

氏名(本籍)	小山 弘 之 (神奈川県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙 第 96 号
学位授与の日付	昭和51年12月20日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題名	ニワトリヒナに特異な病変を起すC-型ウイルスに関する研究——特に七面鳥ヘルペスウイルス株に混在したウイルスの分離——
論文審査委員	(主査) 教授 齋藤 保 二 (副査) 教授 越智 勇 一 教授 今井 信 実

論文内容の要旨

目 的

著者は七面鳥ヘルペスウイルス (Herpesvirus of Turkey, HVT) の発育過程について電子顕微鏡観察を行っていた際、HT-1株 (HVT) 感染アヒル胎児細胞 (DEF) 及びニワトリ胎児細胞 (CEF) 内において HVT 粒子と共に C-型粒子の存在することを発見した。この粒子は形態学的には 80nm の C-型粒子として観察されることから Oncorna virus group に属する avian leukosis-sarcoma group (ALSV) のウイルスと類似しているが、対照細胞では観察されないことから接種材料に起因すると考えた。しかし DEF では ALSV の増殖が不可能とされていることから推測すると、この粒子は ALSV 以外の C-型を示すウイルスであろうことが示唆される。

現在まで HVT 感染においてこのような C-型粒子が観察されたという報告は皆無である。

一方、HVT はマレック病生ワクチンとして全世界でその防禦効果が認められ DEF 或は CEF でウイルスを増殖させた生ワクチンとして使用されており、著者の用いた HT-1 株も分離以来、ニワトリ及びアヒル細胞で続代維持されて来たことを考えると、観察された C-型粒子によるワクチンの汚染の可能性も考えられる。

以上の理由から著者は今回観察された C-型粒子のニワトリに対する病原性と、その粒子のウイルス学的位置付けを目的として実験を行った。

実験成績

1) “nakanuke” agent の分離

北里研究所、附属家畜衛生研究所、伊沢等によって我が国で最初に七面鳥から分離された HVT (HT-1 株) の内、ニワトリ腎臓、アヒル腎臓及び DEF で各々、18, 17, 7 代通過したウイルスを入手後著者によって更に DEF で 9 代通過した材料を HT-1-(9) と付号して実験の出発材料とした。

HT-1-(9) を感染させた DEF 及び CEF には HVT 粒子の他に C-型粒子が電子顕微鏡によって観察された。そこで C-型粒子を含むと考えられる HT-1-(9) を幼若ヒナに接種し病原性を調べた。接種ヒナは 3 週後、正羽翼、副羽翼の中間層に特異な変化を示した。即ち、羽の中間部分の羽弁が正常に開かず、羽軸に密着するものである。このような症状は未報告であり著者らによって初めて観察され羽翼の“中抜け”

("nakanuke") と呼ばれた。

次に HT-1-(9) を DEF 及び CEF で 3 継代しても同様な "nakanuke" を引き越すこと、HT-1-(9) から調製した 0.45μ 濾過材料及びその濾過材料に抗 HVT 血清を加え HVT を中和、不活化した材料の接種によっても "nakanuke" が引き起される事実から、出発材料中に "nakanuke" を誘発する因子が存在し、その因子は HVT 以外の自己増殖力を持つ濾過性微生物であることが証明され、この因子を "nakanuke" agent と命名した。

"nakanuke" agent は HT-1-(9) 濾過材料を抗 HVT 血清処理し、初めに CEF を用いて分離し、二、三の実験を行った。しかしこれらの実験に使用した CEF-自体が ALSV の subgroup. A. B 以外の C-型ウイルスによって垂直感染を受け汚染されていることを知った。この垂直感染した C-型粒子はヒナに "nakanuke" を誘発しないが、"nakanuke" agent と形態学的に類似しているため以後の実験が不明確になることが想像された。そこで、C-型粒子の垂直感染のない DEF を用いて再度出発材料から CEF で用いた同様の方法で "nakanuke" agent の単離を行った。単離した "nakanuke" agent は DEF 及び CEF で増殖し培養液中に agent を放出するが、前者のみに細胞変性 (CPE) を示し、感染価の測定が可能であった。agent は感染細胞内で大きさ 80nm の C-型粒子として観察され、HT-1-(9) で認めたものと類似していた。

2) Agent の形状並びに生化学的性状

"nakanuke" agent が培養液中に放出されることを利用し、 ^3H -Uridine の存在下で培養後、培養液から agent を濃縮し、sucrose gradient で遠心分画し測定した結果、粒子は比重 $1.16\text{g}/\text{CC}$ でアソトープ活性の測定から粒子の核酸は RNA 型であった。同様に培養液から濃縮精製した粒子をネガティブ染色により観察すると大きさで 80~100nm 表面に多数の spike を有する C-型粒子であった。

