

筋胃びらんを特徴とする若齢鶏の鶏アデノウイルス感染症

豊嶋 愛, 佐々木 淳, 倉持 好, 川崎武志¹⁾, 御領政信[†]

岩手大学農学部獣医病理学研究室, 〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

¹⁾人と鳥の健康研究所, 〒099-3119 網走市鱒浦 2-7-1

要 約

封入体肝炎 (IBH) により 10 日齢ごろから死亡率が増加 (約 0.2%) し, 約 1 週間で終息した鶏群のうち重度の筋胃びらんを示した症例から鶏アデノウイルス (530-20 株と命名) を分離し, ひなに対する病原性について実験的に検討した。筋胃の 10% 乳剤を作製, その上清を鶏腎 (CK) 細胞に接種し, 細胞変性効果 (CPE) を検索, 3 代継代し, その培養上清を実験鶏へのウイルスの接種材料とした。P2 系 SPF 鶏由来初生ひなを供試鶏としてこの株 (0.1 ml/羽) を接種した。さらに, 臓器親和性を検討するために, 初代筋胃乳剤をひなに経口接種後, そのひなの肝臓, 脾臓, 筋胃乳剤を各々別のひなで継代した。肝臓乳剤由来ウイルス, 脾臓乳剤由来ウイルスは筋肉内接種, 筋胃乳剤由来ウイルスは経口接種で各々 3 代, 4 代, 3 代継代した。しかし肝臓継代群では 3 代継代するうちに病変形成が認められなくなった為, 脾臓継代株と筋胃継代株接種群の体重, 肝臓, 卵黄囊, および脾臓の重量測定と全身諸臓器の病理組織学的検索を行った。

CK 細胞での培養は重度の CPE を示し, CK 細胞への親和性が高いことが示唆され, 電子顕微鏡検索にて培養細胞内にアデノウイルス粒子が確認された。接種実験では全群において, 死亡率は非常に低かった。接種鶏の剖検では 7 日目から筋胃びらんが目立ち始め, 特に経口接種群および筋胃継代株接種群の 14 日目では重度に発現していたが, その後は軽度となった。病理組織学的検索では 7 日目に筋胃の腺上皮細胞や脾臓の腺房細胞に好塩基性核内封入体が多数認められた。これらのことから, 最近のアデノウイルス感染症でも, IBH だけでなく筋胃びらんを起こすトリアデノウイルスが存在すること, 野外材料中には単一臓器に対してだけでなく, 筋胃あるいは脾臓にも親和性を示す鶏アデノウイルスが存在することが明らかになった。

キーワード: 鶏アデノウイルス感染症, 筋胃びらん, 封入体肝炎, 封入体脾炎, 若齢鶏

緒 言

鶏アデノウイルス感染症 fowl adenovirus infections (FAI)^{5,6,13)} はグループ I トリアデノウイルスに起因し, 封入体肝炎 inclusion body hepatitis (IBH), 筋胃びらん, 心膜水腫症候群, 壊死性脾炎⁸⁾ および呼吸器病といった多様な病態を発現することが報告されており, 産卵低下, 増体抑制および呼吸器症状の一因ともなる可能性が示唆されている。

IBH は主に 3 から 7 週齢のプロイラー鶏に発生する致死率 10 から 30% の感染症であり, 感染 3 から 4 日後に死亡率のピークを迎える⁶⁾。肉眼的には肝臓の腫大,

脆弱化, および点状出血が認められ, 病理組織学的には核内封入体を伴う壊死性肝炎を特徴としている。接種実験により野外発生例と類似の肝病変が再現されているが, 野外例と同程度の病変の再現は容易ではなく, 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) や鶏貧血ウイルス (CAV) との混合感染に起因する免疫抑制あるいは増強作用が示唆されている^{6,18,19,23)}。IBH は一時その発生が減少傾向にあったが^{1,9,13)}, 2009 から 2010 年にかけて, 東北, 関東, 東海, 関西, 四国, 九州のプロイラーひなにおいて, 急死が 10 日齢頃から始まり, 14 日齢頃までに終息する IBH の発生^{3,9)} がしばしばみられており, 注目を集めている。発生率は 1.2 から 17% と様々であるが, 3% 程度の発生が多かった⁹⁾。このような近年の発生例は, 幼若ひなに発生がみられること^{1,4,9,11,17,22)}, 同じ鶏種由来のひなで発症していること, 原因ウイルスは近

2012 年 7 月 20 日受付

[†] 連絡責任者: 御領政信

鶏病研報 49 巻 2 号, 101~111 (2013)

縁であったことなどから、鶏アデノウイルスに対する移行抗体価の低下などといった何らかの共通の疫学的要因があった可能性が示唆されている³⁾。また最近のFAIの病理学的特徴として筋胃びらんや封入体膀胱といったIBH以外の病変を主徴とすること^{1,4,13,15,16,20,21)}も挙げられている。

筋胃びらん gizzard erosion^{1,5,6,13)}は、日本ではTanimuraらによって1993年に採卵鶏で初めて報告²⁰⁾され、1998年頃からブロイラーで多発した。さらに2001年には17日齢のブロイラーひなでの発生が報告され¹⁾、現在若齢ブロイラーの死亡率の増加の原因として^{1,4,5,13)}問題となっている。筋胃びらんは肉眼的には筋胃粘膜におけるびらんと出血が、組織学的には筋胃粘膜の腺上皮細胞における好塩基性核内封入体形成が特徴的に認められる。原因ウイルスの血清型は1もしくは8型に分類されることが多く^{5,12)}、一般的に他の臓器・組織の病変は軽度もしくはほとんど認められない¹³⁾。

われわれはこれまでに、従来報告されている臓器・組織の他に卵黄囊上皮細胞にも親和性を示し、核内封入体を形成する鶏アデノウイルス感染を報告することで、卵黄囊上皮細胞もトリアデノウイルスの標的細胞となることを明らかにしてきた^{2,11)}。一方、これまで膀胱に親和性を示す封入体膀胱についても報告し、発育不良との関連性について示唆してきた^{19,22)}。

