

## 論文の内容の要旨

論文題目： 鶏アデノウイルスによる筋胃びらんに関する研究

氏 名： 奥田 陽

鶏の筋胃にびらん（粘膜に限局した壊死）が形成されることは古くから知られており、1930年代に初生ひなに認められた筋胃びらんが報告されている。1970年代にはペルーで魚粉給餌を原因とする筋胃びらんが報告され、日本でも同様の疾病が1978年から1979年にかけて各地で発生した。その後、その原因が赤身魚類を高温で加熱処理した際に生成される物質であることが明らかとなりジゼロシンと命名された。この魚粉に起因する筋胃びらんに加えて、ヒスタミン、マイコトキシン、ビタミン欠乏、過剰な銅などの給与によっても筋胃びらんが再現されたことから、筋胃びらんは食餌性の疾患であるという認識が定着した。

近年、アデノウイルス科、アビアデノウイルス属（family *Adenoviridae*, genus *Aviadenovirus*）に属する鶏アデノウイルス（Fowl adenovirus: FAdV）も筋胃びらんを起こすことが知られるようになった。FAdVの一部の株は封入体肝炎（IBH）や心膜水腫症候群（HPS）の原因として知られているが、ほとんどの血清型のFAdVによるIBHの自然発生例がある一方で健康な鶏からもウイルスが分離されることや、経口投与による疾病の実験的再現が難しいなどその発生起序については不明な点が多い。Grimesらは1977年にFAdV血清型8（FAdV-8）を感染させた鶏に筋胃びらんが発生することを認めた。しかし、この実験ではウイルス分離は実施されておらず、筋胃病変部にFAdVに特徴的な封入体が認められなかったことからFAdVと筋胃びらんの関係については十分明らかにされなかつ

た。1990年代に入ると採卵鶏、ブロイラー、およびウズラなどで封入体を伴う筋胃びらんの野外発生例が報告されるようになった。これらはいずれも単発的な発生でウイルス分離も実施されていないが、FAdVが筋胃びらんを引き起こす可能性が示唆された。2000年代に入ると国内でFAdVによるブロイラーの筋胃びらんの発生報告が相次ぐようになった。Onoらは1998年および1999年に出荷ブロイラーで発生した2件の筋胃びらん集団発生事例について調査した結果、筋胃病変部粘膜上皮細胞にFAdV抗原陽性の核内封入体を確認するとともにFAdV血清型1(FAdV-1)を分離した。これは出荷ブロイラーに集団発生したFAdVによる筋胃びらんの初報告であり、また、筋胃びらん病変部からの最初のウイルス分離例であった。

このような背景のなか、本研究では筋胃びらん由来FAdVの病原性を明らかにするために鶏をもちいた感染試験を実施し、その病態を調査した。

第1章では筋胃びらん病変部由来のFAdV-1である、99ZH株をspecific-pathogen-free採卵鶏(SPF鶏)に接種してその病原性を調査した。99ZH株を5日齢のSPF鶏に経口および点眼接種したところ、接種後3~14日目に筋胃びらんが形成された。これらの病変では病理組織学的にリンパ球、マクロファージなどの細胞浸潤や核内封入体が認められ、野外症例と同様の筋胃びらんであった。ウイルス分離を実施した結果、腺胃、筋胃、脾臓、および直腸からFAdVが分離されたが、肝臓からは分離されなかった。同様の結果は99ZH株を接種した53日齢のSPF鶏でも認められた。また、FAdVはこれまで封入体肝炎などにみられるように鶏の肝臓に強い親和性をもっているとされていたが、本試験の結果では接種鶏の肝臓からウイルスが分離されなかったことから、筋胃びらん由来のFAdVは肝臓よりも筋胃に強い親和性を持っている可能性が示唆された。

第1章で筋胃びらん由来FAdVがSPF鶏に筋胃びらんを形成することを明らかにしたが、その病変の程度が野外症例よりも軽度であったこと、およびFAdVによる疾病は一般的に採卵鶏よりもブロイラーで重篤であるとされていることから、第2章ではブロイラーをもちいた感染試験を実施した。また、感染時日齢や接種ウイルス量の違い、および保有している移行抗体が病変形成に及ぼす影響を調査した。99ZH株を移行抗体を保有しない5週齢のブロイラーに接種したところ、接種後5~10日目に筋胃びらんが形成された。3週齢のブロイラーをもちいた試験では、保有している99ZH株に対する移行抗体価によって試験群を設定した。その結果、いずれの試験群でも接種後4~10日目に筋胃びらんが形成された。次に高い移行抗体を保有する1週齢のブロイラーをウイルス接種量で群別けした。その結果、高い移行抗体を保有している鶏に低力価のウイルスを接種した試験群でも筋胃病変が形成された。諸臓器からのウイルス分離の結果、筋胃など消化管臓器から分離されるものの肝臓、腎臓、脾臓からは分離されなかった。また、3週齢および1週齢のブロイラーをもちいた試験では元気消失、食欲不振といった臨床症状を示し増体率が悪化する鶏も認められた。各試験区に共通して筋胃病変はSPF鶏への感染試験におけるものと比較して肉眼的に重篤であり、野外症例と同程度であった。本試験の結果、FAdVによって

