

マレック病罹患鶏からの鶏貧血ウイルス遺伝子の検出

岩本滋郎^{1)†} 堂福莉菜²⁾ 濱崎幸一²⁾ 北原尚英¹⁾ 坂口善二郎¹⁾
 岡田大輔¹⁾ 中村 誠¹⁾ 藤園昭一郎¹⁾

1) 鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所 (〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678)

2) 鹿児島県肝属家畜保健衛生所 (〒 893-0025 鹿屋市西祓川町 145-1)

(2018年3月3日受付・2018年7月2日受理)

要 約

地鶏の種鶏及び肉用鶏を飼養する鹿児島県内の養鶏農場で、マレック病が発生した。当該農場では過去2年間にわたり本病が散発していたことから、マレック病ウイルス以外の病原体の関与を疑い、本症例及び当該農場の過去症例の検体を用いて各種の鶏ウイルス遺伝子をPCR法にて検索した。その結果、マレック病罹患鶏の脾臓及び肝臓から鶏貧血ウイルスの特異遺伝子が検出され、当該農場のマレック病罹患鶏には、鶏貧血ウイルスが混合感染していたと考えられた。当該農場のマレック病罹患鶏からは、貧血や脾臓におけるリンパ球減少など、両ウイルスの混合感染実験と類似した所見も得られており、当該農場でのマレック病の発生や鶏の病態に対する鶏貧血ウイルスの関与も考えられた。しかし、その可能性を明らかにするためには、今後のさらなる研究が必要と考えられた。

——キーワード：鶏貧血ウイルス、混合感染、マレック病。

-----日獣会誌 71, 636～640 (2018)

マレック病 (MD) は、ヘルペスウイルス科のMDウイルス (MDV) 感染によりおもに家禽に引き起こされる末梢神経腫大や種々の臓器でのリンパ腫形成を特徴とする疾病である。MDVは世界的に分布しており、国内では家畜伝染病予防法上の届出伝染病に指定されている。1960年代以降、MDはワクチンによるコントロールが行われているものの、現在も養鶏産業への影響が大きい疾病である。

鶏貧血ウイルス病は、アネロウイルス科の鶏貧血ウイルス (CAV) 感染に起因する貧血を主徴とする疾病で、リンパ系組織でのリンパ球減少を特徴とし [1]、宿主の免疫抑制に伴う2次感染誘発や病勢悪化に関連するとされている [2, 3]。CAVは世界各地の鶏群に常在し、国内の多くの鶏群もCAVに対する抗体を保有している [4]。本病は、抗体をもたない種鶏に感染したCAVの介卵感染による幼雛の被害が問題になることがあるが、中雛以上での発症は、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスやMDVなどによる免疫低下が原因と考えられている [5]。特にMDVとの混合感染時の宿主への影響は大きい [6-8] もの、野外の症例報告はほとんどなく、実

態は不明な点が多い。

このたび、過去2年間MDが散発していた県内養鶏農場で、MDと診断された鶏 (MD罹患鶏) からCAV遺伝子が検出されたことから、その詳細を報告する。

材料及び方法

発生経緯 (事例1)：当該農場は、地鶏の種鶏及び肉用鶏を飼養する農場である。種鶏は別農場から約120日齢で導入後、約1年間の繁殖供用期間を経て廃用となる。種鶏から生産された種卵は孵化場に出荷され、孵化した初生雛の一部が当該農場に再導入後肉用鶏として飼養される。種鶏及び肉用鶏ともに、導入元農場で初生時にMDワクチンが頸部皮下に接種されるが、当該農場、種鶏導入元及び肉用鶏導入元のいずれの農場でもCAVワクチンは使用されていない。2017年3月下旬に農場へ導入後約2カ月が経過した種鶏群で、それまでに観察されなかった1～数羽/日程度の死亡や産卵率低下が認められ始めた。死亡鶏は雄鶏に比べ雌鶏が多く、雌鶏には、つつき行動によるとみられる脱羽以外目立つ症状がなかったことから、雄鶏のつつき行動による雌鶏のスト

† 連絡責任者：岩本滋郎 (鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所)

〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678 ☎ 099-274-7555 FAX 099-274-7556

E-mail : jirou-iwamoto@pref.kagoshima.lg.jp

表 MD 罹患鶏の病性鑑定概要と保存検体を用いた CAV 遺伝子検索結果 (事例 2~4)