今回、最近の野外若齢ブロイラーひなにおける封入体肝炎症群のうち、顕著な筋胃びらんを示す症例に遭遇し、病理学的に検索をするとともに筋胃より鶏アデノウイルスの分離・同定を行い、分離ウイルスを用いた感染実験を行った。さらに臓器親和性を検討するために、肝

臓、脾臓、あるいは筋胃感染臓器乳剤による鶏継代を行い、その病原性についても検討した。

材料と方法

1. 供試鶏

感染実験鶏および組織培養には、当研究室で維持している白色レグホン種P2系SPF鶏由来有精卵を孵化して用いた。実験鶏群は雌雄鑑別を行わず、水道水を給水し、育雛用市販飼料を給餌して飼養した。実験は岩手大学動物実験委員会の承認を得て実施し、ひなは炭酸ガス殺後に剖検した。

2. 野外発生例の病歴

あるブロイラー鶏農場において、発病は10日齢頃より死亡率の増加(約0.2%)としてみられ、その後1週間程度で終息した(図1)。死亡鶏では封入体肝炎が多く認められたが、なかには顕著な筋胃びらんを示す症例が含まれており、この中の1例の筋胃の凍結材料とホルマリン固定材料を採取した。

3. 接種材料の調整

野外例の凍結筋胃材料から、ガラスホモゲナイザーによる摩砕と凍結融解法にて10%乳剤を作製し、その遠心上清(3,000 rpm, 5分間)をウイルス分離材料として用いた。

4. ウイルス分離方法

鶏腎(CK)細胞の調製は常法に従い初生ひなの腎臓を無菌的に採材し、0.25%トリプシン液消化にて細胞を分散し、10%牛胎子血清加イーグルMEM培地に浮遊させて細胞液とし、細胞懸濁液を60mmシャーレに入れ、37℃、5%炭酸ガス濃度環境下で培養した。72時間

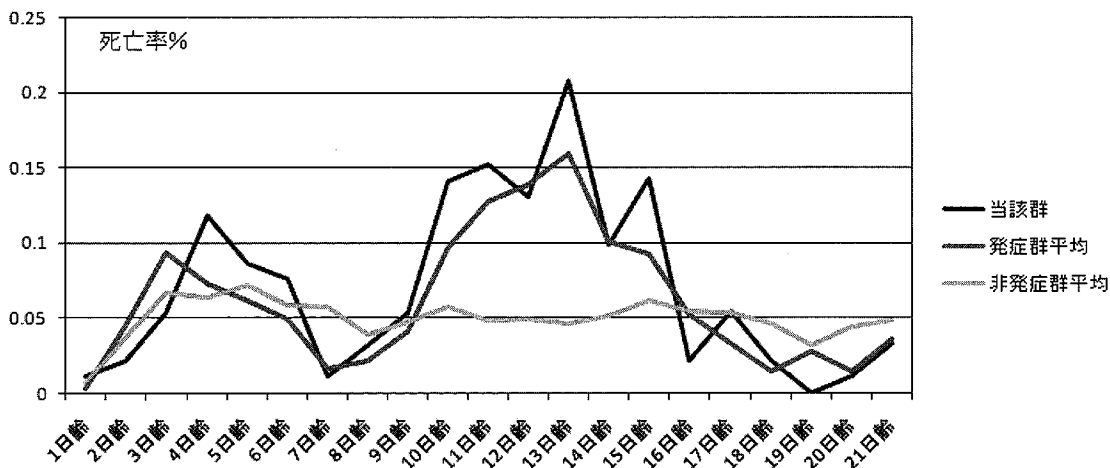


図 1. 野外鶏群の死亡率の推移

後にウイルス分離用乳剤の遠心上清を CK 細胞に接種し、細胞変性効果 (CPE) の発現をもって分離を確認した。今回分離されたウイルス株を 530-20 株と命名した。

530-20 株および対照として最近分離されひなに対して強い病原性を持ち、IBH を起こす鶏アデノウイルス (8754 株)²⁾ を CK 細胞に接種し、実体顕微鏡にて 24 時間ごとに CPE の有無を観察した。さらにカバースリップ培養を行い、ウイルス接種後、530-20 株では 72 時間、8754 株では 96 時間でカバースリップを回収し、ブアン固定後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。

5. 電子顕微鏡検索

530-20 株を接種した CK 細胞をトリプシン-EDTA 液で剥がし、PBS で 3 回洗浄し、遠心によって細胞を集めた。これらの細胞塊を 5% グルタルアルデヒドで前固定、1% オスミウム酸で後固定した。固定、脱水、脱脂および包埋の操作は 1.5 ml エッペンドルフ内で、作業段階ごとに遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) によって材料を沈下させて行った。定法に従いエボン 812 で包埋し、ウルトラマイクロームにて 100 nm の超薄切切片を作製した。酢酸ウラニル・鉛の二重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (JSM-2100, JEOL 製) にて観察した。

6. 感染実験

1) 実験 1 (野外例筋胃乳剤接種実験)

530-20 株の CK 培養上清を、初生ひなに 0.1 ml/ ずつ大腿筋肉内接種 (12 羽) および経口接種 (52 羽) した。死亡雛は随時、生残雛のうち大腿筋肉内接種群は接種 2, 5, 7 日目 (3~6 羽ずつ) に、経口接種群は接種 2, 5, 7, 14, 21 日目 (5~13 羽ずつ) に剖検に供した。また経口接種群については、剖検時に体重、肝臓、卵黄囊の重量測定を行った。

2) 実験 2 (組織親和性継代実験)

ウイルスの臓器親和性を明らかにするために、初代筋胃乳剤をひなに経口接種後、そのひなの肝臓、脾臓、筋胃乳剤を各々別のひなで継代した。肝臓乳剤由来ウイルス、脾臓乳剤由来ウイルスは筋肉内接種、筋胃乳剤由来ウイルスは経口接種で各々 3 代、4 代、3 代継代した。しかし、肝臓継代株では 1 代目からほとんど病変を形成せず、継代するうちに病変が全く形成されなくなったため、脾臓および筋胃継代株接種を実験の対象とすることとした。4 代目脾臓継代株接種群 (20 羽) は筋肉内投与、3 代目筋胃継代株接種群 (17 羽) は経口接種とした。死亡したひなは随時、生残雛は接種後 4, 7, 14 日目 (5~7 羽ずつ) に剖検に供した。また、体重、肝臓、卵黄囊および脾臓の重量測定を行った。