3) Agent の病原性

単離 "nakanuke" agent は HT-1-(9) と同一の "nakanuke" をヒナに引き越した。これらヒナを長期観察すると、接種 3 週頃より正羽翼、副羽翼全体、一部に "nakanuke" を示し、それらは 5~8 週に至り "nakanuke" 部分が羽の上端に移行し、ついには正常な羽で置換する例と、強い "nakanuke" により正羽及び全身の羽毛が脱落しそれらが後に正常の羽又は羽毛で置換し正常の発育をとげるもの、或は正羽全体に及ぶ "nakanuke" を示し、ヒナの発育は著しく抑制され、正常の羽に置換することなく、強い貧血を示し斃死する例、等が観察される。"nakanuke" agent 接種ヒナの血液や多くの臓器から agent が再分離され、ヒナからヒナへの伝達が可能であることから、接種ヒナの体内における agent の増殖による衝撃の強さにより種々な "nakanuke" が観察されるものと考えられる。

4) Agent のウイルス学的同定

単離 "nakanuke" agent が CEF 及び DEF で増殖する C-型粒子であることから既知ウイルスでは七面鳥白血病ウイルス (Reticuloendotheliosis virus group, REVs) が最も近縁と考え、REVs の代表株である T 株を用いて抗原的関係を調べた。

"nakanuke" agent, REV-T 株及び ALSV の代表株である Rous sarcoma virus (RSV) を DEF 及び CEF に接種し、抗 "nakanuke" agent 及び抗 REV-T 株血清による間接蛍光体法を行った結果、"nakanuke" agent と REV-T 株間で交叉反応が認められた。又、抗 "nakanuke" agent, 抗 REV

-T 株血清と両ウイルス間で交叉中和反応を行い、DEF に接種後、両ウイルスの抗原合成を蛍光体法で測定した結果、完全に交叉中和が成立し、分離“nakanuke” agent が REVs に属することが同定された。この結果は農林省動物医薬品検査所、分与の抗 REV-T 株標準血清によっても確認された。

5) REV-T 株との病原性の比較

REV-T 株はニワトリヒナ、アヒルヒナ等に対し reticuloendotheliosis を引き起し接種後2週以内に宿主を高率に腫瘍死させることが知られている。著者はこのT株を入手後 DEF で1～2代通過することによりその造腫瘍性の減弱と消失を確認するとともに、接種ヒナが著者らの観察した“nakanuke”を発症することを初めて発見した。この“nakanuke”は分離“nakanuke” agent によるものと同様の症状を示しその経過も類似していたが、T株はやや強い病原性を示した。

次に DEF 通過 REV-T 株が“nakanuke”を発症することを利用し、この“nakanuke”が抗“nakanuke” agent 及び抗 REV-T 株血清によって阻止されるか否かを実験した。その結果、抗“nakanuke” agent 血清は“nakanuke” agent と REV-T 株による各々の“nakanuke”を阻止した。逆に REV-T 株血清は REV-T 株と“nakanuke” agent による“nakanuke”を阻止し、交叉中和が成立した。それに対し、抗 RSV 血清、正常血清では両ウイルスによる“nakanuke”の発症は全く阻止出来なかった。

ニワトリヒナ継代 REV-T 株で腫瘍死したヒナでは病理学的に多数の reticuloendothelial system から端を発した細胞が観察されるが、それに対し DEF 通過T株及び“nakanuke” agent 接種ヒナではその細胞の出現は少く、腫瘍性の変化に至らないし、腫瘍死することもない。これらの接種ヒナが死亡する例では全て強い発育抑制と貧血を伴い斃死する。

