

# 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

尾形 透<sup>1)</sup> 佐々木 淳<sup>1)</sup> 倉持 好<sup>1)</sup> 川崎武志<sup>2)</sup> 御領政信<sup>1)†</sup>

1) 岩手大学農学部 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

2) 人と鳥の健康研究所 (〒099-3119 網走市鱒浦2-7-1)

(2011年4月18日受付・2011年8月10日受理)

## 要 約

1990年代後半に封入体肝炎 (IBH) の原因として分離された3株のトリアデノウイルス (AAV) と2009年に分離され、卵黄囊上皮細胞に親和性のあることが確認された1AAV株を、SPF初生鶏雛の大腿部に筋肉内接種した。全接種群で接種後3~7日に多くの雛が死亡した。組織学的には全接種群で、従来から認められてきた肝細胞、脾臓腺房細胞及び十二指腸粘膜上皮細胞に加えて、卵黄囊上皮細胞に好塩基性核内封入体の形成が認められた。以上から、卵黄囊上皮細胞も多くのIBH由来のAAVの標的細胞となることが示唆された。

——キーワード：トリアデノウイルス、接種実験、封入体肝炎、卵黄囊上皮細胞。

----- 日獣会誌 65, 37~41 (2012)

封入体肝炎 (IBH) はトリアデノウイルス (AAV) を原因とし、おもに3~7週齢のプロイラーに発生する致死率10~30%の感染症であり、病理組織学的には肝臓における核内封入体を伴う壊死性肝炎を特徴とする [1]。

著者らは、野外のある若齢プロイラー鶏群のIBH症例において、肝臓、脾臓、十二指腸粘膜上皮細胞の他に、卵黄囊上皮細胞に核内封入体形成のみられる症例に遭遇した。この症例から分離された2株のウイルスは、接種実験によって卵黄囊上皮にも親和性を持つことが確認された。この事実から、それらの株がAAVの新たな株である可能性が示唆された [2]。この示唆に基づいて、過去にIBH症例から分離したAAVを用いた感染実験を行い、卵黄囊上皮細胞への感染性について病理学的に検索した。

## 材料及び方法

**供試鶏：**感染実験及び組織培養には研究室で維持している白色レグホン種P2系SPF鶏の有精卵を孵化して用いた。実験は岩手大学動物実験委員会の承認を得て実施し、雛は炭酸ガス殺後に剖検した。

**ウイルス株：**卵黄囊への親和性が確認されているAAV (8754株) [2] 及び1990年代後半に本学にて分離

されたAAV (419株, 437B株, 438A株) を用いた。凍結保存されていた株を解凍後、初生雛の腎臓から採材、培養した鶏腎 (CK) 細胞に接種後、細胞変性効果 (CPE) の発現を確認し、接種後4日目に培養上清を採取し、これをウイルス液とした。ウイルス力価はすべて $10^5$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlであった。

**感染実験：**初生雛29羽を用い、それぞれの株について7羽 (438A株は8羽) に0.1ml ( $10^5$ TCID<sub>50</sub>/0.1ml) を右大腿部外側に筋肉内接種した。観察期間は7日間とし、死亡雛は発見時、生残雛は接種後7日目に剖検に供した。また、ウイルス未接種初生雛5羽を対照群とした。

**病理組織学的検索：**感染実験群より主要臓器、胸腺及びファブリキウス嚢 (F嚢)、卵黄嚢を採材後、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、病理組織学的に検索した。

## 成 績

**臨床及び剖検所見：**接種群では接種後3日目より多くの雛に沈鬱症状が現れ、3~7日目にかけ多くの雛が死亡し、特に438A株接種群では接種後4日目にすべての雛が死亡した (図1)。肉眼的に、死亡雛のすべてにおい

† 連絡責任者：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 ☎019-621-6217 FAX 019-621-6274 E-mail : goryo@iwate-u.ac.jp