対照群として P2 系 SPF 鶏由来のウイルス未接種初生

ひな 23 羽を用いて、実験 2, 5, 7, 14, 21 日目 (4~7 羽ずつ) に剖検に供した。

7. 病理組織学的検索

感染実験群および未接種対照群の主要臓器、ファブリキウス嚢および卵黄嚢を採材後、10%ホルマリン液にて固定を行い、常法に従いパラフィン包埋ブロックを作製した。これをマイクロームにて 4 μ m に薄切し、HE 染色標本作製、病理組織学的に検索した。

成 績

1. 野外例筋胃の肉眼所見および病理組織学的所見

肉眼的には、筋胃粘膜面に重度の出血を伴ったびらんが認められ、黒色で水腫性に肥厚していた (写真 1)。病理組織学的には、びらん部ではケラチノイド層の棚状肥厚、粗鬆化、剥離および筋胃腺上皮細胞の変性・壊死が重度であった。腺上皮細胞では、核の膨化および好塩基性核内封入体の形成が認められた (写真 2)。核内封入体は核全体を占め、Cowdry A 型と Full 型の両方がみられた。粘膜固有層から筋層にかけては、偽好酸球、リンパ球およびマクロファージの重度な浸潤と筋線維の萎縮および顆粒状変性が認められた。

2. ウイルス接種した CK 細胞の所見

1) CK 培養細胞所見

実体顕微鏡下において、臓器乳剤の遠心上清を接種した初代培養の CK 細胞に円形化の CPE が認められた。接種 24 時間目から観察された CPE は、8754 株よりも 530-20 株を接種した細胞でより重度であり、ほとんどの細胞が剥離して浮遊していた。

カバースリップの HE 染色標本では、どちらの株を接種した CK 細胞にも核内に多数の好塩基性封入体が形成されていた (写真 3)。530-20 株では、72 時間で多くの細胞が剥離し、白く抜けた部分が広く確認できたのに対し、8754 株では 96 時間後も CK 細胞の剥離はほとんど認められなかった (写真 3)。

2) 電子顕微鏡学的検索

530-20 株接種培養細胞の電子顕微鏡による観察では、CK 細胞の核内に結晶状配列を示すウイルス粒子の集積と高電子密度物質 (写真 4) が認められた。ウイルス粒子は直径約 70 nm、円形から六角形を呈し、コアとカプシドから形成されていた。コアの電子密度が低い未熟な粒子から、電子密度の高い成熟粒子までが認められた。

3. 分離ウイルスを用いた感染実験

1) 実験 1

a. 臨床経過

大腿筋肉内接種群および経口接種群ともに、接種後 3

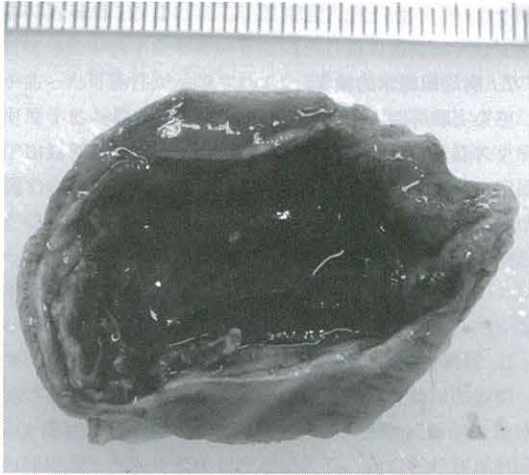


写真 1. 野外例の筋胃肉眼写真。重度の出血とびらんが見られ、黒色水腫様を呈している。

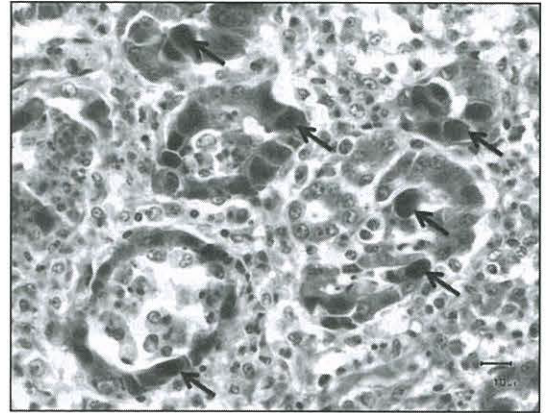


写真 2. 野外例筋胃。HE 染色。腺上皮細胞の核は腫大し、核内に好塩基性封入体(矢印)が認められる。

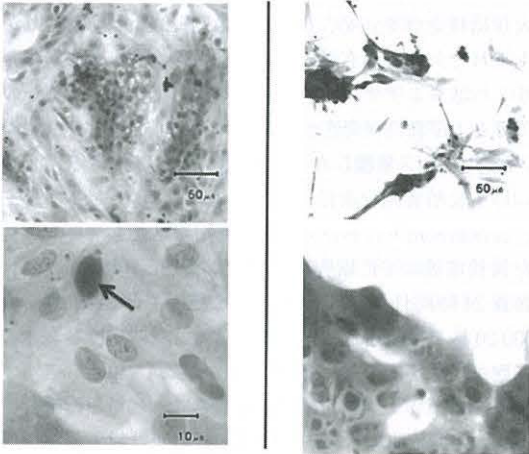


写真 3. 従来の 8254 株(左, 96 時間後)および 530-20 株(右, 72 時間後)のカバースリップ標本。HE 染色。それぞれ上が弱拡大, 下が強拡大。530-20 株では培養細胞の剥離が目立つ。矢印は核内封入体。

