

8. 鶏痘発症鶏におけるマレック病ウイルス及び 細網内皮症ウイルスの複合感染事例

○竹内 美穂 藤森 英雄

要 約

2017年10月下旬、小規模農場で飼育されていた150日齢の採卵鶏の皮膚に発痘が確認されたため、当所で病性鑑定を実施し鶏痘と診断した。当該鶏は自家孵卵で、すべてのワクチンが未接種であった。外貌所見では皮膚以外に異常はなく、神経症状等も確認されなかった。剖検所見では内臓諸臓器に肉眼的異常はなく、鶏痘を除いた病理所見では、肝臓、脾臓、筋胃、骨格筋、中枢神経組織にリンパ球様細胞の浸潤が確認された。遺伝子検査では、全身諸臓器よりマレック病ウイルス（MDV）及び細網内皮症ウイルス（REV）の遺伝子が検出された。検出されたMDVは、腫瘍原性をもつ血清型1の株であり、腫瘍化に関与する *meq* 遺伝子、*meq* の転写活性能を阻害する *L-meq*、病原性不明の *S-meq* が検出された。また、*meq* 遺伝子のアミノ酸配列解析より、強毒MDVに近い配列であることが確認された。一方、REVの *env* 領域における塩基配列解析では、強毒株のT株とは96.6%、その他の株とは約99%の相同性が認められた。また、鶏痘ウイルス（FPV）へのREVプロウイルス全長の挿入が確認され、FPVがREVの伝播に関与した可能性が示唆された。神経症状等がなかったことから、全身諸臓器の炎症はREVによる可能性が高いと推察したが、確定診断には至らなかった。当該農場はMDVワクチン未接種であったことから、感染していたMDV株の病原性によってはマレック病を発症する危険性も示唆された。

はじめに

マレック病（MD）は、マレック病ウイルス（MDV）を原因とする鶏、うずらが自然宿主の疾病であり、T細胞に持続感染し、T細胞（CD4+）の腫瘍を誘発する¹⁾²⁾。血清型は3種類あり、血清型1のみに病原性がある³⁾⁴⁾。

末梢神経が侵される古典型では、それぞれ侵される神経により翼麻痺（翼神経）、脚弱・脚麻痺（坐骨神経）、頭部下垂・斜頸（頸部迷走神経）が認められる。末梢神経に加えて内臓に腫瘍が形成される急性型では、沈うつ、削瘦、衰弱、脱水状態となり死亡するが、症状を全く示さず急死する場合もある。その他、羽包を中心に腫瘍が形成される皮膚型と、瞳孔の収縮と虹彩の変形を伴う眼型がある。本病はフケとともに排出されたウイルスが気道より感染す

ることで伝播する。感染しても発症しないことが多く、ウイルス検査は確定診断にはならないため、肉眼病変、組織病変から診断する。ワクチンは市販されており、卵内接種または孵化時に接種する¹⁾。

細網内皮症（RE）は、細網内皮症ウイルス（REV）を原因とする家きんの疾病である。REVには、急性腫瘍を起こし、癌遺伝子を持つ高致死率なT株が報告されている⁵⁾。T株以外のREV群ウイルスでは発育不全、脚弱、脚麻痺、慢性腫瘍などを示す⁶⁾。また、REVは鶏痘ウイルス（FPV）のORF領域にプロウイルスとして挿入されることも報告されており、FPVがREVの伝播に関与するといわれている⁷⁾。