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

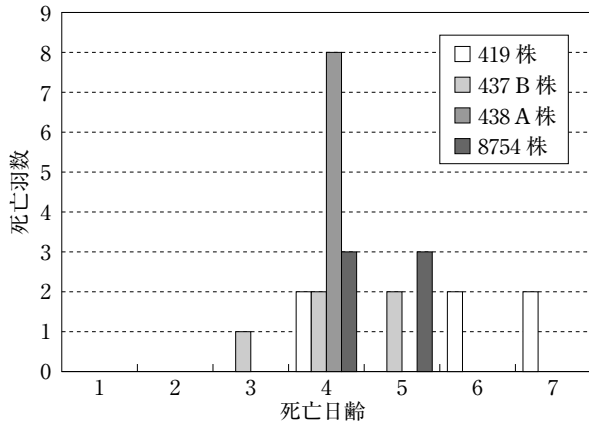


図1 各接種株による死亡羽数及び死亡日齢



図2 419株接種後6日目の死亡例  
開腹時肝臓は腫大・退色及び脆弱化し、斑状変色巣、  
び慢性出血が認められる

表1 感染実験群における死亡雛及び生残雛の平均臓器重量及び体重比

ウイルス株	重量及び体重比	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目 (死亡雛)	7日目 (生残雛)
419株 接種群 (N=7)	体 重 (g)	—	27.1 ± 2.3* (N=2)	—	26.2 ± 0.4 (N=2)	26.2 ± 2.8 (N=2)	30.5 (N=1)
	肝 臓 (g)	—	1.65 ± 0.1	—	21.5 ± 0.4	20.5 ± 0.2	2.5
	肝臓/体重 (%)	—	6.10	—	8.20	7.90	8.20
	卵黄囊 (g)	—	2.4 ± 0.6	—	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.3	1.2
437B株 接種群 (N=7)	体 重 (g)	27.5 (N=1)	28.2 ± 2.2 (N=2)	27.6 ± 0.2 (N=2)	—	—	45.8 ± 4.4 (N=2)
	肝 臓 (g)	1.6	2.10 ± 0.2	1.9 ± 0.1	—	—	2.30 ± 0.3
	肝臓/体重 (%)	5.80	7.30	6.90	—	—	5
	卵黄囊 (g)	0.7	2.8 ± 1.8	1.4 ± 0.4	—	—	0.5 ± 0.6
438A株 接種群 (N=8)	体 重 (g)	—	26.7 ± 0.8 (N=8)	—	—	—	—
	肝 臓 (g)	—	1.80 ± 0.2	—	—	—	—
	肝臓/体重 (%)	—	6.90	—	—	—	—
	卵黄囊 (g)	—	1.1 ± 0.4	—	—	—	—
8754株 接種群 (N=7)	体 重 (g)	—	25.3 ± 1.9* (N=3)	27.8 ± 1.2 (N=3)	—	—	38.5 ± 1.9 (N=2)
	肝 臓 (g)	—	1.50 ± 0.4	2.0 ± 0.1	—	—	3.2 ± 0.4
	肝臓/体重 (%)	—	5.90	7.30	—	—	8.30
	卵黄囊 (g)	—	1.6 ± 1.4	1.9 ± 0.3	—	—	1.3 ± 1.1
対照群 (N=5)	体 重 (g)	—	—	—	—	—	55.8 ± 7.0 (N=5)
	肝 臓 (g)	—	—	—	—	—	2.72 ± 0.3
	肝臓/体重 (%)	—	—	—	—	—	4.90
	卵黄囊 (g)	—	—	—	—	—	0.4 ± 0.0

\*平均 ± 標準偏差

て肝臓の軽度から重度の腫大、脆弱化及び点状出血が認められた (図2)。接種群の肝臓/体重比は対照群に比べ増加していた。また、脾臓の退色もすべての死亡雛において認められたが、萎縮は認められなかった。卵黄囊は死亡雛、生残雛ともに個体により重量のばらつきが大きく、一部では出血も認められた。その他の臓器における病変は認められなかった (表1)。

**病理組織学的成績：**死亡例における各臓器の病変は表2に示す。肝臓ではウイルス株、個体により程度の差は認められるものの、死亡例のすべて、及び419株接種群の生残例において肝細胞に好塩基性核内封入体の形成が認められた。封入体が認められた核は通常の肝細胞核と比べ2ないし3倍に膨化し、封入体は核全体を均一に満たすもの、顆粒状を呈するもの、ハローを伴うものな