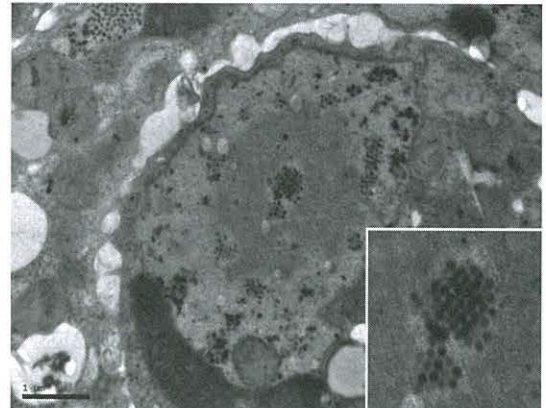


写真 4. 530-20 株接種 CK 細胞の電子顕微鏡像。酢酸ウラニル・鉛二重染色。核内に結晶状配列を呈す、ウイルス粒子の集積が認められる。

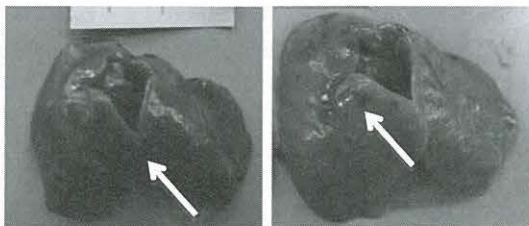


写真 5. 経口投与群。接種後 14 日目(左)および 21 日目(右)の肝臓肉眼写真。緑色肝, 出血巣(白矢印), 肥大が認められる。

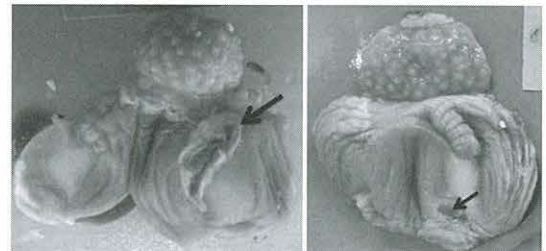


写真 6. 経口投与群。接種後 7 日目(左)および 21 日目(右)の筋胃肉眼写真。7 日目の広範なびらんに対し, 21 日目は軽度である。

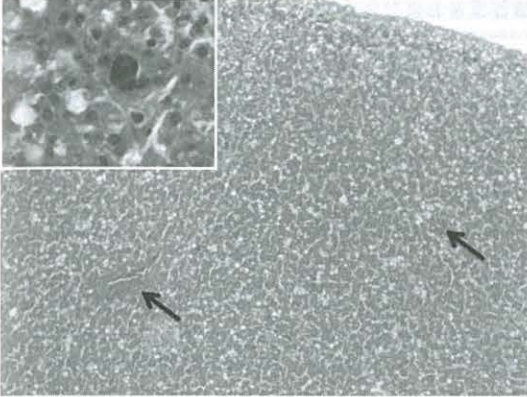


写真 7. 大腿筋肉内接種群。接種後 7 日目の肝臓。HE 染色。限局性の細胞浸潤 (矢印), 肝細胞の空胞変性および核内封入体が認められる。

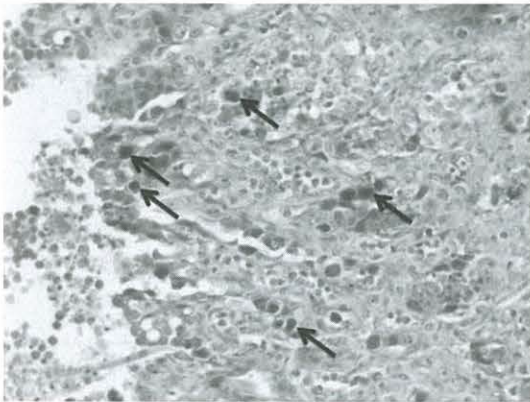


写真 9. 写真 8 の強拡大像。HE 染色。腺上皮細胞に好塩基性核内封入体 (矢印) が多数認められる。

日目から軽度の沈鬱が認められた。大腿筋肉内接種群では接種後 4, 6 日目に 1 羽ずつ, 経口接種群では接種後 2, 3, 4 日目に 1 羽ずつ, 5 日目に 5 羽が死亡した。

b. 肉眼病変

大腿筋肉内接種群の生残鶏では, 接種後 7 日目に軽度から重度の肝臓の腫大, 褪色, 斑状変色巣, 脆弱化および出血巣がみられた (写真 5)。卵黄嚢は接種後 4 から 7 日目において, 死亡鶏, 生残鶏ともに個体により重量のばらつきが大きかった。筋胃ではびらんが認められたのは接種 7 日目に 1/5 羽のみであった。

経口接種群の生残鶏の肝臓および卵黄嚢における所見は大腿筋肉内接種群と同様であった (表 1, 写真 5)。筋胃では接種後 5 から 21 日目の幅広い期間でびらんが観察された。特に接種後 7 および 14 日目では重度のびら

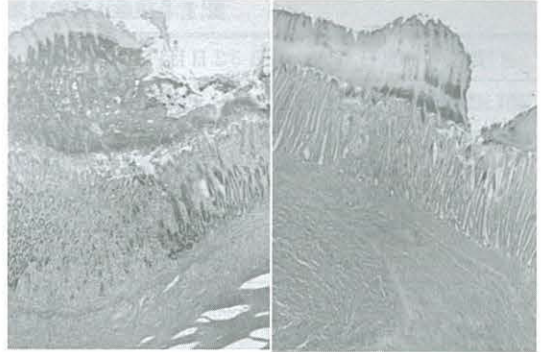


写真 8. 経口投与群筋胃。接種後 7 日目 (左) および 21 日目 (右)。HE 染色。7 日目ではケラチノイド層の剥離, 腺上皮細胞の広範な脱落および粘膜固有層での細胞浸潤がみられる。21 日目では軽度の炎症および線維化がみられる。

