

銘柄肉用鶏におけるグループⅡトリアデノウイルスによる 巨脾症の発生と鶏への接種試験

富田啓介[†] 加茂前仁弥 岡野康行 小倉裕司 渡邊 理

兵庫県姫路家畜保健衛生所 (〒670-0081 姫路市田寺東2-10-16)

(2010年4月28日受付・2010年11月8日受理)

要 約

2006年8～9月、食鳥処理場にて銘柄肉用鶏が、白斑を伴う脾腫によりマレック病を疑われ月別で0.53～1.88%が全廃棄となった。2007年7月にも同病態がみられ、脾臓50個を採材し検査した。病理組織検査で、リンパ濾胞と莢組織の増生、単核食細胞系(MPS)細胞にfull型核内封入体を認め、電子顕微鏡検査で、アデノウイルス様粒子を検出した。グループⅡトリアデノウイルス(GIIAAV)検出PCRは陽性であり、シーケンス解析では、非病原性キジ出血性腸炎ウイルスVirginia系統と最も高い相同性を示した(97.3%)。8週齢の同銘柄鶏への接種試験では、4日後に脾腫がみられ、GIIAAV検出PCRは、脾臓、胸腺などで陽性であった。

——キーワード：銘柄肉用鶏、グループⅡトリアデノウイルス(GIIAAV)、核内封入体、PCR、鶏巨脾症。

----- 日獣会誌 64, 221～226 (2011)

トリアデノウイルス(Avian adenovirus: AAV)は、直鎖状二本鎖DNAをもつ直径70～90nmの正20面体のウイルスで、抗原性と病原性の違いに基づいて3群に分けられる[1]。グループⅠAAV(GIAAV)は、鶏の封入体肝炎(Inclusion body hepatitis of chickens)、心膜水腫症候群(Hydropericardium syndrome)、筋胃び爛(Gizzard erosion)を、グループⅢAAV(GIIIAAV)は産卵低下症候群-1976(EDS-76)を引き起こす[1]。グループⅡAAV(GIIAAV)は、七面鳥の出血性腸炎(Hemorrhagic enteritis: HE)、キジの大理石脾病(Marble spleen disease: MSD)、鶏巨脾症(Avian adenovirus splenomegaly: AAS)の原因ウイルスである[1, 2]。AASは、脾腫を特徴とする比較的致死率の低い感染症であり[1, 2]、1975～1976年アメリカの食鳥処理場で、脾腫を呈しマレック病として廃棄されたブロイラーの脾臓よりHEウイルス(HEV)、MSDウイルス(MSDV)と似たウイルスの分離により初報告がなされた[3]。以降は、農場で瀕死を伴ったブロイラー種鶏での報告[4]のみである。

今回、われわれは、2006年頃から夏期に、食鳥処理場(処理場)で銘柄肉用鶏(銘柄鶏)が白斑を伴う脾腫により高率(鶏舎別で最大6.7%)に全廃棄となった事

例を調査し、GIIAAVによる鶏巨脾症(AAS)と診断した。また、病原性を確認するために感染鶏脾臓乳剤の鶏への接種試験を行ったので報告する。

材料および方法

処理場での状況調査：2006年4月～2007年3月に、5養鶏団地より出荷された271,172羽を対象に、白斑を伴う脾腫をマレック病様疾患として全廃棄した月別・鶏舎別廃棄率を調査した。また、2006年9月に全廃棄鶏(廃棄鶏)19羽と正常出荷鶏(正常鶏)11羽の脾臓の重量と長径を計測、Student's *t* testにより有意差検定を実施した。さらに、2007年7月、同病態が散見された鶏舎の廃棄鶏3羽と正常鶏47羽の脾臓を無作為に採取し、重量計測ならびに白斑の程度を5段階に分類した。脾臓を2等分し、片方を病理学的に精密検査し、残りの片方を-80℃で凍結保存し、ウイルス学的検査に供した。

病理学的検査：廃棄鶏3羽と正常鶏47羽の脾臓を材料とし、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定後、定法に従ってパラフィン包埋ブロックを作製し薄切後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し、光学顕微鏡で鏡検した。また、封入体を多く認めた正常鶏1羽の脾臓(No. 4)を材料とし、脱パラフィン後、2.5%グルタ