表2 感染実験群における組織学的病変

臓器	病変	419株 接種群	437B株 接種群	438A株 接種群	8754株 接種群
肝臓	核内封入体	7/7	5/7	8/8	6/7
	壊死	7/7	5/7	7/8	7/7
卵黄囊	核内封入体	5/6*	5/5*	8/8	6/7
脾臓	核内封入体	7/7	4/7	7/7*	4/5*
腸管粘 膜上皮	核内封入体	4/5*	4/7	2/3*	2/3*
脾臓	マクロファージ の増加	6/6*	4/7	8/8	6/7
	リンパ球の減少	6/6*	4/7	8/8	6/7
ファブリ キウス囊	リンパ球の減少	5/5*	1/4*	2/3*	2/5*

\*死後変化の高度な組織は含まない

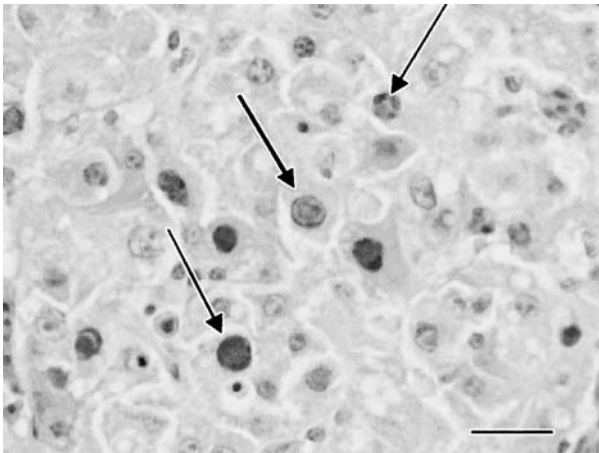


図3 419株接種群4日目の肝臓

肝細胞の核は腫大し、核内に好塩基性に染まる封入体(矢印)が認められる。周囲の肝細胞では壊死が認められる(HE染色 Bar = 20 $\mu$ m)

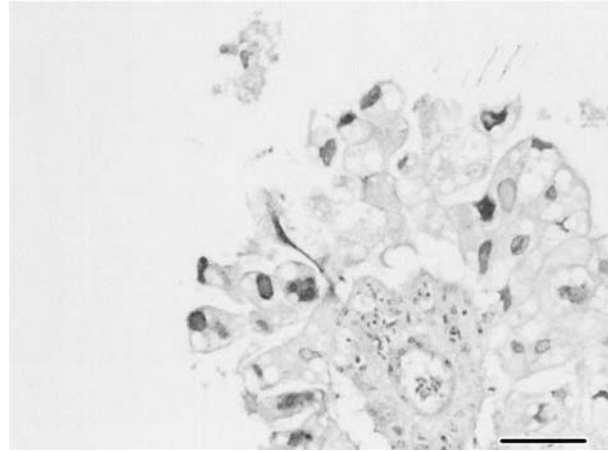


図4 419株接種群4日目の卵黄囊

卵黄囊上皮細胞の核内にさまざまな形態の好塩基性封入体が認められる(HE染色 Bar = 50 $\mu$ m)

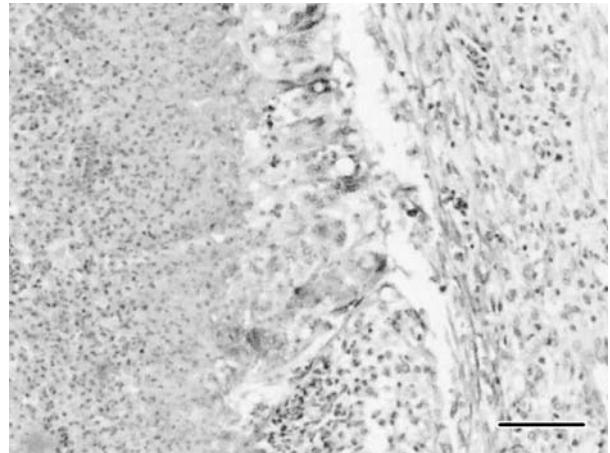


図5 437B株接種群7日目の卵黄囊

卵黄囊内腔に細菌塊が認められ、炎症性細胞、類上皮細胞及び多核巨細胞が浸潤しており、肉芽腫を形成している(HE染色 Bar = 50 $\mu$ m)