MD及びREは、鶏白血病とともに類症鑑別が必要となる疾病だが、鶏痘（FP）発生鶏におい

て、MD と RE の鑑別が困難な事例に遭遇したので報告する。

発生状況と経緯

2017 年 10 月下旬、採卵鶏と肉用鶏を約 30 羽飼養する農場より、約 150 日齢の採卵鶏 21 羽のうち、11 羽の皮膚に発痘が確認されたとの連絡を受け、生体 3 羽について病性鑑定を実施した。当該農場は自家孵卵を行っており、ニューカッスル病ウイルスワクチンを年に一度投与していたが、症状が確認された群ではすべてのワクチンが未接種であった。当該鶏に脚弱、ふらつき等の神経症状はなく、外貌所見では顔周りの皮膚に発痘が確認された。剖検所見では、内臓諸臓器に肉眼的な異常は認められなかった。細菌学的検査でも有意菌の分離は認められなかった。ウイルス学的検査では、顔の皮膚乳剤を 10 日齢の発育鶏卵漿尿膜上に接種し、漿尿膜の腫脹とポックを確認した。また、漿尿膜乳剤の遺伝子検査より FPV 遺伝子が検出された。病理所見では、皮膚病変に有棘細胞の増生と風船様膨化、ボリンゲル小体が確認された。臨床症状やウイルス学的検査及び病理学的検査結果より、総合的に判断して FP と診断した。

一方、病理所見では、皮膚以外の内臓諸臓器に炎症像が認められ、MDV もしくは REV が関与している可能性が考えられたため、病理学的検査及びウイルス学的検査手法により病原検索検査を実施した。さらに、遡り調査についても実施した。

材料及び方法

材料：

- 1 病原検索検査：FP 発生時に病性鑑定を実施した生体 3 羽を検査に供した。
- 2 遡り調査：2003 年から 2017 年までに FP と診断された 4 事例、鳥ポックスウイルス (APV) 感染症と診断された 4 事例について、ウイルスが分離された臓器を検査に供した。

病理学的検査：

- 1 病原検索検査：病性鑑定に供した生体 3 羽を解剖した後、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳（以下、計 6 臓器を「主要臓器」とする。）、気管、F 嚢、膵臓について、定法に基づき病理組織学的検査を実施した。
- 2 遡り調査：実施せず。

ウイルス学的検査：

- 1 病原検索検査：病性鑑定に供した生体 3 羽の主要臓器、皮膚、気管の 10% 乳剤について、抽出キット (QIAamp MinElute Virus Spin Kit、(株)キアゲン、東京) により DNA 及び RNA を抽出した。

1) MDV:MDV については、*meq* 遺伝子⁸⁾ 及び BamH1-H 断片内にある 132bp の繰り返し配列⁹⁾ を検出する PCR (*TaKaRa Ex Taq*®、タカラバイオ (株)、滋賀県) を実施した。*meq* 遺伝子では、L-*meq*、*meq*、S-*meq* 付近で検出されたバンドの切り出しを行い、キットを用いて精製した後 (QIAquick Gel Extraction Kit、(株)キアゲン、東京)、DNA シークエンス解析を実施して塩基配列を決定した。さらに、複数の Primer を組み合わせて 54 から 339 番目のアミノ酸配列を決定した後、GenBank 登録株とアミノ酸配列解析により、Christine E らの方法を参考に病原性の比較を行った¹⁰⁾

2) REV:REV については、*env* 領域¹¹⁾ と 5' LTR 領域¹²⁾ の RT-PCR (QIAGEN One-Step RT-PCR Kit、(株)キアゲン、東京) を実施した。また、*env* 領域について、得られた増幅産物の塩基配列を決定した後、GenBank 登録株と比較した塩基配列解析及び近隣結合法による系統樹解析を行った。さらに、FPV への REV プロウイルス挿入を確認するため、FPV の ORF 領域の PCR を実施した¹²⁾ (KOD FX、東洋紡 (株)、大阪)。

- 2 遡り調査：過去に FP と診断された 4 事

例、FP 以外の APV 感染症と診断された 4 事例の臓器について、病原検索検査と同様に DNA 及び RNA を抽出し、MDV の *meq* 遺伝子及び BamH1-H 断片内の 132bp 繰り返し配列を検出する PCR を実施した。さらに REV の env 領域を検出する RT-PCR、FPV の ORF 領域を検出する PCR を実施した。

結果

病理学的検査では、肝臓にリンパ様細胞の浸潤が散見し、一部で偽好酸球も混在していた。その他、脾臓、筋胃、骨格筋等にもリンパ球様細胞の浸潤が認められる個体も確認され、脳や延髄では囲管性細胞浸潤が散見された(図1)。

個体 No.	肝臓のリンパ球様細胞の浸潤	他臓器のリンパ球様細胞の浸潤	脳の囲管性細胞浸潤
1	+	脾臓	++
2	++	筋胃	++
3	++	骨格筋、筋胃、脾臓	+