[†] 連絡責任者：富田啓介(兵庫県姫路家畜保健衛生所)

〒670-0081 姫路市田寺東2-10-16

☎079-294-1807 FAX 079-294-0948

E-mail: keisuke_tomita@pref.hyogo.lg.jp

ルアルデヒドと1%オスミウム酸で再固定, エポキシ樹脂で包埋し, 超薄切後, 酢酸ウランとクエン酸鉛で2重染色, 透過型電子顕微鏡 (H7500, 株式会社日立製作所, 東京) で観察した。

ウイルス検査: 病理学的検査で典型的なGIIAAVの封入体を多く認めた正常鶏3羽の脾臓 (No. 4~No. 6) 半切材料についてゲンタマイシン加減菌PBS [濃度 (0.04mg/ml)] 10%乳剤を作成し, 3,000回転で10分間遠心した。上清を0.45μmのフィルター (Microcom-PCR, MILLIPORE, U.S.A.) で濾過したものを接種材料とし, 初生雛由来腎細胞 (CK細胞) にて37℃で5日間培養後, 細胞変性効果 (CPE) 発現の有無を観察した。なお, その培養上清を用いて同様に3代まで盲継代し, 3代継代後でもCPEを示さなかった場合は, 分離陰性とした。PCRは, ウイルス分離に用いた接種材料 (No. 4~6) およびCK細胞で継代後の培養上清の各3検体について, QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc Valencia, U.S.A.) によりDNAを抽出した。GIIAAVの検出は, 真瀬ら (未投稿) が設計したプライマー (1st: 5'-GCG GCT CCA GTA TTT TCA CAT CGC-3', 5'-GTA CGG CCA GTT GGC GGG CCA-3', 2nd: 5'-GCC ACG GGG AGC TAC TTT GA-3', 5'-AGA CCA GCC GCG CAT ACC CTC CCA-3') にて, nested PCRを実施した。GIIAAVの検出は, Hessら [5] が設計したプライマーにてTaKaRa Ex Taq™ (タカラバイオ株式会社, 滋賀) によりPCRを実施した。PCRは, 温度条件94℃1分, 64℃1分, 72℃1.5分の30サイクルで実施し, PCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動後, エチジウムブロマイド (0.1μg/ml) で染色し, PCR産物の有無を観察した。対照として, GIIAAVは当所で保存していたTR-59株, GIIIAAVはEDS-76ウイルスME-80株を使用した。

得られたPCR産物は, Montege (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) を用いて精製し, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, U.S.A.) により, Applied Biosystems 3100 automated DNA sequencer (BigDye; Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) を用いたダイレクトシーケン法によりその塩基配列を決定した。得られた塩基配列について解析ソフトMEGA4 [6] を用いて, NCBIのBLASTサーチ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) にてジーンバンク登録株と同一性を比較した。

接種試験: 2007年11月に, GIIAAVの封入体を多く認めた正常鶏の脾臓でウイルス分離に使用した接種材料のうち, No. 4とNo. 6についてPBSで10倍希釈して混合した上清を0.2mlずつ, 8週齢のGIIAAV抗体陰性の同銘柄鶏9羽に静脈内接種した。対照として, PBSのみを同様に3羽に接種した。接種後4, 7, 10日目に接

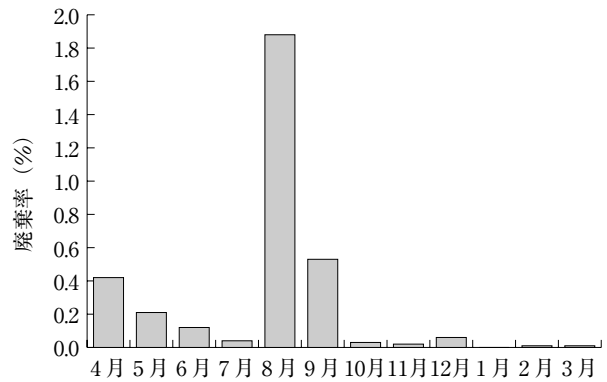


図1 食鳥処理場での白斑を伴う脾腫による銘柄肉用鶏の月別全廃棄率 (2006年4月~2007年3月)