考 察

REVs は米国において臨床症状を伴った七面鳥、アヒル、ニワトリから6株が分離され、これらの株は病原性の強いものから弱いものまで分布することが報告されている。しかし、これらの報告においては著者らの観察した“nakanuke”については未報告である。一方、我が国における REVs の研究は皆無であり、著者らの報告が最初となった。我が国では1974年春から秋にマレック病生ワクチン (HVT を DEF 又は CEF で増殖させた感染細胞ワクチン) の接種事故が発生したが、この事故鶏は著者らの観察した同様の“nakanuke”を示し、その後の研究でも事故例ワクチンから著者らと同様の REVs が分離されるに至った。同時に REV-T 株を DEF 及び CEF で通過することにより“nakanuke”を引き起すことが追試確認された。上記の如く我が国における REVs の分離は著者を初めとして全て HVT 感染細胞から分離された。そして著者らの系を含めて分離ウイルスがどの時点で迷入して来たかについては全く不明である。米国における REVs は野性的水鳥を本来の宿主とし、それが何んらかの方法で、七面鳥、アヒル、ニワトリ等に伝染すると考えられていることから推測すると、著者らの使用した HT-1 株の1亜系がたまたま REVs によって汚染されていたと考えられる。事実 HT-1 株の他の2つの亜系は REVs の迷入が著者らによって否定されている。これらのことから HT-1 株の継代に使用した細胞、特に DEF からの迷入が考えられる。

我が国における REVs の分布については全く不明の状態であるが、今後この種のウイルスによる野外での汚染が考えられ、鳥類の発育卵を用いる実験及びワクチンについての重要な問題となるであろう。我が国

ではこれらの理由から發育卵を用いる動物用，人体用ワクチンは全て REVs の否定を行うことが実施されるに至った。

結 論

HT-1株 (HVT) の1亜系に混在していた C-型ウイルスを初めて分離した。このウイルスは大きさ 80~100nm・C-型を示す RNA ウイルスで比重 1.16g/CC，血清学的には REV 群に属するものであった。又，このウイルスはニワトリヒナに対し羽翼の特異な病変“中抜け” (“nakanuke”) を起した。更に REV-T 株でも DEF 細胞を通過することよりその造腫瘍性の減弱を来たし“nakanuke”を発症することを発見した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

わが国の養鶏業の隆盛にともない，多数羽飼育による各種の鶏病の集団発生に備えてワクチン接種が種々行なわれているが，昨今，マレック病の予防の為に生ワクチンが用いられるようになった。現在，わが国では七面鳥ヘルペスウイルスがニワトリに対して病原性が弱く，しかもその接種によりマレック病に対する抗体を付与することから，一般に生ワクチンとして用いられている。

著者は七面鳥ヘルペスウイルス (Herpes Virus of Turkey, HVT) の感染細胞の發育過程の電顕観察を行っていたところ，HT-1株 (HVT 分離株) に感染したアヒル胎児細胞 (DEF) およびニワトリ胎児細胞 (CEF) 内に HVT 粒子と共にある種の C 型粒子の存在することを発見した。この C 型粒子はニワトリ白血病ウイルス (ALSV) に類似しているが，抗原的に異り，この C 型粒子のみをニワトリヒナに接種するとヒナの發育を障害し，且羽毛に中抜けという特異な変状を来たすことがわかった。著者がこの新事実を明らかにした直後，マレック病ワクチン接種ヒナに同様の病変が起ることが見出され，本ウイルスの混入が考えられて学界の注目を浴びた。以下，ウイルスの分離，同定とその病原性などの概略を記する。

I ウイルス分離の材料と方法

伊沢らによりわが国で最初に七面鳥から分離された HVT (HT-1 株) のニワトリ腎18代，アヒル腎17代 DEF 7代，計42代を通過したものを更に DEF 9代通過したものが出発材料，HT-1-(9) である。

この材料を DEF および CEF に感染させて電顕により観察したところ，HVT 粒子以外に C 型粒子が発見されたので，これをニワトリヒナに接種してみたところ，3週後に正羽翼，副羽翼の羽の中間層の羽弁が開かず，羽軸に密着し，一見，中間部分が抜けたような病変を生じた。著者は之を中抜け“nakanuke”と称した。HT-1-(9) を更に DEF と CEF で3代継代した材料，あるいは HT-1-(9) を 0.45 μ のミリポアフィルターを通した材料，およびこの濾過材料を更に抗 HVT 血清を加え HVT を中和，不活化した材料をつくりニワトリヒナに接種しても同様の変化が羽に起ったので，上記の電顕で初め認められた C 型粒子がこの原因と考えられ，これを中抜け因子“nakanuke agent”と命名した。

初め，本因子は HT-1-(9) の濾過材料を抗 HVT 血清処理し，CEF を用いて分離したが，CEF には本来 ALSV の subgroup A, B 以外の C 型粒子の感染があるので，CEF の使用をやめ，ALSV の感染のない DEF を用いて CEF と同様の方法で agent の分離を行なった。分離した agent は DEF および CEF で増殖し，共に培養液中に放出されるが，DEF のみが細胞変性 (CPE) を示し，感染価の測定が可能であった。