事例 No	病性鑑定 依頼日	鶏種及び日齢 (検査羽数)	MD 罹患 鶏数	MD 罹患鶏の病性鑑定結果			CAV 遺伝子検索結果 ^{b)}			
				PCR 結果 ^{b)}	病理所見		MD 罹患鶏		MD 罹患鶏 以外	
					MDV (肝臓)	複数臓器での リンパ球様細胞 浸潤増殖	脾臓での リンパ球 減少	肝臓	脾臓	肝臓
2	2017. 3.7	肉用地鶏 51 日齢, 81 日齢, 143 日齢 (各 2 羽)	6	6/6	+	-	4/6	4/6	ND ^{c)}	ND
3	2016. 1.27	肉用地鶏 74 日齢 (3 羽)	1 ^{a)}	1/1	+	-	1/1	0/1	2/2	0/1
4	2015. 7.10	地鶏種鶏 234 日齢 (4 羽)	1	1/1	+	+	0/1	1/1	0/3	0/2

- a) この 1 羽は臓器へのリンパ球様細胞の浸潤が軽度であったことから MD (疑い) と診断
- b) 陽性羽数/検査羽数
- c) ND: No Data

レス増加や気温上昇などの環境変化が死亡原因と考えられていた。定期的な鶏舎清掃及び消毒等により産卵率は回復したものの、死亡状況が改善せず、7 月上旬に原因究明のため 232 日齢の衰弱種鶏 2 羽 (A 及び B) を用いて病性鑑定を実施した。

病性鑑定 (事例 1) : 剖検前に採血を行い、定法によりヘマトクリット (Ht) 値を測定した。剖検時に採材した生材料及びホルマリン材料を用い、細菌学的検査、ウイルス学的検査及び病理組織学的検査を実施した。細菌学的検査では、主要臓器を用いて DHL 寒天培地での好気培養、5% 綿羊血液加トリプトソイ寒天培地及びチョコレート寒天培地での 5% 炭酸ガス培養並びに 5% 綿羊血液加 GAM 寒天培地での嫌気培養を実施した。ウイルス学的検査では、主要臓器乳剤から核酸を抽出後、鶏脳脊髄炎ウイルス [9]、伝染性喉頭気管炎ウイルス [10]、伝染性気管支炎ウイルス [11]、トリアデノウイルス [12]、伝染性ファブリキウス囊病ウイルス [13]、MDV [14] 及び CAV [15] の各遺伝子を検出する PCR または RT-PCR を実施した。病理組織学的検査では、10% 中性緩衝ホルマリンで固定した主要臓器をパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い切片を観察した。

過去の病性鑑定事例の再調査 : 当該農場では、事例 1 の発生以前にも死亡鶏増加の原因究明を目的とした病性鑑定が実施され、そのすべてで 1 羽以上が MD (または MD 疑い) と診断された (表, 事例 2~4)。これらの MD 罹患鶏の病理組織学的所見及び PCR 検査結果を整理するとともに、追加調査として -80℃ で保存されていた肝臓乳剤 13 検体 (事例 2: 6 検体, 事例 3: 3 検体, 事例 4: 4 検体) と、脾臓のホルマリン固定パラフィン包埋材料 11 検体 (事例 2: 6 検体, 事例 3: 2 検体, 事例 4: 3 検体) から核酸を抽出し、CAV 遺伝子を検出す

る PCR [15] を実施した。

成 績

病性鑑定 (事例 1) : 剖検前、種鶏 A に右脚の伸展が、種鶏 B に開口呼吸が認められた。2 羽の Ht 値はいずれも 25% であった。剖検時、肝臓の白色微小結節 (2/2)、肝臓・脾臓・腎臓の腫大 (1/2) 及び脾臓漿膜の白濁 (1/2) が認められた。細菌学的検査では、検査臓器から有意菌は分離されなかった。ウイルス学的検査では、種鶏 A 及び B の肝臓、脾臓及び坐骨神経から MDV 遺伝子が、脾臓から CAV 遺伝子が検出された。検査したその他のウイルスの遺伝子は、検査臓器から検出されなかった。病理組織学的検査では、肺 (1/2)、肝臓 (2/2)、腎臓実質 (1/2)、心筋間 (2/2)、脾臓及び筋骨漿膜 (1/2) 並びに腸管粘膜下組織から筋層 (1/2) に、大小さまざまなリンパ球様腫瘍細胞の浸潤及び増殖が認められた。