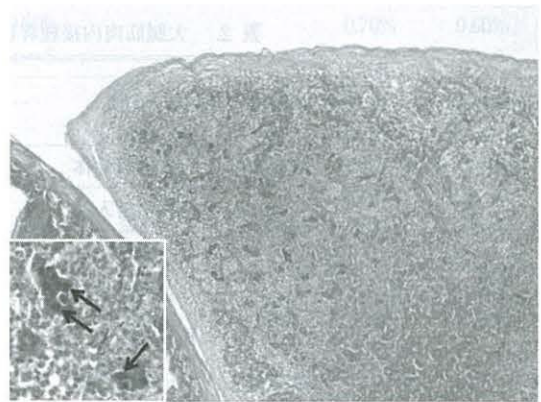


写真 10. 経口投与群。接種後 7 日目の脾臓。HE 染色。残存した腺房細胞に好塩基性核内封入体 (矢印) が多数認められる。

んが認められ, 21 日目では筋胃粘膜の癒痕化がみられた (写真 6)。

肝臓および卵黄嚢の対体重比は対照群に比べ高く, 腫大および卵黄嚢の残存傾向がみられた (表 1)。その他の臓器における病変は認められなかった。また, 未接種対照群では著変は認められなかった。

c. 病理組織学的成績

病理組織学的検査では肝臓, 筋胃および脾臓において病変が認められた (表 2, 3)。生残鶏における肝臓では, 封入体肝炎が大腿筋肉内接種群および経口接種群の接種後 7 日目に各 2 羽でのみ認められた。肝実質の病変は軽度から中程度で, 限局性のリンパ球および形質細胞反応, 多発性の壊死巣形成, び慢性の線維素析出, 出血巣および肝細胞の空胞変性などが様々な程度で認められた (写

表 1. 実験 1 における平均臓器重量および体重比

群		2 日目	4 日目	5 日目	7 日目	14 日目	21 日目
経口投与群 (N=52)	体重 (g)	31.6±4.0 ^{a)}	36.7±1.8	44.5±4.1	42.0±6.7	59.2±17.8	96.2±14.6
	肝臓 (g)	1.5±0.3	2.0±0.2	2.4±0.2	2.5±0.3	3.6±0.8	4.7±0.7
	肝臓 / 体重	4.60%	5.30%	5.50%	6.00%	6.60%	5.00%
	卵黄囊 (g)	1.8±0.8	2.5±2.7	1.3±1.3	1.4±1.1	0.8±0.6	0.6±0.3
	卵黄囊 / 体重	5.80%	7.00%	3.00%	3.40%	1.40%	0.70%
	n 数	n=10	n=5	n=5	n=10	n=8	n=7
対照群 (N=23)	体重 (g)	31.2±2.0	-	35.7±2.3	54.1±4.6	82.1±8.2	125.0±15.3
	肝臓 (g)	1.48±0.3	-	1.9±0.3	2.7±0.3	2.7±0.2	3.5±0.5
	肝臓 / 体重	4.70%	-	5.20%	4.90%	3.30%	2.80%
	卵黄囊 (g)	0.85±0.2	-	2.5±0.9	0.88±0.7	0.33±0.1	0.9±1.0
	卵黄囊 / 体重	2.70%	-	5.30%	1.60%	0.40%	0.70%
	n 数	n=4	-	n=4	n=4	n=4	n=7

^{a)} 平均±標準偏差

表 2. 大腿筋肉内接種群における組織学的病変 (n=12^{b)})

部位	病変	接種日数		
		2	5	7
肝臓	核内封入体	0/4	0/3	2/5
	筋胃	核内封入体	0/4	0/3
筋胃	筋胃びらん	0/4	0/3	1/5
	脾臓	核内封入体	0/4	2/3
脾臓	炎症・濾胞形成	0/4	2/3	5/5
	卵黄囊	核内封入体	0/1	0/0 ^{a)}

^{a)} 細菌性炎症反応の激しいもの、卵黄囊が消失したものは除く

^{b)} 死後変化の激しいものは除く

表 3. 経口投与群における組織学的病変 (n=48^{b)})

部位	病変	接種後日数				
		2	5	7	14	21
肝臓	核内封入体	0/8	0/10	2/15	0/8	0/7
	筋胃	核内封入体	0/8	2/10	8/15	2/8
筋胃びらん		0/8	1/10	9/15	7/8	5/7
脾臓	核内封入体	0/8	0/10	6/15	0/8	0/7
	炎症・濾胞形成	0/8	0/10	6/15	8/8	7/7
卵黄囊	核内封入体	0/8	0/0 ^{a)}	0/10 ^{a)}	0/6 ^{a)}	0/7

^{a)} 細菌性炎症の激しいもの、卵黄囊が消失したものは除く

^{b)} 死後変化の激しいものは除く

表 4. 実験 2 における平均臓器重量および体重比

群		1 日目	2 日目	4 日目	5 日目	6 日目	7 日目	14 日目
脾臓継代株接種群 (n=20)	体重 (g)	26.1	-	29.7±3.9 ^{a)}	31.3	29.329	41.6±3.2	62.8±10.7
	肝臓 (g)	1	-	1.8±0.5	2.6	2	2.3±0.2	3.5±0.4
	肝臓 / 体重	3.80%	-	6.10%	8.30%	6.80%	5.40%	5.60%
	卵黄嚢 (g)	1.8	-	1.4±0.8	1.1	0.7	0.58±0.4	0.7±0.4
	卵黄嚢 / 体重	6.90%	-	4.60%	3.50%	2.40%	1.50%	1.10%
	脾臓 (g)	-	-	0.12±0.04	0.10%	0.10%	0.28±0.04	0.4±0.1
	脾臓 / 体重	-	-	0.40%	0.30%	0.30%	0.70%	0.60%
	n 数	n=1	-	n=5	n=1	n=1	n=5	n=7
筋胃継代株接種群 (n=17)	体重 (g)	-	-	32.2±2.8	-	-	42.1±6.2	67.8±13.8
	肝臓 (g)	-	-	2.3±0.2	-	-	2.5±0.4	3.6±0.7
	肝臓 / 体重	-	-	7.10%	-	-	5.90%	5.40%
	卵黄嚢 (g)	-	-	1.7±0.7	-	-	0.72±0.3	0.58±0.2
	卵黄嚢 / 体重	-	-	5.40%	-	-	1.80%	0.90%
	脾臓 (g)	-	-	0.17±0.03	-	-	0.30±0.1	0.45±0.2
	脾臓 / 体重	-	-	0.50%	-	-	0.70%	0.60%
	n 数	-	-	n=5	-	-	n=6	n=6
対照群 (n=20)	体重 (g)	-	31.2±2.0	-	35.7±2.3	-	54.1±4.6	82.1±8.2
	肝臓 (g)	-	1.48±0.3	-	1.9±0.3	-	2.7±0.3	2.7±0.2
	肝臓 / 体重	-	4.70%	-	5.20%	-	4.90%	3.30%
	卵黄嚢 (g)	-	0.85±0.2	-	2.5±0.9	-	0.88±0.7	0.33±0.1
	卵黄嚢 / 体重	-	2.70%	-	5.30%	-	1.60%	0.40%
	脾臓 (g)	-	0.07±0.01	-	0.1±0.03	-	0.29±0.1	0.49±0.02
	脾臓 / 体重	-	0.20%	-	0.30%	-	0.50%	0.60%
	n 数	-	n=4	-	n=4	-	n=4	n=4

