

主 論 文 要 旨

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—

小 山 弘 之

主論文要旨

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

一 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 一

小 山 弘 之

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80 nm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継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"を引き起すこと、HT-1-(9)から調製した0.45 μ 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で用いたと同様の方法で"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1.16g/CCでアイ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80~100nmで表面に多数の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"をヒナに引き起した。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、或は一部に"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

分離“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) が最も近縁と考へ、REVsの代表株であるT株を用いて抗原的關係を調べた。

“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株血清による間接螢光抗体法を行った結果、“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螢光抗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株はやゝ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、腫瘍死することも無い。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或は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と同様の“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は野性の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発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の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し“nakanuke”を発症することを発見した。