病理組織学的検査所見から、本症例では MD 及び鶏白血病 (AL) が疑われた。一般的に AL の組織所見における腫瘍細胞は比較的均一な大きさをもつとされる [16] が、本症例では不均一であったことや、ウイルス学的検査での MDV 遺伝子の検出並びに当該農場の過去の病性鑑定結果をふまえ、本症例を MD と診断した。なお、2 羽の脾臓から CAV 遺伝子が検出されたが、病理組織学的に病変が確認できず、鶏の病態への CAV の関与は不明とした。

過去の病性鑑定事例の再調査 : 当該農場の過去の病性鑑定 (事例 2~4) では、全事例において肝臓での MDV 遺伝子検出が陽性であり、病理組織学的検査では複数臓器でのリンパ球様細胞の浸潤増殖が観察された (表) ほか、事例 4 の脾臓ではリンパ球数の減少が確認された (図)。

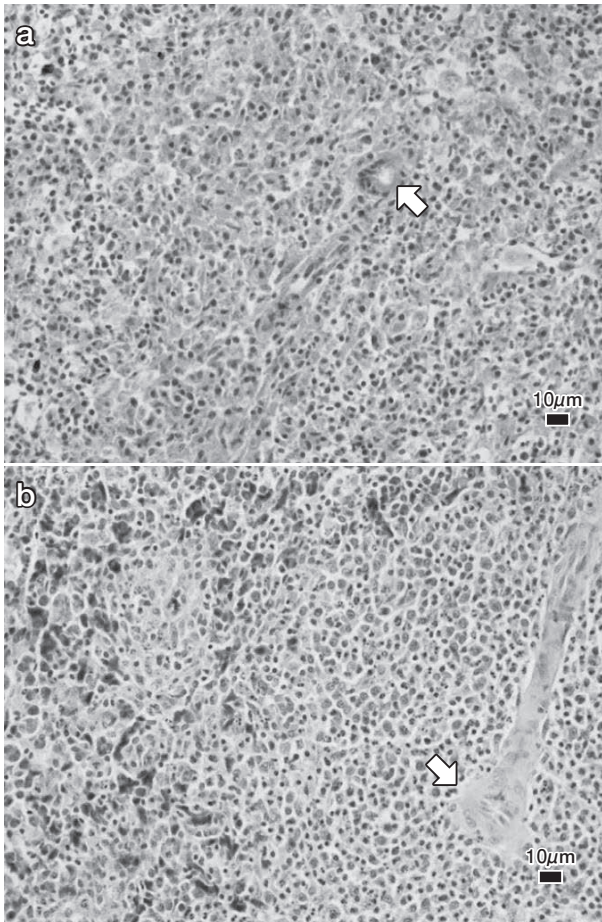


図 事例4のMD罹患鶏の脾臓の組織像(a)と正常像(b)
正常像(b)では、動脈(矢印)周囲に多数確認できるリンパ球がMD罹患鶏(a)では減少している。

また、保存検体を用いたPCRの結果、CAV遺伝子は事例2のMD罹患鶏の肝臓及び脾臓それぞれ6検体中4検体で、事例3のMD罹患鶏の肝臓で検出された。MD罹患鶏以外の2検体からも検出されたが、脾臓からは検出されなかった。事例4ではMD罹患鶏の脾臓で検出されたが、肝臓からは検出されなかった(表)。

考 察

当該農場では、ワクチン接種にもかかわらず数年間MDが散発していたことから、MDV以外の病原体の関与を疑いウイルス遺伝子を検索したところ、CAV遺伝子が検出された。さらに、過去症例の保存検体の一部からも同様に検出された。当該農場の飼養鶏はCAVワクチン未接種であることから、当該農場のMD罹患鶏にはCAV野外株が混合感染していたことが示唆される。

MDワクチン接種農場でMDが発生するケースにはしばしば遭遇する。これは、MDワクチンは感染T細胞の腫瘍化を抑制するが、病原性をもつウイルスの感染や増殖を防ぐことができず[6, 17]、宿主の免疫状態によって、その効果が左右されやすいためと考えられる。