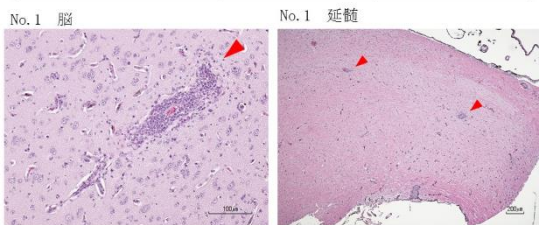


図1 全身性の非化膿性炎症 (HE染色)

ウイルス学的検査では、主要臓器、皮膚、気管を用いて、MDV の BamH1-H 断片内にある 132bp の繰り返し配列を検出する PCR を実施したところ、繰り返し回数が 2 回の場合に認められる、434bp 付近にバンドが認められた。また、MDV の *meq* 遺伝子を検出する PCR では、L-*meq*、*meq*、S-*meq* 付近に 3 つのバンドが検出された(図2)。

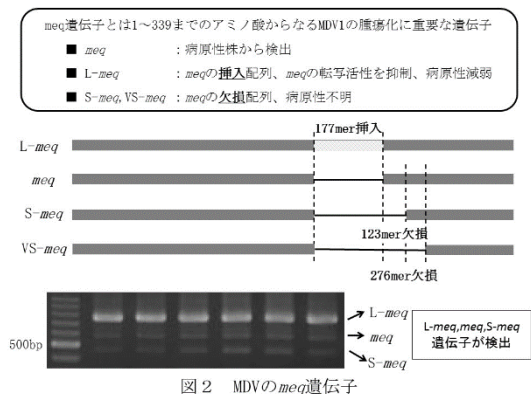


図2 MDVの*meq*遺伝子

それぞれの塩基配列を決定した結果、L-*meq* と

meq では 1 株ずつ、S-*meq* では 2 株の塩基配列が確認され、東京株とした。東京株と GenBank 登録株を比較した結果を表 1 に示す。

株	病原性	PPPP							アミノ酸			PPPP			アミノ酸
		配列数	71番目	77番目	180番目	153	178	L:240 M:181	L:278 M:217	L:298 M:237 S:198	アミノ酸				
L- <i>meq</i>	東京株	不明	7	S	E	T	P	P	P	P	P	P	C		
<i>meq</i>	CV1886 (ワタシ株)	v	7	S	E	T	P	P	P	P	P	P	C		
	東京株	不明	4	S	E	T	P	P	欠失	P	P	S			
	GA	v	5	A	K	T	P	P	P	P	P	C			
	567	v	4	A	E	T	P	P	P	P	A	C			
	571	v	4	A	E	T	P	H	P	P	P	C			
S- <i>meq</i>	Md5	vv	4	A	K	T	P	P	P	P	A	C			
	648A	vv+	2	A	K	A	Q	A	P	A	C				
	東京株	不明	3	S	E	T	P	P	P	欠失	S				
	東京株	不明	3	S	E	A	P	P	P	欠失	S				
	香川株	不明	2	A	E	A	P	A	P	欠失	C				

検出されたすべての東京株では、*meq* の 237 番目のアミノ酸がセリンであり、GenBank 登録株と一致するものはなかった。4つ並んだプロリンの繰り返し配列数(以下、「PRR」と言う。)では、東京株の L-*meq* では 7、*meq* では 4、S-*meq* では 3 つの配列数が確認された。さらに、71 番目のアミノ酸はセリン(S)、77 番目はグルタミン酸(E)であった。180 番目は、一方の S-*meq* だけがアラニン(A)であり、他方の s-*meq*、L-*meq*、*meq* はトレオニン(T)であった。

REV についても同様に、主要臓器、皮膚、気管から env 領域と 5' LTR 領域の遺伝子が検出された。また、env 領域の塩基配列解析では、T 株との相同性は 96.6%であった。他の登録株との比較では、相同性は 99%であり、系統樹解析で同一グループに分類された(図3)。さらに、FPV の ORF 領域の PCR では、約 8000bp 付近にバンドが認められた。MDV、REV の結果を表 2 に示す。

