

総説

マレック病ウイルスと鶏貧血ウイルスの混合感染鶏における病理学的および免疫組織化学的研究

モヘイ・ハリデイ^{1,2)} 御領政信²⁾ 佐々木 淳²⁾ 岡田幸助²⁾

要約

鶏貧血ウイルス (CAV) は、マレック病 (MD) においてその病態を悪化させる最も重要な病原体である。初生ヒナに強毒MDウイルス (MDV) (vMDV, KS株) または超強毒MDV (vvMDV, Md/5株) を接種し、4週齢時にCAVを混合感染させた影響を、病理学的および免疫組織化学的に検索した。CAVは、vMDVまたはvvMDV群における致死率を増加させ、ヘマトクリット値は、vMDV-CAV群において有意に減少したが、vMDV群では有意な減少は認められなかった。骨髓低形成はCAV混合感染と関連していたが、vMDVまたはvvMDV群では低形成はみられなかった。胸腺およびファブリキウス (F) 囊の重度萎縮が、vvMDV-CAVおよびvvMDV群で認められた。vMDV群では胸腺皮質とF囊における完全な再生が認められたが、対照的にvMDV-CAV群ではCAV接種後にリンパ球の連続的な減少がみられた。脾臓では、再生、リンパ球減少またはリンパ増殖性病変のいずれかがみられた。脾臓におけるリンパ球減少は、vMDV群では認められなかったが、vMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群ではCAV接種後の最初の2週間において顕著であった。実験期間において、CAV封入体およびCAV抗原がvMDV-CAVとvvMDV-CAV群の胸腺皮質と脾臓で検出された。脾臓と胸腺では、CD8陽性T細胞の重度の減少が認められた。脾臓の小動脈および小静脈周囲における腫瘍性結節は、主にCD4抗体に陽性を示したが、CD8陽性T細胞は個々に散在するか、集塊を形成していた。MDVとCAVの混合感染において、CAVは骨髓低形成、重度貧血およびリンパ系器官における再生障害の原因であると結論づけられるだろう。

キーワード：鶏，鶏貧血ウイルス，混合感染，マレック病ウイルス

マレック病 (MD) は、 α ヘルペスウイルス亜科に属する血清型1の腫瘍原性マレック病ウイルス (MDV) によるリンパ増殖性疾患であ

る。MDVでは他に、野外では非腫瘍原性株 (血清型2) と七面鳥ヘルペスウイルス (血清型3) の二つがある [39]。腫瘍原性MDV感染

¹⁾ 岐阜大学大学院連合獣医学研究科病態獣医学連合講座

²⁾ 岩大支会 岩手大学農学部獣医学課程獣医病理学研究室

症は、早期細胞溶解期（感染後2から7日）、潜伏期（感染後7から10日以降）、持続的免疫抑制および後期細胞溶解期（感染後18日以降）および腫瘍形成を伴うTリンパ球の増殖ならびにトランスフォーメーション期（3から4週以降）を引き起こす [7].

鶏貧血ウイルス（CAV）感染は、鶏における貧血、リンパ球減少、出血および免疫抑制の原因であり、3週齢までの移行抗体を持たないヒナに感染する [34]. 鶏産業界では、3週齢以降のヒナに感染しても有害な影響はほとんどないと考えられているが、多くのMDの発症にはCAVの混合感染が関連している. 全ての鶏群にMDVワクチンを接種していたにもかかわらず、日本、アメリカ、オランダ、イタリア、ドイツ、イスラエルなどで発生した重度のMD発生例からCAVが分離されている [12-14, 25, 47]. さらに、オーストラリアおよびEUの8カ国では、11/49件および11/15件で、MD発生事例においてCAVが分離された [24, 35].

孵化後2週までのヒナにおけるMDVおよびCAVの混合感染は、早期致死症候群（EMS）を引き起こす [16, 25, 44, 47]. EMSは、体重減少、ファブリキウス（F）囊と胸腺の萎縮、MDリンパ腫や神経の腫大がみられない死亡などが特徴である [5, 40]. 同じ状況が、超強毒MDV（vvMDV, vvプラスMDV）株で引き起こされる [5, 40]. 2週齢までのvvMDVとMDV-CAV混合感染におけるEMSでは、病理組織学的な相違は認められない.