表1 2006年調査時の全廃棄鶏と正常出荷鶏の脾臓の重量と長径の比較

区分	全廃棄鶏 (n=19)	正常出荷鶏 (n=11)
重量 (g) 平均±標準偏差	17.5±4.8*	8.27±6.0
長径 (cm) 平均±標準偏差	4.88±0.5*	3.58±0.77

*有意差有り (P<0.01)

種鶏各3羽, 対照1羽を剖検し, 肉眼病変を観察した後, 脾臓の重量測定, 主要臓器と胸腺およびファブリキウス嚢 (F嚢) の病理組織学検査とGIIAAV検出PCRを実施した。

成 績

処理場での状況調査: 2006年の月別廃棄状況調査では, 8月の平均は, 1.88%, 9月は0.53%で4月を除く他の月と比べ高く (図1), 8月の鶏舎別全廃棄率は, 最大で6.7% (育成率97%) であった。廃棄鶏の脾臓の重量は17.5±4.8g [平均±標準偏差], 長径は4.88±0.5cm [平均±標準偏差]と正常鶏に対し有意差を認め (P<0.01) (表1)。廃棄鶏では白斑を伴う脾腫を認めたが (図2), 白斑は他の主要臓器には認めなかった。また, 十二指腸から回盲部までのカタル性小腸炎を伴う症例も散見された。2007年7月の調査の対象鶏舎の育成率は99.9%廃棄率1.4% (18/1279羽) であった。廃棄鶏の脾臓の平均重量は12.9±3.1g, 正常鶏は7.1±2.3gで, 有意に重く (P<0.01), 白斑形成が顕著であるほど重量は重くなる傾向がみられた (表2)。

病理学的検査: 廃棄鶏の脾臓では, 白脾髄の拡張と莢組織の増生が顕著であったが, スタリースカイや封入体形成は僅かであった。正常鶏47羽のうち3羽 (No. 4~6) で典型的かつ著しい封入体の形成を認めた (表3)。封入体は, リンパ洞内のMPS細胞に認め, 多くは淡い好塩基性で核内に充満, 核仁を核壁に押し遣る Full

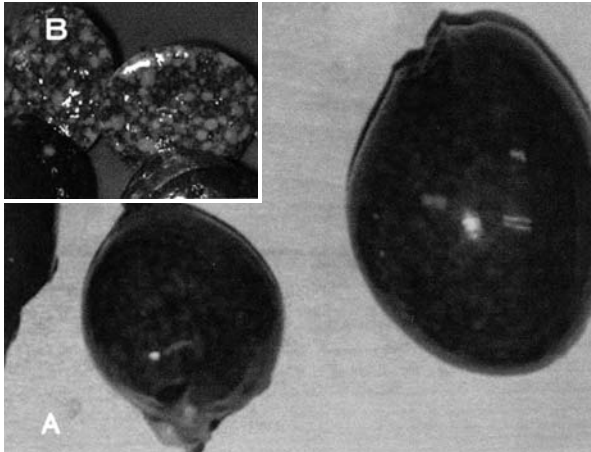


図2 腫大した脾臓
A：漿膜面からも濾胞の拡張がうかがわれる。
B：断面を入れると大理石様の紋様が現れる。

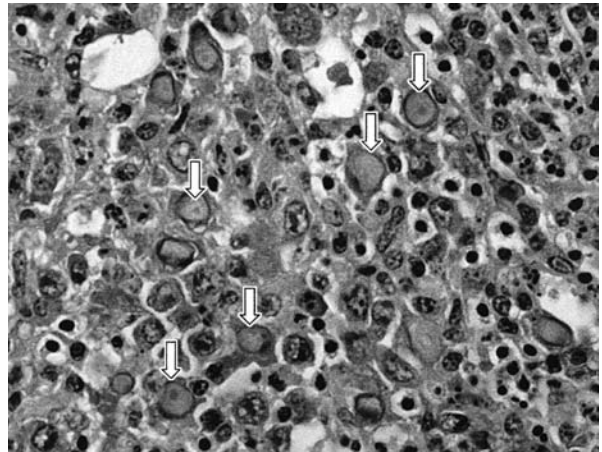


図3 腫大した脾臓
No. 4単核食細胞系 (MPS) 細胞の核では、腫大した核内に Full type 核内封入体が認められる (矢印) (HE 染色 × 1,000)。