^{a)} 平均±標準偏差

真 7)。死亡鶏では大腿筋肉内接種群および経口接種群ともに肝細胞の空胞変性および軽度から中程度のうっ血が観察された。

生残鶏の筋胃では、経口接種群の接種後 5, 7, 14 日目において、腺上皮細胞に好塩基性核内封入体が個体により様々な頻度で認められた (写真 8, 9)。封入体が認められた核は通常の 2 ないし 3 倍に腫大し、封入体は核全体を均一に満たしており、Cowdry A 型と Full 型の両方が観察された。大腿筋肉内接種群では筋胃粘膜に核内封入体は認められなかった。筋胃びらんは、特に経口接種群の接種後 5, 7, 14, 21 日目の多くの個体でみられ、その程度は接種後 14 日目をピークとして日数の経過とともに軽度なものとなり、21 日目には粘膜固有層における線維化が認められた (写真 8)。びらん部ではケラチノイド層の棚状肥厚、粗鬆化、剥離および筋胃腺上皮細胞の変性・壊死が重度であった。粘膜固有層から筋層にかけては、偽好酸球、リンパ球およびマクロファージ

の重度な浸潤と筋線維の萎縮および顆粒状変性が認められた。

脾臓では死亡例を除いて、大腿筋肉内接種群の接種後 5, 7 日目および経口接種群の接種後 7 日目で、腺房細胞における好塩基性核内封入体が認められた。接種後 7~14 日目では脾臓実質の多発性壊死が、接種後 14~21 日目では脾臓間質の線維増生、濾胞形成を伴うリンパ球、形質細胞および組織球浸潤がみられた (写真 10)。

大腿筋肉内接種群・経口接種群とも卵黄嚢では、細菌集塊および肉芽腫の形成などがみられたが、卵黄嚢上皮細胞に好塩基性核内封入体は認められなかった。

その他の臓器で著変は認められなかった。また、未接種対照群で著変は認められなかった。

2) 実験 2 (臓器親和性継代実験)

a. 臨床経過

全実験群において、接種後 3 日目から軽度な沈鬱が認められた。脾臓継代株接種群では接種後 1, 5, 6 日目に

表 5. 脾臓継代株接種群における組織学的病変 (n=19^{b)})

部位	病変	接種後日数				
		4	5	6	7	14
肝臓	空胞変性, 細胞浸潤など	5/5	1/1	1/1	5/5	7/7
筋胃	核内封入体	0/5	0/1	0/1	0/5	0/7
	筋胃びらん	1/5	0/1	1/1	4/5	6/7
脾臓	核内封入体	0/5	0/1	1/1	4/5	0/7
	炎症・濾胞形成	2/5	0/1	2/3	4/5	7/7
卵黄囊	核内封入体	0/2 ^{a)}	0/1	0/0 ^{a)}	0/0	0/0 ^{a)}

a) 細菌性炎症の激しいもの、卵黄囊が消失したものは除く

b) 死後変化の激しいものは除く

表 6. 筋胃継代株接種群における組織学的病変 (n=17)

部位	病変	接種後日数		
		4	7	14
肝臓	空胞変性, 細胞浸潤など	5/5	4/6	2/6
筋胃	核内封入体	0/5	1/6	1/6
	筋胃びらん	0/5	5/6	5/6
脾臓	核内封入体	0/5	3/6	0/6
	炎症・濾胞形成	0/5	4/6	0/6
卵黄囊	核内封入体	0/5	0/1 ^{a)}	0/4

a) 細菌性炎症の激しいもの、卵黄囊が消失したものは除く

1羽ずつ死亡例がみられたが、その他の群では死亡はみられなかった。

b. 肉眼病変

肝臓継代株接種群では、継代した1から3代まで封入体肝炎は認められず、筋胃と脾臓にも病変は認められなかった。

脾臓継代株接種群では対照群と比較して、脾臓の対体重比が接種後7日目で顕著に高く、腫大傾向を示していた(表4)。肝臓の対体重比は7および14日目に、卵黄囊の対体重比は14日目に対照群よりも高くなり、腫大および残存傾向を示した(表4)。この傾向は特に死亡鶏で顕著で、接種後14日目では2/7羽で脾臓に微小白斑が認められた。

筋胃継代株接種群では、接種後7日目に5/6羽、14日目に5/6羽で中程度から高度の筋胃びらんが認めら

れ、特に接種後7日目では重度であった。肝臓、卵黄囊および脾臓の対体重比の推移は脾臓継代株接種群と同様の傾向を示した(表4)。

その他の臓器では、全実験群において著変は認められなかった。また、未接種対照群で著変は認められなかった。

c. 病理組織学的成績

実験2における病理組織学的成績は、表5,6に示す通りである。肝臓継代株接種群は、1から3代まで継代したがIBHは認められなかった。筋胃と脾臓にも病変は認められなかった。脾臓継代株接種群では、剖検した全例の肝臓において空胞変性と細胞浸潤が認められた。核内封入体はどの症例にも検出されなかった。筋胃では4,6,7,14日目に筋胃びらんが認められたが、核内封入体は認められなかった。また脾臓では接種後7日目で脾臓