CAV感染は宿主の免疫系に重大な影響を及ぼす[2, 3]ことから、その存在はMD発生に非常に重要とされ[6]、ワクチンブレイクの一因とも考えられている[7]。したがって、CAVが混合感染している場合、MDワクチンの効果が十分に期待できない可能性がある。国内の農場の多くにCAVが浸潤している[4]ことや、食鳥処理場で廃棄脾臓中に形成されたMDリンパ腫内に高頻度にCAV抗原が確認された[18]ことを考慮すると、毎年発生が報告されるMDに対するCAVの関与も、可能性の1つとして考えられる。

MDVとCAVの混合感染実験では、貧血鶏増加、死亡率上昇及び死亡日齢低下[7, 8]、5~8週齢の鶏でCAVに起因すると思われる骨髓病変やHt値低下(25%以下)、脾臓でのリンパ球減少が観察される[7]ことが報告されている。当該農場では飼養鶏の死亡率上昇のほか、事例1のMD罹患鶏で観察された軽度貧血(Ht値25%)や、事例4のMD罹患鶏の病理組織学的検査で観察された脾臓でのリンパ球減少など、混合感染実験の結果と類似した所見も得られている。しかし、事例1では骨髓の採材がなく、貧血へのCAVの関与を病理組織学的に確認できないことに加え、既報[7, 18]にあるMDリンパ腫内の核内封入体が確認されていないなど、一致しない点も多い。また、事例2及び3ではMD罹患鶏から両ウイルス遺伝子が検出されたが、そのほかにCAVの関与を疑う所見は認められなかった。この理由としては、①当該農場でのCAV関与は一部のMD症例に限られていた、②CAVによる脾臓の病変確認可能な期間が短く[7]、MD罹患鶏では病変を確認できなかった、などの可能性も考えられた。以上のように、当該農場でのMD発生やMD罹患鶏の病態に対するCAVの関与を、当該農場の病性鑑定結果のみから判断することはできなかった。当該農場の事例を含め、MDに対するCAVの関与を判断するためには、今後の研究が必要と考えられた。

また、事例1及び事例4の種鶏は230日齢を超えており、これだけ高齢の鶏での両ウイルスの混合感染事例は、著者らが知るかぎり、ほかに報告がない。混合感染実験でも多くは初生雛が使用され、最大で60日齢程度までしか観察が行われず[7]、それ以上の日齢の宿主での知見は不足している。MDVとの混合感染時、CAVに日齢抵抗性をもつとされる高齢の宿主の病態にCAVが影響する可能性は否定できないが、その影響の有無や程度は今後の報告を待つ必要がある。

CAVは、不顕性感染でもプロイラーの生産性に影響するとの報告[19]もあり、MDVとの混合感染による生産性への影響もまた大きいと思われる。MD発生防止及び損害低減のためにも、今後もMD発生事例でのCAVの関与に関する継続的な調査並びに症例の蓄積に