MDの経過における血液と骨髄の変化に関する研究では、いくつかの矛盾した結果が示されている. MDVのConn-A分離株では、ヘマトクリット値（PCV）の16%に至る減少と骨髄低形成が接種後2から3週でそれぞれ認められたが [21, 41], CAVによる汚染が数年後に示された [35]. Purchase & Biggs [30] は、MDV感染鶏の骨髄において肉眼的な病変を認めなかったが、Glika & Spencer [15] はMDVのAC-1ま

たはRB-1B株を接種した初生ヒナにおける、骨髄低形成を伴わない髄外性溶血性貧血について記述している. Payne [26] は、移行抗体を持たないヒナでは、MDVは5日後に骨髄に感染し、骨髄無形成と重度の貧血を引き起こすと述べている. PCVと骨髄病変におけるMDVおよびCAV混合感染の影響については、さらに解明する必要がある.

MDVは感受性のある鶏に対して、早期および後期（二次細胞溶解期）において二相性の細胞溶解性感染を示す. 二次細胞溶解期は、感染後2から3週後に始まり、腎臓、副腎、前胃、食道およびその他、胸腺やF囊におけるリンパ球と同じく、羽包上皮における限局性の上皮細胞壊死に特徴づけられる. MDV病原型と鶏の遺伝的特性に依存し、持続性免疫抑制および後期細胞溶解期は出現したりしなかったりする [6]. F囊摘出やシクロホスファミド（cy）処置によってMD抵抗性が上昇するが [36], 放射線照射またはcy処理によるさらなるT細胞の減少を伴う胸腺摘出では感受性が高まる [8]. MDVの病理発生の様々なステージにおけるT細胞減少の影響は研究されたことがない. MDVの二次細胞溶解期におけるCAVの混合感染に関する研究は、非常に重要である.

MDV-CAV混合感染の野外例のほとんどは4週齢以降のものであるが [12, 46], 最近のすべての研究は、初生ヒナを用いて行われている. 本研究の目的は、初生時にMDV（vMDV）またはvvMDVを接種し、4週齢時にCAVを混合感染させ、PCV、骨髄病変およびリンパ系器官への影響を病理学的に検索することである.

材料および方法

鶏：すべての鶏と有精卵は、ホワイトレグホンP2系SPF鶏に由来し、アデノウイルス、伝染性気管支炎ウイルス、CAV、IBDV、MDV、ニューカッスルウイルス、レオウイルスおよびJ亜群トリ白血病ウイルスなどの抗体は陰性で

あり，当研究室にて孵化させたものである．ヒナは無菌室内において小型の箱に隔離し，自由給水・給餌とした．

CAV：CAVは，感染鶏から分離後，MDCC-MSB1細胞にて10回継代したMSB1-TK5803株を用いた [17]．

MDV：vMDVのKS株 [32] およびvvMDVのMd/5株 [40] を，2から3回SPFヒナで継代した．

MDVを接種したそれぞれのヒナからヘパリン加血液サンプルを採取し，リンパ球を分離した．収集したリンパ球はジメチルスルホキシドを加え-80℃で凍結し，その後，-196℃の液体窒素にて使用時まで保存した．実験直前に，保存していたリンパ球液0.2ml (0.5×10⁶ cells) を鶏胚線維芽細胞に接種した．ウイルス価は Villegas and Purchase [42] に従い算出した．

実験設定：205羽の初生ヒナを，対照群，CAV

群，vMDV群，vMDV-CAV群，vvMDV群およびvvMDV-CAV群の6群に設定した．vvMDV-CAV群は死亡率が高かったため，30羽の初生ヒナを追加した．7群は表1の通りに接種し，サンプルを収集した．すべてのウイルスは，筋肉内接種した．接種量は，MDV株は3,000PFU/0.1ml，CAVのMSB1-TK-5803株は，10^{7.5}/0.1mlに調整して用いた．すべての鶏は，人道的に安楽殺された．

ヘマトクリット値：採血前にヒナに番号を付け，翼静脈からヘパリン化ヘマトクリット毛細管へ安楽殺直前に採血した．PCVは，12,000×gで5分間遠心分離を行った後に測定した．ヒナは貧血と骨髓病変の関連を組織学的に検索するために用い (表1)，さらにvMDV群における7および8週齢では，残存したそれぞれ4および5例のヒナより採血を行った (表3)．