ど、さまざまな形態を呈していた(図3)。また、死亡例、生残例の両方において肝臓の巣状壊死、軽度の炎症細胞浸潤が認められ、生残例では胚中心の形成が1例でみられた。

卵黄囊ではすべての死亡例及び419株接種群の生残例において、卵黄囊上皮細胞に好塩基性核内封入体の形成が認められた。封入体は肝細胞で認められたものと同様で、さまざまな形態が観察された(死後変化が著しいものは除く)(図4)。また、437B株接種群の生残例では細菌集塊、肉芽腫の形成が認められた(図5)。

脾臓では腺房細胞においてすべての死亡例及び419株接種群の生残例において好塩基性核内封入体が認められ、軽度な脾臓間質の線維性増生や、広範な壊死を伴う例もあった。また、生残例の一部でリンパ球、形質細胞、組織球からなる胚中心の形成が認められた。

十二指腸では粘膜上皮細胞の壊死、剝離などが多く認められ、多数の例で粘膜上皮細胞に好塩基性核内封入体の形成がみられた(図6)。

脾臓ではすべての死亡例及び419株接種群の生残例においてリンパ濾胞の消失、リンパ球の減少、マクロファージの高度な浸潤、細網細胞の明瞭化などが認められた。

F囊では死亡例の一部においてリンパ球の減少が認められ、濾胞構造は不明瞭になっていた(図7)。

その他の臓器、及び対照群では著変は認められなかった。

## 考 察

今回の感染実験に用いた4株のトリアデノウイルス株接種雛のすべてにおいて、従来より報告されている病変

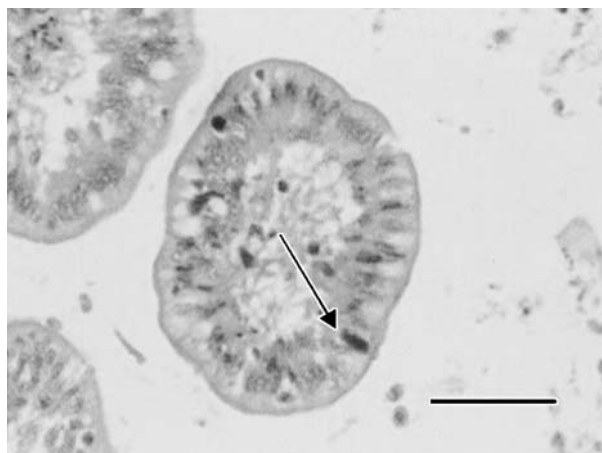


図6 419株接種群4日目の十二指腸  
十二指腸粘膜上皮細胞の核に好塩基性封入体が認められる (HE染色 Bar = 50 $\mu$ m)

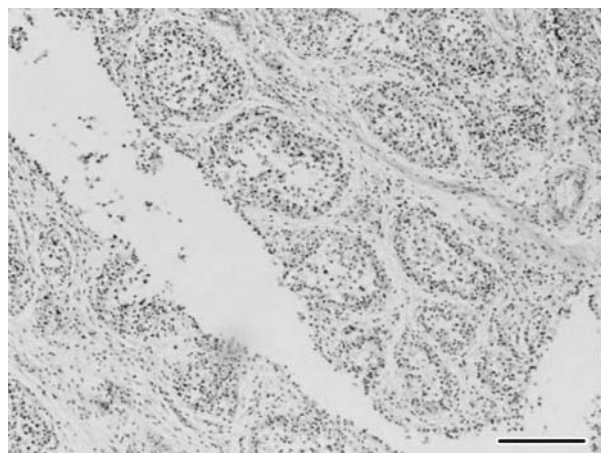


図7 437B接種群4日目のファブリキウス嚢  
リンパ濾胞におけるリンパ球の高度な脱落が認められる (HE染色 Bar = 100 $\mu$ m)

に加え、卵黄囊上皮細胞に好塩基性核内封入体の形成が確認された。AAVはさまざまな臓器に対して親和性があり、核内封入体を形成することが知られているが [3-6]、卵黄囊上皮細胞における核内封入体形成は前回の著者らの報告が初めてであった [2]。今回の成績は、過去に分離されたウイルス株でも卵黄囊上皮細胞への親和性を示しており、多くのAAV株が卵黄囊上皮細胞を標的とするものと思われる。なお、今回用いたウイルス株はすべてIBHの原因ウイルスとして分離されたものであり、卵黄囊病変はIBHの病理所見の一つとして広く認められることが示唆された。