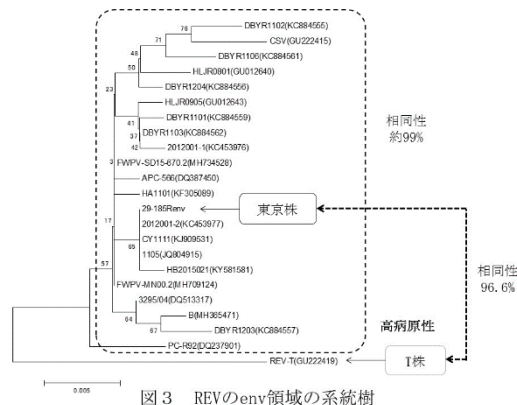


図3 REVのenv領域の系統樹

表2 MDV・REV・FPVの遺伝子検査結果

臓器No.	検体	MDV				REV		FPV(REV)
		BamH1-H	L-meq	meq	S-meq	env	5'LTR	ORFへの塩基挿入 (300bp)
1	肝臓	+	+	-	-	+	-	NT
	腎臓	+	+	+	+	+	-	NT
	脾臓	+	+	+	+	+	-	NT
	心臓	+	+	+	+	+	+	NT
	肺	+	+	+	+	+	+	NT
	脳	+	+	+	+	+	+	NT
	遠隔部皮膚	NT	NT	NT	NT	+	+	+
	左腿脚皮膚	NT	NT	NT	NT	+	+	+
	気管	NT	+	+	-	+	+	+
	腎臓	+	+	-	-	-	-	NT
2	肝臓	+	+	+	+	+	-	NT
	腎臓	+	+	+	+	+	-	NT
	脾臓	+	+	+	+	+	-	NT
	心臓	+	+	+	+	+	-	NT
	肺	+	+	+	+	+	-	NT
	脳	+	+	+	+	+	-	NT
	遠隔部皮膚	NT	+	+	+	-	+	+
	しょうろ脚 (気管)	NT	+	+	+	+	+	+
	肝臓	+	+	+	+	+	-	NT
	腎臓	+	+	+	+	+	-	NT
3	肝臓	+	+	+	+	+	-	NT
	腎臓	+	+	+	+	+	-	NT
	脾臓	+	+	+	+	+	-	NT
	心臓	+	+	+	+	+	-	NT
	肺	+	+	+	+	+	-	NT
	脳	+	+	+	+	+	-	NT
	羽根・眼瞼皮膚	NT	NT	NT	NT	+	+	+
	気管	NT	+	+	+	+	+	-

遡り調査では、FP と診断した全事例の臓器から REV の env 領域の遺伝子が検出された。一方、FP 以外の APV 感染症の事例では検出されなかった。また、2003 年の FP の事例を除き、すべての FP 事例で、FPV の ORF 領域の PCR で約 8000bp 付近にバンドが認められたが、APV 感染症では遺伝子は検出されなかった。

MDV については、本事例を除きすべての FP 及び APV 感染症で、BamH1-H 断片内の繰り返し遺伝子及び meq 遺伝子は検出されなかった(表 3)。

表3 FPV及びAPV感染農場における遡り調査

事例 No.	年度 (平成)	品種	検体	REV	FPV (REV)	MDV
				env	プロウイルス 全長	BamH1-H meq
FPV	1	29	採卵鶏	皮膚	+	+
	2	29	採卵鶏	気管スワブ	+	+
	3	26	採卵鶏	皮膚	+	+
	4	23	採卵鶏	皮膚	+	+
	5	15	採卵鶏	皮膚	+	-
	6	29	キジバト	皮膚	-	-
APV	7	25	ハト	皮膚	-	-
	8	19	ソデグロヅル	皮膚	-	-
	9	15	フラミンゴ	皮膚	-	-