表2 2007年7月調査時の脾臓の白斑の程度による分類と重量および封入体を認めた個数

白斑の程度	-	±	+	++	+++
検体数 (n=50)	36	8	3	1	2
平均重量 (g)	6.8±2.4	7.6±2.1	9.3±0.7	10.3	14.2±3.1
平均±標準偏差					
封入体陽性数 陽性数/検体数	0/36	2/8	1/3	1/1	1/2
備考				廃棄	廃棄

表3 全廃棄鶏3羽と封入体を認めた正常出荷鶏3羽の脾臓の肉眼所見と病理組織所見

区分	全廃棄鶏			正常出荷鶏			
	検体No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
重量 (g)		16.3	12.0	10.3	8.5	10.1	9.9
肉眼所見							
白斑		+++	+++	++	+	±	±
組織所見							
白脾髄の拡張		+++	+++	+++	++	+	+
リンパ球崩壊		++	++	++	+	+	+
スターリー スカイ像		++	++	++	+++	++	++
核内封入体		+	-	+	+++	++	++

typeが多く認められた (図3)。電子顕微鏡検査では、核内に充満する直径約70nmの球状構造のアデノウイルス様粒子が観察された (図4)。

ウイルス学的検査：継代2代目と3代目に1検体 (No. 5) で、細胞が円形化するCPEを確認した。No. 4およびNo. 6ではCPEは確認されず、分離陰性とした。

GIAAV検出 nested PCRでは、1検体 (No. 5) で継代2, 3代目の培養上清および陽性対照としたTR-59株が陽性を示した。GIIAAV検出PCRでは、3検体すべて

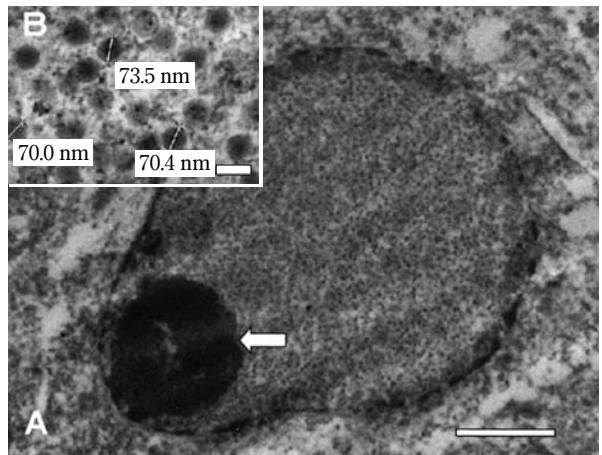


図4 核内封入体の電子顕微鏡写真 (脾臓)
A：単核食細胞系 (MPS) 細胞の核は増殖したウイルスによりクロマチン (矢印) は偏在している (Bar = 2μm × 12,000)。
B：直径約70nmのおおむね球形の粒子が認められる (Bar = 100nm × 100,000)。

の脾臓乳剤が陽性を示した (図5)。このPCR法で得られたPCR産物のシーケンス解析では、GIIAAVである非病原性キジ出血性腸炎ウイルス Virginia 系統 (登録番号AY849321) と最も高い相同性を示した (97.3%)。

接種試験：接種鶏、対照ともに臨床症状に異常は無かった。接種鶏の脾臓重量は、接種4日後では6.4 ± 0.8gと対照の2.8gに比べ腫大したが、7日後には回復した (表4)。また、接種4日後にカタル性小腸炎を3羽すべてに認めたが、7日後では2羽 (66%) に減少、10日後では病変は無かった。病理組織学的には、いずれの接種鶏の脾臓、小腸などに封入体は認めなかった。GIIAAV検出PCRでは、4, 7, 10日後の接種鶏の脾臓で3羽すべて陽性、4日後の胸腺、ファブリキウス嚢では2羽

(66%), 小腸では1羽(33%)陽性, 対照はすべて陰性であった(表4)。

考 察

GIIAAV感染症の鶏での発生例は, Domermuthら[3, 4]による処理場でのプロイラーと, 農場で瀕死を伴ったプロイラー種鶏での報告はあるが, その数は少ない。