実質の散発性壊死を伴う好塩基性核内封入体が腺房細胞に認められた。接種後 14 日目では、脾臓間質の線維増生、濾胞形成を伴うリンパ球、形質細胞および組織球浸潤が高度にみられた。

筋胃継代株接種群では、接種後 7、14 日目に認められた筋胃びらんの領域で、腺上皮細胞核内における封入体形成が認められた。封入体の出現は接種 7、14 日目ともに 1/6 羽であった。びらん部ではケラチノイド層の剥離および筋胃腺上皮細胞の変性・壊死が重度に認められた。粘膜固有層から筋層にかけては、偽好酸球、リンパ球およびマクロファージの重度な浸潤と筋線維の萎縮および顆粒状変性が認められた。

脾臓継代株接種群および筋胃継代株接種群において、病変がみられた臓器の組織像はほぼ同様であり、その他の臓器では全実験群において著変は認められなかった。また、未接種対照群で著変は認められなかった。

考 察

IBH により死亡率が上昇した野外例ブロイラー鶏群に含まれていた、顕著な筋胃びらんを示す症例の筋胃を病理組織学的に検索したところ、腺上皮細胞に核内封入体形成が認められた。したがって過去に報告されているアデノウイルスに起因する筋胃びらん^{1,5,7,14})に一致するものと考えられた。従来アデノウイルスに起因する筋胃びらんは出荷時期での発生が一般的であったが^{5,6,20,21})、最近では若齢ブロイラーにおいて死亡を伴う封入体性筋胃びらんが報告されている^{1,4,5,14})。今回の症例は 2 週齢前後のひなで発生していることから、若齢で発症した FAI と診断された。

野外例の筋胃乳剤を接種した CK 細胞では、初代から円形化の CPE がみられ、カバースリップの HE 染色標本では従来の染色態度と類似する^{7,14,21})核内封入体が観察された。しかしながら今回分離された 530-20 株は、ひなに対して強い病原性をもち IBH の原因となる 8754 株と比較して、培養細胞が広範に剥離するという非常に強い CPE を示し、従来の強毒株とは異なる傾向を示した。電子顕微鏡検索において、CK 細胞の核内で認められたウイルス粒子は大きさと形態からアデノウイルス⁶)と同定された。

分離ウイルスを用いた接種実験では、経口接種群において野外例の筋胃病変と同様の病変が再現されたが、死亡したのは 52 羽中 8 羽のみであった。筋胃びらんの発現およびその後の経過については、過去の報告^{1,13,15,20})に一致するものであった。IBH が認められた個体の割合は低く、ほとんどの病変は比較的軽微であり、典型的

な病態は作出されなかった。

肝臓、脾臓および筋胃を出発材料とした継代実験において、肝臓継代株では IBH の病変は形成されなかったものの、脾臓および筋胃継代株では、封入体脾炎や封入体性筋胃びらんを再現することができた。グループ I トリアデノウイルスに起因する疾患として総説⁹)では、IBH、呼吸器病、心膜水腫症候群、筋胃びらん、封入体脾炎と多様な病態があげられているが、実験成績から今回の野外例から分離されたウイルス株は筋胃びらんと封入体脾炎を惹起する病原体ではないかと考えられた。これらの結果は、野外材料中には単一な起病性の病原体だけでなく、異なる臓器に親和性を示す複数のトリアデノウイルスが存在する可能性^{8,12,21})を示唆するとともに、筋胃びらんもしくは封入体脾炎では、IBH の病変は軽微または伴わないという過去の報告^{13,15,20})に一致するものであった。また幼雛では原因不明の筋胃びらんが存在¹³)するが、ウイルス性のびらりは飼料中の有害化学物質に起因するびらんと比較して、重度の炎症反応がみられるという報告¹⁶)がある。本実験でびらんを形成した症例では組織学的に粘膜固有層から個体によっては筋層に至るまで炎症が波及しており、この報告を支持するものと思われた。

トリアデノウイルスは主に糞便中に排泄され、経口摂取で伝播することが知られているが、近距離の空気感染や、介卵感染も報告^{6,13,14})されている。現在 FAI の予防対策には、一般的衛生管理の徹底⁵)、オールイン・オールアウト方式の採用¹⁰)、ストレス等免疫抑制因子の軽減^{5,10})が重要視される。鶏舎に設置される給水器はウイルスの汚染源となりやすいため、糞便などに汚染されないような工夫および定期的な洗浄が必須となる。自動給水器ではニップル型が有効である¹⁰)。若齢ブロイラーひなの感染経路は経口感染の他、農場に出入りする人や野鳥が持ち込む可能性が考えられるが、ブロイラー鶏の入雛時には徹底した消毒や清掃が行われる¹⁰)ことから、これらの侵入経路は否定的ではないかと思われる。一方、飼料に混入したウイルスに起因することも考えられる¹⁰)が、これらについての証明は未だなされていない。また IBH 発生がみられる鶏種はトリアデノウイルスに対して抗体陰性であることが多く、感染経路の一つとして移行抗体のない系統での垂直感染が疑われている。しかし最近の事例では、未発症同居鶏も、病鑑鶏と同様に移行抗体を保有していなかった³)。また筋胃びらんにおいては、移行抗体の高低に関わらず、トリアデノウイルス感染による再現^{7,13})が示されている。野外例 FAV のその他の発生要因として、IBDV や CAV に起因する免疫抑

制あるいは混合感染による増強作用が示唆^{6,18,19,23)} されているが、プロイラー鶏の革新的な遺伝的改良の結果による免疫機能の低下も一因として指摘されている^{10,18)}。いずれにせよ、野外におけるトリアデノウイルスの鶏群への侵入経路に関しては、今後詳細に検討していく必要があるのではないと思われる。

FAIの代表的な病態としてIBHが従来から重要視されてきたが、近年のFAIでは筋胃びらんなどその他の症状を主徴とするものが増加傾向にあり^{1,4,5,7,12,13,15,16,20,21)}、若齢プロイラーひなの死亡率増加および食鳥処理時に本症が発見され廃棄対象となることで、砂肝(食用筋胃)の確保に支障を来している^{4,12)}。様々な臓器に親和性を示す^{6,11)} FAIの病態についての検討は、養鶏における経済的損害の低減に有効であり、予防対策を考えるうえで重要になるとと思われる。