卵黄囊及び卵黄腸管は空回腸の対腸間膜側に開口し、孵化後は卵黄囊壁及び空回腸を経由し、筋胃壁の血管より吸収され雛への栄養補給を行い、約10日で瘢痕組織となる [7]。AAV感染症は本実験でも認められるように雛の増体抑制を伴うことが知られている [1]。今回の実験では卵黄囊重量は個体差が大きく、ウイルス感染による吸収抑制は明確ではなかったが、ウイルスが卵黄囊への親和性を持つことは栄養供給の障害につながると考えられ、これが増体抑制の一因である可能性が高い。

卵黄囊感染症は衛生管理状態の悪い時に、孵化時に卵殻から、または孵化直後に臍部から細菌が感染することによって発症する。この感染症では、大腸菌、ブドウ球菌、サルモネラ属菌、緑膿菌、プロテウス属菌などが多く認められる細菌である [6]。これは大部分が孵化直後から1週間以内に発生し、死亡率の上昇 (5~10%) が認められるとされており、本実験では437B株接種群の生残鶏において多くの細菌集塊や肉芽腫の形成が認めら

れ、卵黄囊感染症が発生したと考えられたが、その他の雛では細菌集塊は認められたものの、炎症反応などは軽微であった。

#### 引用文献

- [1] McFerran JB, Adair BM : Group I adenovirus infections, In : Diseases of Poultry, (Saif YM et al eds), 11th ed, Iowa state University Press, Iowa, 214-227 (2003)
- [2] 福岡寛之, 佐々木 淳, 岡田幸助, 川崎武志, 御領政信 : プロイラー雛の卵黄囊上皮細胞に感染性を示すトリアデノウイルス感染症, 鶏病研報, 46, 181-187 (2010)
- [3] 御領政信 : 鶏貧血因子に起因した貧血症の自然例および実験例の病理・超微形態学的変化について, 鶏病研報 (増刊号), 23, 13-26 (1987)
- [4] Nakamura K, Mase M, Yamaguchi S, Shibahara T, Yuasa N : Pathologic study of specific-pathogen-free chicks and hens inoculated with adenovirus isolated from hydropericardium syndrome, Avian Dis, 43, 414-423 (1999)
- [5] Grimes TM, Fletcher OJ, Munnell JF : Comparative study of experimental inclusion body hepatitis of chickens caused by two serotypes of avian adenovirus, Vet Pathol, 15, 249-263 (1978)
- [6] Hoffmann R, Wessling E, Dorn P, Dangschat H : Lesions in chickens with spontaneous or experimental infectious hepato-myelopoietic disease (inclusion body hepatitis) in Germany, Avian Dis, 19, 224-236 (1975)
- [7] McLelland J : Digestive system, 60. In : A colour atlas of avian anatomy, Wolfe Publishing, England (1990)

Infectivity of Three Avian Adenovirus Strains Causing Inclusion Body Hepatitis  
to Yolk Sac Epithelial Cells of Chicks

Toru OGATA\*, Jun SASAKI, Konomi KURAMOCHI, Takeshi KAWASAKI  
and Masanobu GORYO†

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

**SUMMARY**

Four avian adenovirus (AAV) strains were inoculated intramuscularly into the femoral area of day-old SPF chicks. These strains were isolated from chickens or chicks with inclusion body hepatitis (IBH) : Three were isolated in the late 1990s and the other one having infectivity to yolk sac epithelial cells was isolated in 2009. In all experimental groups, most of the chicks died at 3 to 7 days post-inoculation. Histologically, basophilic intranuclear inclusion bodies were demonstrated in yolk sac epithelial cells in addition to hepatocytes, pancreatic acinar cells, and duodenal mucosal epithelial cells. The results suggest that many AAV strains causing IBH might infect yolk sac epithelial cells.

— Key words : avian adenovirus, experimental inoculation, inclusion body hepatitis, yolk sac epithelial cells.

† *Correspondence to : Masanobu GORYO (Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Iwate University)  
Ueda 3-18-8, Morioka-shi, 020-8550, Japan*

*TEL 019-621-6217 FAX 019-621-6274 E-mail : goryo@iwate-u.ac.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 37 ~ 41 (2012)*