Yamaguchiら[7]は, 国内鶏群でのGIIAAVの浸潤が高率であることを報告しているが, GIIAAV感染症は, Fujiwaraら[8]による七面鳥HE発生例の報告のみで, 鶏におけるAASの報告はない。

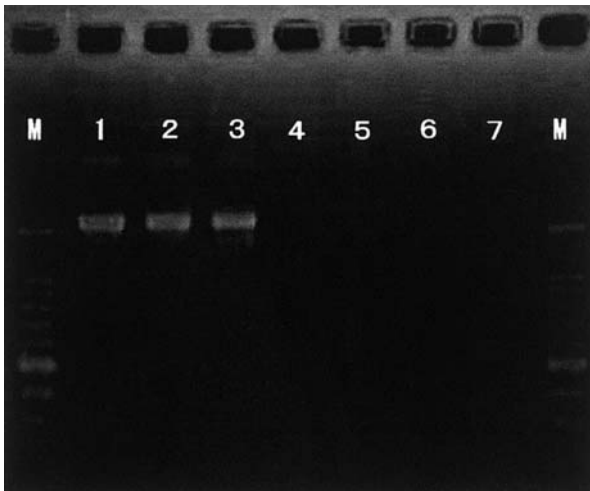
今回, 銘柄鶏に脾臓の白斑を伴う腫大が高率に発生, 脾臓のMPS細胞に封入体を認め, 電子顕微鏡検査でア

デノウイルス様粒子を認めた。AASにおける脾臓病変は, 七面鳥HE, キジMSDの病変に類似し, 剖検では, 拡張した特徴的な斑紋状(大理石様), 組織では白脾髄の過形成, MPS細胞における核内封入体が見られるとされており[1-4, 9-12], 今回もそれに一致した。脾臓での封入体の出現頻度は, 著しく腫大し廃棄となったものよりも, 軽度に腫大した正常鶏で多く認めた。Domermuthら[3]の処理場でのプロイラーの発生例では, 細網系細胞の過形成により脾腫を認めたが, GIIAAVと関連付ける核内封入体は認めていない。封入体は感染初期に出現するが, 細網系細胞の過形成により脾腫を呈し廃棄措置となった段階では封入体はほとんど消失しているものと推察される。

いっぽう, 脾臓以外の臓器に病変は認めなかった。七面鳥HEでは, 小腸粘膜の鬱血と変性などを[1, 2, 8, 12-14], キジMSDでは肺の鬱血水腫を認め[1, 2, 15], AASもMSDと同様とされている[1, 2, 4]。また, プロイラー種鶏で肺の充血水腫を伴ったAASでは高い致死率(8.9%)との報告もある[4]。今回は, 肺の充血水腫を伴わず, これが致死率の少なかった原因と推察される。

封入体を認めた正常鶏の脾臓乳剤でのGIIAAV検出PCRにより, 特異的なPCR産物が得られ, シークエンス解析によりGIIAAVに属する株と97.3%の相同性を示したことからAASと診断した。CK細胞接種により脾臓乳剤からのウイルス分離を試みたが陰性であった。HEVは鶏や七面鳥の胎子や細胞培養で増殖は認めず, Nazerianらは[16], HEVやMSDVの培養を, 腫瘍化した七面鳥Bリンパ芽球細胞(MDTC-RP19)を用い分離に成功している。GIIAAVはBリンパ球で感染増殖するためCK細胞では分離陰性であったと推察され, 細胞培養等による分離同定法の早期確立が望まれる。

接種試験では, 脾腫を4日後に認めたが7日後には回復した。GIIAAV遺伝子を脾臓, F囊, 胸腺などで検出したにもかかわらず, 封入体は認めなかった。七面鳥でのHEV接種試験では, 脾臓での封入体の出現は, 経口接種では3日から5日後[13], 静脈接種では3日後まで



1: 脾臓乳剤 No. 4 2: 脾臓乳剤 No. 5
 3: 脾臓乳剤 No. 6 4: No. 5CK培養上清
 5: TR-59株(GIIAAV) 6: ME80株(GIIIAAV)
 7: 陰性対照
 M: マーカー (100bp DNA ladder)