野外症例と同程度の筋胃病変が再現されることが明らかとなり、重篤な病変を形成した場合は発育不良を引き起こす可能性があることが示された。また、高い移行抗体を保有している鶏にも感染し病変を形成したことから、経口的に感染したウイルスは筋胃粘膜に直接感染するため血中の移行抗体では感染および病変形成を防御できないものと思われた。

第1章および第2章で、筋胃びらん由来の FAdV-1 によって筋胃びらんが再現されることを明らかにした。また、Ono らは日本全国 18 ヶ所の食鳥処理場で廃棄された筋胃の調査をおこなったところ、その大半は FAdV-1 が関与したものであることを報告している。しかし一方で、FAdV-1 の国内標準株である Ote 株は筋胃びらんを再現しない。これらのことから、FAdV-1 には筋胃びらんを引き起こすウイルス株と引き起こさないウイルス株が存在する可能性があると思われた。そこで第3章では、99ZH 株と Ote 株のファイバー遺伝子の比較をおこなった。筋胃びらん由来の FAdV-1 (99ZH、AGE42、AGE56) および Ote 株のファイバー遺伝子についてその全長を PCR で増幅後シークエンスし、塩基配列を比較した。その結果、ショート・ファイバー遺伝子では 4 株とも塩基配列が 100%一致した。一方でロング・ファイバー遺伝子では筋胃びらん由来の 3 株では 100%一致したものの Ote 株とは 14 塩基の置換が認められた。この違いの一つを認識する制限酵素 Hinf でロング・ファイバー遺伝子の PCR 産物を切断したところ、両者を区別することができた。次に、16 株の筋胃びらん由来 FAdV-1 と 10 株の健康採卵鶏糞便由来 FAdV-1 についてこの PCR-RFLP 解析を実施したところ、筋胃びらん由来の 16 株は全て 99ZH と同じ切断パターンであった。一方で健康鶏糞便由来の 10 株では 99ZH と同じ切断パターンが 3 株、Ote と同じ切断パターンが 6 株、両者の混合型が 1 株であった。そこで、この切断パターンと病原性の関係を確認するために、SPF 鶏をもちいた感染試験を実施した。接種ウイルスには 99ZH および AGE42 (筋胃びらん由来、99ZH 型の切断パターン)、NF01 および NF02 (糞便由来、Ote 型の切断パターン)、NF10 (糞便由来、99ZH 型の切断パターン) の 5 株をもちいた。その結果、切断パターンが 99ZH 型であった 3 株で筋胃びらんが再現されたが、Ote 型であった 2 株では病変は形成されなかった。以上の結果から、FAdV-1 には筋胃びらんを引き起こすウイルス株と引き起こさないウイルス株が存在することが明らかとなり、両者はロング・ファイバー遺伝子の PCR-RFLP 解析で区別できるものと思われた。

第1章から第3章で筋胃びらんの主要な原因である FAdV-1 の病原性を明らかにしてきたが、廃棄された筋胃の病変部から稀にはあるが FAdV-8 も分離されている。筋胃からの FAdV-8 の分離例が少ないこと、および FAdV-8 は過去に日本国内で封入体肝炎の原因ウイルスとしての報告があることから、第4章では筋胃びらん病変部から分離された FAdV-8 の病原性を確認するために SPF 鶏をもちいた感染試験を実施した。筋胃びらん由来 FAdV-8 である M013 株または G0054 株を 5 日齢の SPF 鶏に経口接種したところ、軽度ではあるが筋胃びらんが確認され、筋胃からウイルスが分離された。次に 1 日齢の SPF 鶏に G0054 株を筋肉内接種したところ、接種後 3 日目から死亡する鶏や沈うつや元氣消

矢といった重篤な臨床症状を示す鶏が確認された。それらの鶏を剖検したところ、肝臓が退色しており病理組織学的に核内封入体を伴う壊死性の肝炎および脾炎が確認された。また、肝臓および脾臓から高い力価のウイルスが分離された。これらのウイルス学的および病理学的検査の結果から FAdV-8 の筋肉内接種によって引き起こされた疾病は典型的な IBH であることが明らかとなった。以上の結果から、筋胃びらん由来の FAdV-8 には経口接種で筋胃びらんを再現するだけでなく、筋肉内接種で封入体肝炎を再現するウイルス株が存在することが明らかとなった。