II ウイルスの生化学的性状と形態

³H-uridine の存在で感染細胞を培養後、培養液からウイルス (agent) を濃縮、sucrose gradient で遠心分画し、測定の結果、粒子は比重1.16g/cc、アイトープ活性の測定から粒子の核酸は RNA 型であり、粒子のネガティブ染色による電顕観察では大きさ 80~100nm で、表面に多数の spike を持ち、切片標本によると粒子の中心に比較的に大きな core を有する C 型粒子であった。

III ウイルスの病原性

ウイルスを接種したヒナの長期観察では、接種後 3 週頃より正羽翼、副羽翼全体、又は一部に“nakanuke”が起り、5~8 週でこれが羽の上部に移行し、その後正常の羽に抜け代るものと、強い“nakanuke”のため正羽と全身の羽毛の総てが抜け代るものがあり、これらは死ぬことが殆どなく、又、正羽全体が“nakanuke”状になって発育が著しく抑制され、正常の羽に抜け代ることがなく、強い貧血を起して死亡するものなどが見られる。このようにヒナの体内におけるウイルスの増殖と病変形成の部位により“nakanuke”の強さに種々の程度が示された。即ち発育不良、斃死の例では胸腺、F 嚢の萎縮が特に顕著であった。

IV ウイルス学的同定

分離したウイルスが CEF と DEF で増殖する C 型粒子であるので、これに近縁なウイルスは七面鳥白血病ウイルス (Reticuloendotheliosis Virus group, REVs) と考え、その代表株である T 株を用いて分離ウイルスとの抗原的關係を調べた。

分離ウイルス、T 株および ALSV の代表株として Rous sarcoma Virus (RSV) を DEF と CEF に接種し、抗“nakanuke”agent と抗 REV-T 株血清による間接蛍光抗体法を行った結果、前二者の間では交叉反応が認められた。又、分離ウイルスと T 株をそれぞれの抗血清によって交叉中和した場合、完全に交叉中和が成立することも蛍光抗体法で測定された。

即ち、分離ウイルスが REVs に属することが確定された。

V REV-T 株との病原性の比較

REV-T 株はニワトリヒナ、アヒルヒナに対し、reticuloendotheliosis を起し、高率に腫瘍死させることが知られているが、著者は T 株を DEF で 1~2 代通過したところ、造腫瘍性を減弱、消失するとともに“nakanuke”を生ずることを見出した。このことは未だ報告されたことがなく、“nakanuke”は分離ウイルスのそれよりも稍々強い。

両者の“nakanuke”をそれぞれの抗血清によって阻止し得るかを試みたところ、交叉中和が成立し、いづれの血清によっても両者の“nakanuke”を阻止し得た。これに対し、抗 RSV 血清や正常血清では阻止が出来なかった。

DEF 通過により造腫瘍性を失なった T 株と“nakanuke”agent による接種ヒナの斃死例は reticuloendotheliosis を示さず、総て強い発育障害と貧血ならびに胸腺、F 嚢の萎縮などの免疫抑制的变化を生じた。

以上の結果から、著者が今回分離した“nakanuke”agent は REVs に属し、日本で最初に発見されたものであり、一方、REVs は米国に於ては既に七面鳥、アヒル、ニワトリから 6 株が分離され、reticuloendotheliosis を起すものとの記載はあるが“nakanuke”なる羽の異常は報告されておらず、著者が初め

て、その奇異な病変に対する本ウイルスの病原性を明らかにしたものである。上記、著者の新ウイルスC型 agent の病原性の報告に前後してわが国ではマレック病ワクチン接種による異常鶏の多発が問題となり、これが、本ウイルス、即ち REVs-によることが判明し著者の業績は学界に於て高く評価されるに至った。

著者は本ウイルスが、いかなる時点で HT-1 株に迷入したかを考察し、おそらく継代に使用した細胞、特に DEF を疑っている。

之を要するに本研究は著者が本邦に於て初めて七面鳥ヘルペスウイルス分離株に共存していたC型粒子を発見分離し、そのニワトリヒナに対する奇異な病原性、即ち、"nakanuke" を明らかにし、このC型粒子が REVs に属するウイルスであることを同定し、この病変は既知の REVs によって起ることも証明し、又わが国において、1974年春より秋にかけて発生したマレック病ワクチン接種による異常鶏の原因究明への道を拓いた。これらの事柄は学術上、極めて高く評価せられるべき業績であると共に鶏病予防上に貢献するところ甚大な発見であり、獣医学博士を授与するに充分値するものであることを認める。