図5 核内封入体を認めた脾臓乳剤のGIIAAV検出PCR検査成績
 脾臓乳剤 (No. 4~No. 6) のみで目的の長さのPCR産物が確認される。

表4 封入体を認めた脾臓乳剤接種鶏の4, 7, 10日後の脾臓重量と各臓器のGIIAAV検出PCR検査成績

試験区		4日後					7日後	10日後
		脾臓	小腸	大腸	胸腺	F囊	脾臓	脾臓
試験区	重量 (g) 平均±標準偏差	6.4±0.8					4.5±0.2	4.5±0.5
	PCR陽性数 陽性数/検体数	3/3	1/3	1/3	3/3	2/3	3/3	3/3
対照区	重量 (g) 平均±標準偏差	2.8					4.0	4.0
	PCR陽性数 陽性数/検体数	0/1					0/1	0/1

検出, 4日後には未検出とされている [17]. これより4日後には封入体形成は終わっていたと推察される. また, 鶏での筋肉内接種試験では, プロイラーはレグホンに比べ抵抗性で, 封入体のみられた個体は, 非病原性HEV接種では半数, 病原性HEV接種では全例で見られるものの, その出現頻度は少なかったとされている [10]. これより封入体を認めなかったのは, 供試鶏が低感受性, また, ウイルスが増殖性, 病原性の弱い株であると推察される. いっぽう, 小腸炎を4日後に認めたが, 7および10日後では徐々に回復し, 封入体も認めなかった. 七面鳥でのHEV接種試験では, 経口接種では, 脾病変形成後の5日目から十二指腸上皮の変性がみられる [13]. 今回の小腸炎もGIIAAVの関与が強く疑われ, 一般染色より抗原検出に優れる免疫組織化学検査 [18] 等を応用し関連を検討する必要がある. また, 今回の接種試験では, 野外発生例に比べ, 病変は軽度であった. 国内での七面鳥HEの発生は夏期 [8], キジMSDの発生は, 夏期に2年連続したとの報告がある [15]. さらに, 野外発生例同様の病変発現には, 環境要因も示唆されている [19]. 今回の野外発生例は夏期, 接種試験時期は11月の低温期であり, 暑熱など複合ストレスが病変増強の一因と推察される.

諸外国では本病のワクチンが応用されているが, 現在国内にワクチンはない. 今回, AAS発生農場周辺には, 七面鳥やキジは飼育されていないが, 野生キジは多く生息している. 鶏とキジを対象に, GIIAAV抗体検査などによる感染経路の解明と, 消毒, 暑熱等のストレス軽減など厳格な飼養衛生管理を基軸とした被害低減対策の検討が急務である.

採材にご協力いただいた兵庫県食肉衛生検査センターの諸先生, 電子顕微鏡検査を実施していただいた御動物衛生研究所の久保正法先生, PCR産物のシーケンス解析を実施していただいた同真瀬昌司先生に深謝する.