組織病理学的検査：すべての鶏から胸腺，F囊，

表1 実験設定

群	初生時 接種ウイルス株	初生時ヒナ数	4週齢時 接種ウイルス株	4週齢時ヒナ数	採材鶏数 ^a
未接種対照	—	33	—	30	5
CAV	—	32	MSB1-TK5803	30	5
vMDV	KS株MDV	50	—	37	5
vMDV-CAV	KS株MDV	25	MSB1-TK5803	18	5
vvMDV	Md/5	65	—	19	5
vvMDV-CAV	Md/5	—	MSB1-TK5803	20	5
vvMDV-CAV ^b	Md/5	30	MSB1-TK5803	—	8

^a採材は5，6，7および8週齢時にそれぞれ行った．

^b他の群 (30例) にMd/5株を初生時に接種し，8羽のみが4週齢時に生残した．

表2 実験群におけるCAV接種後の経時的死亡率

群	日 齢				致死率	平均 死亡日齢 ^a
	5週	6週	7週	8週		
対照	5 (0) ^b	5 (0)	5 (0)	5 (0)	死亡なし	56 (実験終了時)
CAV	5 (0)	5 (0)	3 (0)	5 (0)	死亡なし	56 (実験終了時)
vMDV	5 (2)	5 (3)	5 (2)	5 (1)	21.6% (8/37) ^c	41.5
vMDV-CAV	3 (3)	3 (1)	3 (3)	2 (0)	38.9% (7/18)	39.2
vvMDV	5 (5)	4 (5)	—	—	52.6% (10/19)	32
vvMDV-CAV	5(3), 1(7) ^d	4 (8), —	—, —	—, —	64.3% (18/28)	30

^a 死亡ヒナの合計日齢を死亡ヒナ数で割った．

^b 殺処分ヒナ数 (死亡ヒナ数)

^c 死亡率 (死亡ヒナ数/実験ヒナ数)

^d 他の群 (30例) にMd/5株を初生時に接種し，8羽のみが4週齢時に生残した．

脾臓、皮膚および坐骨神経を採材、組織学的検索のため10%ホルマリン液で固定した(表1)。大腿骨は、骨髄を検索するために長軸方向で切断した。固定後、大腿骨は5%蟻酸にて2週間脱灰を行った。サンプルは脱水後、常法に従いパラフィン包埋し、4 μ mに薄切、ヘマトキシリン・エオジン(HE)にて染色した。

免疫組織化学的検査: vvMDV, vvMDV-CAV, vMDV, vMDV-CAVおよび対照群の胸腺および脾臓は、OCTコンパウンドを用いて液体窒素中で凍結包埋し、クライオスタットにて8 μ mに薄切した。切片は4 $^{\circ}$ Cにてアセトンで10分間固定し、風乾を90分間行った。

(1) **抗体:** MSB1-TK-5803株を $10^{7.5}$ 平均組織培養感染量/0.1ml含むMDCC-MSB 1培養上清を初生ヒナに筋肉内接種し、CAVに対する血清中の抗体価を上昇させた。接種したヒナに同様のサンプルを40日後に追加投与し、5日後に採血した。血清は-20 $^{\circ}$ Cで保存した。CD 4お

よびCD 8モノクローナル抗体(Southern Biotechnology Associates Inc., バーミングム, アラバマ, アメリカ)をCD 4およびCD 8 α との相同性を確認するためにそれぞれ用いた。

(2) **免疫組織化学:** アセトン固定を施した切片を、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するため、0.03% H_2O_2 中性緩衝液で室温にて10分間処理した。スライドは、PBSにて5分間、3回洗浄した。モノクローナル抗体は、DAKO REALTM抗体希釈液(S2022, DAKO, 東京)を用いて最適な希釈倍率に希釈した。CAV抗原検出のため、免疫ペルオキシダーゼ染色によるアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ(ABC)法を実施した[38]。CD 4およびCD 8 T細胞の染色のため、DAKO LSABTM+キットユニバーサル(K0679, DAKO, 東京)をマニュアル通りに用いた。病変部におけるCAV検出のための免疫組織化学的ラベルには、市販のキット(Vector Lab., イギリス)を用いた。CAV