事例No. 1は当該農場

考 察

meq 遺伝子及び BamH1-H 遺伝子が検出されたことから、本事例で検出された MDV は、血清型 1 の株であると決定した。また、BamH1-H 断片内にある 132bp の繰り返し配列を検出する PCR で、繰り返し回数 2 回の 434bp 付近にバンドが認められた。野外株では、繰り返し回数が 2 回もしくは 3 回認められるため、本事例の MDV も野外株である可能性が推察された⁹⁾。また、

meq 遺伝子を検出する PCR では、L-meq、meq、S-meq が同時に検出された珍しい事例となった。meq 遺伝子の塩基配列解析では、東京株にのみ確認された変異もあったが、PRR が多く認められ、71 番目、77 番目、180 番目のアミノ酸が、病原性があまり高くない強毒株 (v) と同一だった¹⁰⁾。弱毒化した株で L-meq、meq、S-meq が同時に検出される報告があることから、本事例で検出された株の病原性も低い可能性が推察された¹³⁾。

また、REV の env 領域の比較で、都で検出された REV は、T 株よりも T 株以外の REV 群と相性が近いことから、病原性についても T 株以外の REV 群と近い可能性が示唆された。一方、正確な相性比較には、より多くの塩基配列解析を実施する必要があると考えられる。また、FPV に REV のプロウイルス全長が挿入されていたことから、FPV 感染により REV が伝播した可能性が推察される。そのほか、都内の多くの FP 発生事例でも、REV の伝播に FPV 感染が関与していた可能性が考えられるが、FP 以外の APV 感染症で REV が検出されなかったことから、APV への挿入も起こらない可能性が高いと考えられる。

本事例で検出された MDV の病原性は低い可能性が高く、末梢神経に病変がなかったことから、全身性の非化膿性炎症の原因は REV である可能性が示唆されたが、確定にはさらなる検証が必要と思われた。当該農場は MD ワクチンが未接種であったため、より病原性の高い MDV が感染していた場合、発症していた可能性も考えられる。農場では、150 日齢まですべてのワクチンが未接種であったことから、飼養衛生管理指導及びワクチン接種指導を実施した。本事例を含め、都では小規模飼養農家での鶏痘やマレック病の発生が多く、ワクチン接種率も低いことから、広報等を活用した接種指導を実施していく必要があると思われた。

引用文献

- 1) 小沼 操ら：動物の感染症, 第二版, 近代出版, 東京 (2006)
- 2) Calnek, B. W. et al. Marek's disease. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid, H. W. Yoder Jr. (Eds.), Diseases of Poultry (9th ed.), Iowa State University Press, Ames, IA (1991), pp. 342-385
- 3) Chantanee Buranathai et al. Transformation of Primary Chick Embryo Fibroblasts by Marek's Disease Virus. *Virology* 239:20-35
- 4) ZHENG QIAN et al. Transactivation Activity of Meq, a Marek's Disease Herpesvirus bZIP Protein Persistently Expressed in Latently Infected Transformed T Cells
- 5) Robinson et al. Isolation of the avian reticuloendothelial virus (strain T) *Avian Dis* 278-288 (1974)
- 6) Fadly et al. Reticuloendotheliosis, pp 568-588, In: Diseases of Poultry, 12th ed (Saif Y M et al eds), Blackwell Publ, Ames, Iowa (2008)
- 7) 竹馬工ら：採卵養鶏場に発生した皮膚型鶏痘とワクモからの鶏痘ウイルスの検出, 鶏病研報 44, 113-117 (2008)
- 8) Chan et al. The detection of the meq gene in chicken infected with Marek's disease virus serotype I. *J. Vet Med Sci* 64, 413-417 (2002)
- 9) Irit Davidson et al. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathology* (1995) 24, 69-94
- 10) s. Shamblin et al. Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Veterinary Microbiology* 102 (2004) 147-167
- 11) Singh, P, Sc hnitzlein, W M and Tripathy, D N :Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability_よ *Virol.* 77, 5855-5862 (2003)
- 12) Pratik Singh et al. Reticuloendotheliosis Virus Sequences within the Genomes of Field Strains of Fowlpox Virus Display Variability. *JOURNAL OF VIROLOGY*, May 2003, p. 5855-5862
- 13) Kyung-Soo CHANG et al. Diversity (Polymorphism) of the meq Gene in the Attenuated Marek's Disease Virus (MDV) Serotype 1 and MDV-Transformed Cell Lines. *J. Vet. Med. Sci.* 64(12): 1097-1101, 2002