よる実態解明が必要である。

引用文献

- [1] 岡田幸助, 石田卓夫: c. 鶏貧血ウイルス感染症, 動物病理学各論, 日本獣医病理学会編, 38-39, 文永堂出版, 東京 (1998)
- [2] Adair BM: Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection, *Dev Comp Immunol*, 24, 247-255 (2000)
- [3] 湯浅 襄: 鶏貧血ウイルスとその感染症, 鶏病研究会報, 53, 61-75 (2017)
- [4] Yuasa N, Imai K, Tezuka H: Survey of antibody against chicken anaemia agent (CAA) by an indirect immunofluorescent antibody technique in breeder flocks in Japan, *Avian Pathol*, 14, 521-530 (1985)
- [5] 御領政信: 鶏貧血ウイルス病, 動物の感染症, 明石博臣他編, 第3版, 212, 近代出版, 東京 (2011)
- [6] Fehler F: Marek's disease: history, actual and future perspectives, *Lohmann Information*, 25, 1-5 (2001)
- [7] Haridy M, Goryo M, Sasaki J, Okada K: Pathological and immunohistochemical study of chickens with coinfection of Marek's disease virus and chicken anaemia virus, *Avian Pathol*, 38, 469-483 (2009)
- [8] Otaki Y, Nunoya T, Tajima M, Tamada H, Nomura Y: Isolation of chicken anaemia agent and Marek's disease virus from chickens vaccinated with turkey herpesvirus and lesions induced in chicks by inoculating both agents, *Avian Pathol*, 16, 291-306 (1987)
- [9] Xie Z, Khan MI, Girshick T, Xie Z: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect avian encephalomyelitis virus, *Avian Dis*, 49, 227-230 (2005)
- [10] Ebrahimi MM, Pourbakhsh SA, Shahsavandi S, Momayez R, Gholami MRJ: Isolation and identification of infectious laryngotracheitis virus from commercial flocks of Iran using various techniques, *Archives of Razi Institute*, 56, 11-12 (2003)
- [11] Mase M, Tsukamoto K, Imai K, Yamaguchi S: Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan, *Arch Virol*, 149, 2069-2078 (2004)
- [12] Mase M, Mitake H, Inoue T, Imada T: Identification of group I-III avian adenovirus by PCR coupled with direct sequencing of the hexon gene, *J Vet Med Sci*, 71, 1239-1242 (2009)
- [13] Lin Z, Kato A, Otaki Y, Nakamura T, Sasmaz E, Ueda S: Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan, *Avian Dis*, 37, 315-323 (1993)
- [14] Chang KS, Lee SI, Ohashi K, Ibrahim A, Onuma M: The detection of the meq gene in chicken infected with Marek's disease virus serotype 1, *J Vet Med Sci*, 64, 413-417 (2002)
- [15] Mohamed MA: Chicken infectious anemia status in commercial broiler chickens flocks in assiut-upper Egypt: occurrence, molecular analysis using PCR-RFLP and apoptosis effect on affected tissues, *International Journal of Poultry Science*, 9, 591-598 (2010)
- [16] 塚本健司: 鶏白血病, 鳥の病気, 鶏病研究会編, 第8版, 48-51, 創文印刷工業, 東京 (2014)
- [17] Boodhoo N, Gurung A, Sharif S, Behboudi S: Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology, *Vet Res*, 47, 119-138 (2016)
- [18] Ahmed MS, Ono H, Sasaki J, Ochiai K, Goryo M: Persistence of chicken anemia virus antigen and inclusions in spontaneous cases of Marek's disease visceral lymphomas in broiler chickens at slaughterhouses, *J Vet Med Sci*, 78, 825-829 (2016)
- [19] McNulty MS, McIlroy SG, Bruce DW, Todd D: Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens, *Avian Dis*, 35, 263-268 (1991)

Detection of Chicken Anemia Virus Genome in Chickens Infected
with Marek's Disease

Jiro IWAMOTO^{1)†}, Rina DOFUKU²⁾, Kouichi HAMASAKI²⁾, Syoei KITAHARA¹⁾,
Zenjiro SAKAGUCHI¹⁾, Daisuke OKADA¹⁾, Makoto NAKAMURA¹⁾
and Syoichiro FUJISONO¹⁾

1) *Kagoshima Prefectural Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Yuda,
Higashiichiki-cho, Hioki, 899-2201, Japan*

2) *Kagoshima Prefectural Kimotsuki Livestock Hygiene Service Center, 145-1 Nishiharaigawa-
cho, Kanoya, 893-0025, Japan*

SUMMARY

Marek's disease (MD) broke out at a local chicken farm in Kagoshima Prefecture that rears breeder and broiler chickens. Because MD has sporadically occurred on this farm for 2 years, the involvement of other pathogens was suspected. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of liver and spleen samples from current and previous cases of MD detected the presence of the chicken anemia virus (CAV) genome, implying dual infection of MD-affected chickens with CAV. Furthermore, the chickens exhibited similar symptoms to other chickens that have been co-infected with MD and CAV, such as anemia and lymphoid depletion in the spleen. Therefore, it was suspected that CAV infection was involved in the occurrence of MD and the clinical condition of chickens on the farm. However, further studies are required to better understand the role of CAV infection in MD. — Key words : Chicken anemia virus, co-infection, Marek's disease.

† *Correspondence to : Jiro IWAMOTO (Kagoshima Prefectural Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center)*

1678 Yuda, Higashiichiki-cho, Hioki, 899-2201, Japan

TEL 099-274-7555 FAX 099-274-7556 E-mail : jirou-iwamoto@pref.kagoshima.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 636 ~ 640 (2018)