALVに起因する腎嚢胞腺腫の可能性がある。

接種実験において認められた腎腫瘍の腫瘍細胞は、免疫組織化学的検索において、ALV抗原陰性を示した。しかし、腎腫瘍が3/26例（12%）という高い割合で発

生したことから、その形成には何らかの腫瘍誘発要因が関与している可能性が高く、ALV感染との関連が疑われた。

RT-PCR法の結果より、ALV-A亜群陽性率は、全血において17%と低値であったものの、卵白・鶏腎細胞・初生雛では高率（80～100%）に陽性を示した。Spencerら [9] の報告では、垂直感染率によるALV陽性率は、卵白では80%、胎子では45%であった。また、成書によるとALVはおもに水平感染により維持されているとの記述があり [10]、垂直感染率はそれほど高くないといわれている。これらに比較し、今回、RT-PCR法の結果より得られた垂直感染率は高いと考えられ、濃厚感染が成立した結果と思われる。

垂直感染実験では、1例の羽翼部に腫瘍が形成され、組織学的検索の結果、粘液腫と診断され、肉眼的および組織学的に、野外例に認められた腫瘍と同様の性状を有し、発生部位も類似していた。

これらの結果を総合すると、接種実験鶏では、腫瘍性病変が認められたものの、形成部位および腫瘍の表現型は野外例とは異なっていた。しかし、垂直感染実験においては、野外例と同様の部位および表現型を示す腫瘍性病変の再現がなされた。ALVが水平感染した鶏では、感染後の抗体産生により、ウイルスは中和され、免疫が低下した状況以外は、血中にウイルスは検出されないと考えられている [9]。いっぽう、垂直感染鶏は、ALV抗原に対して免疫寛容となり、常にウイルスが血中に存在し、ウイルス血症を呈しているといわれる [9]。垂直感染実験においてのみ野外例病変の再現が認められたのは、血中に常にウイルスが存在するという状況が反映した結果ではないかと思われる。

以上より、野外例に認められた顔面および羽翼部の腫瘍形成には、垂直感染が関与していることが推察され、また、野外例は垂直感染によりALVに感染し、発症時、ウイルス血症を呈していた可能性が高い。野外例は、養鶏場に導入後にALVに感染したのではなく、種鶏からの垂直感染により導入時にすでにALVに感染していたことが示唆された。

ALVにより誘発される腫瘍のうち、結合組織系腫瘍は1%以下といわれるが [7]、垂直感染実験において、野外例と同様の組織像を示す粘液腫・線維肉腫などの結合組織系腫瘍が再現された。一般にALVによる発生が1%以下といわれる結合組織系腫瘍が、垂直感染実験鶏において野外例と同部位に発生したことから、野外例に感染したALVは、顔面あるいは羽翼部に、特異的に粘液腫・線維肉腫を誘発するウイルス株である可能性が示唆された。ウイルスの組織特異的な腫瘍原性には、*env* 遺伝子やLTRが重要な役割を果たすといわれているが [2]、今回検索を行ったウイルスは、なぜ、顔面および

羽翼部に特異的に結合組織系腫瘍を形成するのかわについては、さらなる検索が必要であると思われる。

#### 引用文献

- [1] Blackall PJ, Matsumoto M, Yamamoto R : Diseases of Poultry, Calnek BW, et al eds, 10th ed, 179-190, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (1997)
- [2] Brown DW, Robinson HL : J Virol, 62, 4828-4831 (1988)
- [3] Dennis JA : Diseases of Poultry, Calnek BW, et al eds, 10th ed, 541-569, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (1997)
- [4] Gilka F, Spencer JL : Am J Vet Res, 46, 1953-1960 (1985)
- [5] 御領政信 : 鶏病研報, 35 (増刊号), 5-15 (1999)
- [6] MacLennan SE, Melin-Aldana H, Yakuboff KP : J Hand Surg, 24, 413-416 (1999)
- [7] Payne LN, Fadly AM : Diseases of Poultry, Calnek BW, et al eds, 10th ed, 414-466, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (1997)
- [8] Pham TD, Spencer JL, Johnson ES : J Virol Meth, 78, 1-11 (1999)
- [9] Spencer JL, Crittenden LB, Burmester BR, Okazaki W, Witter RL : Avian Dis, 21, 331-345 (1977)
- [10] 塚本健司 : 鶏病研報, 34, 211-217 (1998)
- [11] Zelena J, Halata Z, Szeder V, Grim M : Anat Embryol, 196, 323-333 (1997)

### Pathological and Experimental Studies of Giant Facial Masses in Commercial Layer Hens

Sanami HIRATA\*, Masanobu GORYO† and Kosuke OKADA

\* Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda 3-18-8, Morioka, 020-8550, Japan

#### SUMMARY

Pathological and etiological field examinations were made to six commercial layer hens with giant facial masses from three farms. The masses in the field cases were diagnosed histologically as myxoma or fibrosarcoma (myxomatous type). In immunohistochemical terms, cells from each tumor were positive for the group-specific ALV antigen. Specific amplifications of subgroup A ALV genes obtained by means of the PCR method suggest that subgroup A ALV could play a part in tumor formation. Experimental studies were performed on two groups : (1) chickens inoculated with homogenates of tumor tissues from field cases and (2) vertically infected chickens hatched from eggs of chickens inoculated with tumor-tissue homogenates. Vertically infected chickens reproduced myxomas similar to those found in field cases, whereas inoculated experimental chickens did not. — Key words : fibrosarcoma (myxomatous type), giant facial mass, layer hen, myxoma, subgroup ALV-A.

† Correspondence to : Masanobu GORYO (Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Iwate University) Ueda 3-18-8, Morioka, 020-8550, Japan TEL 019-621-6217 FAX 019-621-6274

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 58, 671 ~ 675 (2005)

募 集

## 獣 医 師 募 集

募集人員 : 1名

業務内容 : 契約酪農場のコンサルテーション, 繁殖管理及び一般診療.

採用条件 : 酪農に興味のある方. 新卒, 既卒, 臨床経験は問いません.

待遇など : 過去の経験, 前職給を考慮し, 面談の上決定します.

連絡先 : 〒677-0054 兵庫県西脇市野村町490-4

(有)安田家畜診療所

☎0795-24-1885

E-mail : tflatt@silver.ocn.ne.jp