文 献

- 1) Abe, T. *et al.* : Gizzard erosion in broiler chicks by group I avian adenovirus. *Avian Dis.* 45, 234-239 (2001)
- 2) 福岡寛之ら：プロイラーひなの卵黄囊上皮細胞に感染性を示す鶏アデノウイルス感染症. 鶏病研報 46, 181-187 (2010)
- 3) 井上大輔ら：三重県における近年の鶏封入体肝炎の発生と鶏アデノウイルスの浸潤状況. 鶏病研報 48, 13-19 (2012)
- 4) 伊藤裕子ら：若齢肉用鶏群における鶏アデノウイルス感染による筋胃びらんの発生および再現実験. 日獣会誌 60, 639-644 (2007)
- 5) 鶏病研究会：鶏のアデノウイルス感染症. 鶏病研報 46, 85-94 (2010)
- 6) McFerran, J.B., Adair, B.M. : Group I adenovirus infections. pp. 214-227. *In* : Diseases of Poultry, 11th ed., (Saif YM *et al.* eds.), Iowa state Press, Iowa (2003)
- 7) Muroga, N. *et al.* : Pathogenicity of fowl adenovirus isolated from gizzard erosions to immuno-suppressed chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 289-291 (2006)
- 8) Nakamura, K. *et al.* : Pancreatic necrosis and ventricular erosion in adenovirus-associated hydropericardium syndrome of broilers. *Vet. Pathol.* 39, 403-406 (2002)
- 9) 中村菊保：最近のトリアデノウイルスによる鶏の病態. 鶏病研報(増刊号) 46, 9-14 (2010)
- 10) 中村政幸：プロイラーにおける衛生管理. P.143. 家禽学, 奥村純市, 藤原昇編, 朝倉書店, 東京 (2000)
- 11) 尾形透ら：封入体肝炎由来トリアデノウイルス3株の卵黄囊上皮細胞への感染性. 日獣会誌 65, 37-41 (2012)
- 12) Okuda, Y. *et al.* : Pathogenicity of serotype 8 fowl adenovirus isolated from gizzard erosions of slaughtered broiler chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1561-1566 (2004)
- 13) 小野雅章：トリアデノウイルス感染症. pp. 46-49. 鳥の病気, 7版, 鶏病研究会編, つくば (2010)
- 14) Ono, M. *et al.* : Reproduction of adenoviral gizzard erosion by the horizontal transmission of fowl adenovirus serotype 1. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 1005-1008 (2007)
- 15) Ono, M. *et al.* : Adenoviral gizzard erosion in commercial broiler chickens. *Vet. Pathol.* 40, 294-303 (2003)
- 16) Ono, M. *et al.* : Outbreaks of adenoviral gizzard erosion in slaughtered broiler chickens in Japan. *Vet. Rec.* 153, 775-779 (2003)
- 17) 太田美奈子ら：プロイラーにおけるトリアデノウイルスによる発育不良および膀胱萎縮を特徴とする封入体肺炎. 鶏病研報 35, 76-80 (1999)
- 18) Qureshi, M. A. and Havenstein, G. B. : A comparison of the immune performance of a 1991 commercial broiler with a 1957 random bred stain when fed "typical" 1957 and 1991 broiler diets. *Poult. Sci.* 73, 1805-1812 (1994)
- 19) Rosenbergeer, J. K. *et al.* : The role of the infectious bursal agent and several avian adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic -anemia syndrome and gangrenous dermatitis. *Avian Dis.* 19, 717-729 (1975)
- 20) Tanimura, N. *et al.* : Necrotizing pancreatitis and gizzard erosion associated with adenovirus infection in chickens. *Avian Dis.* 37, 606-611 (1993)
- 21) 山田喜美子ら：プロイラー筋胃びらんから分離された鶏アデノウイルスの血清型および筋胃病変の再現試験. 鹿大農学術報告 第55号, 15-21 (2005)
- 22) 矢野敦史ら：プロイラー幼雛における封入体肝炎および膀胱 - トリアデノウイルスによる発育不良 - 第127回日本獣医学会学術集会講演要旨集 : 145 (1999)
- 23) von Bülow, V., Rudolph, R. and Fuchs, B. : Folgen der Doppelinfektion von Küken mit Adenovirus oder Reovirus und dem Erreger der aviären infektiöse Anämie (CCA). *J. Vet. Med. B.* 33, 717-726 (1986)

Adenovirus Infection Characterized by Gizzard Erosion in Young Chickens

Megumi Toyoshima, Jun Sasaki, Konomi Kuramochi, Takeshi Kawasaki¹⁾
and Masanobu Goryo

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

¹⁾ Laboratory of Health of Human and Bird.
Masu-ura 2-7-1, Abashiri-shi, Hokkaido 099-3119

Summary

A viral strain (tentatively designated as 530-20 strain) was isolated from the gizzard of a chicken that exhibited severe gizzard erosion, and we investigated its pathogenicity to chicks. This chicken was from a population that showed increasing mortality (up to 0.2%) with inclusion body hepatitis (IBH). This event started in 10-day-old chickens and ended in about one week. We inoculated the supernatant of 10% gizzard emulsion into chicken kidney (CK) cells and investigated the presence of cytopathic effect (CPE). The supernatant of the third passage culture was used for viral inoculums.

One-day-old chicks from P2 line SPF chickens were inoculated with the 530-20 strain (0.1 ml/chicken) in the femoral muscle intramuscularly or orally. Additional groups of chicks were allocated to be inoculated intramuscularly or orally with the emulsion of third passage chicken liver, fourth passage chicken pancreas, and third passage chicken gizzard to determine the organotropy of the virus. We weighed the body, liver, yolk sac, and pancreas and histopathologically investigated the major organs and yolk sac.

(J. Jpn. Soc. Poult. Dis., 49, 101-111, 2013)

Key words : Fowl adenoviral infection, gizzard erosion, inclusion body hepatitis, inclusion body pancreatitis, young chickens