引用文献

- [1] 門井克幸: アデノウイルスと感染症, 獣医微生物学, 見上 彪編, 第1版, 230-231 (1995)
- [2] Pierson FW, Fitzgerald SD: Hemorrhagic Enteritis and Related Infections, *Disease of Poultry* 11th ed. 237-247 (2003)
- [3] Domermuth CH, Harris JR, Gross WB, DuBose RT: A naturally occurring infection of chickens with a hemorrhagic enteritis/marble spleen disease type of virus, *Avian Dis*, 23, 479-484 (1978)
- [4] Domermuth CH, Heide L, Faddoul GP: Pulmonary congestion and edema (marble spleen disease) of chickens produced by group II avian adenovirus, *Avian Dis*, 26, 629-633 (1982)
- [5] Hess M, Raue R, Hafez HM: PCR for specific detection of hemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus, *J Virol Methods*, 81, 199-203 (1999)
- [6] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0, *Mol Biol Evol*, 24, 1596-1599 (2007)
- [7] Yamaguchi S, Imada T, Kawamura H: Survey on antibody against hemorrhagic enteritis virus among Chicken Flocks in Japan, *Natl Inst Anim Health Q*, 22, 180-181 (1982)
- [8] Fujiwara H, Tanaami S, Yamaguchi M, Yoshino T: Histopathology of hemorrhagic enteritis in turkeys, *Natl Inst Anim Health Q*, 15, 68-75 (1975)
- [9] Veit HP, Domermuth CH, Gross WB: Histopathology of avian adenovirus group II splenomegaly of chickens, *Avian Dis*, 25, 866-873 (1981)
- [10] Beasley JN, Clifton SG: Experimental infection of broiler and Leghorn chickens with virulent and avirulent isolates of hemorrhagic enteritis virus, *Avian Dis*, 23, 616-621 (1979)
- [11] Silim A, Thorsen J, Carlson HC: Experimental infection of chickens with hemorrhagic enteritis virus, *Avian Dis*, 22, 106-114 (1978)
- [12] Fasina SO, Fabricant J: Immunofluorescence studies on the early pathogenesis of hemorrhagic enteritis virus infection in turkeys and chickens, *Avian Dis*, 26, 158-163 (1982)
- [13] Saunders GK, Pierson FW, Hurk JV: Hemorrhagic enteritis virus infection in turkeys: A comparison of virulent and avirulent virus infections, and a proposed pathogenesis, *Avian Pathol*, 22, 47-58 (1993)
- [14] Hussain I, Choi CU, Rings BS, Shaw DP, Nagaraja KV: Pathogenesis of hemorrhagic enteritis virus infection in turkeys, *J Vet Med*, 40, 715-726 (1993)
- [15] Nazerian K, Fadly AM: Propagation of virulent and avirulent turkey hemorrhagic enteritis virus in cell culture, *Avian Dis*, 26, 816-827 (1982)
- [16] Gross WB, Domermuth CH: Spleen lesions of hemorrhagic enteritis of turkeys, *Avian Dis*, 20, 455-466 (1976)
- [17] Fitzgerald SD, Reed WM, Burnstein T: Detection of type II avian adenoviral antigen in tissue sections using immunohistochemical staining, *Avian Dis*, 36, 341-347 (1992)
- [18] Carlson HC, Pettit JR, Hemsley RV, Mitchell WR: Marble spleen disease of pheasants in Ontario, *Can J Comp Med*, 37, 281-286 (1973)
- [19] Fadly AM, Cowen BS, Nazerian K: Some observations on the response of ring-necked pheasants to inoculation with various strains of cell-culture-propagated type II avian adenovirus, *Avian Dis*, 32, 548-552 (1988)

Occurrence of Avian Adenovirus Splenomegaly in Brand Meat Chickens
and Experimental Infection

Keisuke TOMITA^{*†}, Masahiro KAMOMAE, Yasuyuki OKANO,
Yuji OGURA and Osamu WATANABE

** Himeji Livestock Hygiene Service Center of Hyogo Prefecture, 2-10-16 Taderahigashi,
Himeji, 670-0081, Japan*

SUMMARY

In summer 2006, splenomegaly and splenic mottling of brand meat chickens were observed, when 0.53h 1.88% of birds were condemned for a typical Marek's disease. In summer 2007, a similar condition was observed and 50 spleens obtained at slaughter from one of the flocks were examined. Histologically, reticuloendothelial cells hyperplasia with intranuclear inclusion bodies were observed and ultrastructurally, adenovirus particles were detected. A PCR assay showed that the spleens were positive for the hexon gene of group II avian adenovirus (GIIAAV). The sequence of the PCR product was identical to the avirulent turkey hemorrhagic enteritis virus strain Virginia with 97.3% homology. The extract of the above spleens was inoculated intravenously in 8-week-old chickens. Four days post inoculation, splenomegaly was observed and the spleen, thymus, and bursa of Fabricius were positive for the GIIAAV gene.

— Key words : brand meat chicken, group II avian adenovirus, intranuclear inclusion bodies, PCR, and splenomegaly.

† Correspondence to : Keisuke TOMITA (Himeji Livestock Hygiene Service Center of Hyogo Prefecture)

2-10-16 Taderahigashi, Himeji, 670-0081, Japan

TEL 079-294-1807 FAX 079-294-0948 E-mail : keisuke_tomita@pref.hyogo.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 221 ~ 226 (2011)