表3 実験群におけるPCV値および貧血ヒナの状況

群	PCV値評価	日 齢				貧血発症率 (貧血ヒナ数/実験数)
		5週	6週	7週	8週	
対照	平均PCV値	32.6 \pm 2.30 ^a	30.2 \pm 2.86	30.2 \pm 1.48	30.2 \pm 1.48	0 (0/15)
	PCV値範囲	30-35	27-34	28-32	28-32	
	貧血羽数/実験羽数 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	
CAV	平均PCV値	35.4 \pm 2.30	33.8 \pm 3.70	30.3 \pm 4.50	31.6 \pm 2.07	0 (0/18)
	PCV値範囲	32-38	29-38	26-35	30-35	
	貧血羽数/実験羽数	0/5	0/5	0/3	0/5	
vMDV	平均PCV値	30.4 \pm 2.1	29.8 \pm 0.8	27.88 \pm 2.30	25.8 \pm 9.03	20.7% (6/29)
	PCV値範囲	27-33	29-31	22-35	14-33	
	貧血羽数/実験羽数	0/5	0/5	2/9 ^B	4/10 ^c	
vMDV-CAV	平均PCV値	31.0 \pm 1.00	28.0 \pm 2.64	16.6 \pm 3.78 ^{*A}	ND	44.4% (4/9)
	PCV値範囲	30-32	25-30	12 to 21	ND	
	貧血羽数/実験羽数	0/3	1/3	3/3 ^b	ND	
vvMDV	平均PCV値	24.0 \pm 2.64 [*]	26.75 \pm 2.21	-	-	42.9% (3/7)
	PCV値範囲	21-26	25-30	-	-	
	貧血羽数/実験羽数	2/3	1/4	-	-	
vvMDV-CAV	平均PCV値	26.3 \pm 4.93 [*]	31.0 \pm 5.59	-	-	42.9% (3/7)
	PCV値範囲	23-32	23-36	-	-	
	貧血羽数/実験羽数	2/3	1/4	-	-	

^a 平均PCV値 \pm 標準偏差。

^b HCT値が25%以下の羽数/実験羽数。

^c 5羽のみを病理組織学的に検索し、それらのPCV値は骨髄病変と関連していた。

^{*} 有意水準0.05における対照と比較した平均有意差。

^A 平均PCV値は有意水準0.05においてvMDV群と比較すると有意に低い。

^B フィッシャーの正確確率検定における有意差 ($p < 0.05$)。

抗血清（1：100）を、湿潤チャンバー内で4℃で一晩反応させた。ブロック試薬（正常ヤギ血清）、二次抗体（ビオチン化ヤギ抗ニワトリIgG抗体）およびビオチン標識化HRP巨大分子複合体がキット内に含まれていた。ペルオキシダーゼ活性は、3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩水和物（DAB, Sigma Chemicals Co., セントルイス, アメリカ）およびH₂O₂により発現させた。切片は、ヘマトキシリンにて対比染色した。

統計解析：有意差検定はCAV, vMDV, vMDV-CAV, vvMDVおよびvvMDV-CAV群と対照群との間およびMDV群とMDV-CAV群との間で比較した。所見は、平均値±標準偏差によって表現した。統計的解析は、一元配置分散分析を用いて行われた。平均差は、 $p < 0.05$ で有意差があるとした。解析は、Statistical Package for the Social Sciences for Windows (SPSS, version 15.0, シカゴ, アメリカ)を用いて行われた。MDV群とMDV-CAV群における病変の頻度の比較にフィッシャーの正確確率検定 (Frequency procedure; SAS, version 8.02)を用いた。 $P > 0.05$ は有意ではないと考えたが、 $P < 0.05$ は有意、 $P < 0.01$ は非常に有意、 $P < 0.001$ はかなり有意であると考えた。

結 果

死亡率：対照群とCAV群では、実験鶏の死亡は認められなかった（表2）。vvMDVおよびvvMDV-CAV群のCAV接種後2週以内における死亡率は、それぞれ52.6%（10/19）と64.3%（18/28）であった。vMDVおよびvMDV-CAV群のCAV接種後4週以内における死亡率は、それぞれ21.6%（8/37）と38.9%（7/18）であった。CAV接種後の平均死亡日数は、vMDV, vMDV-CAV, vvMDVおよびvvMDV-CAV群においてそれぞれ41.5, 39.2, 32および30日であった。CAVはvMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群において死亡羽数を増加させ、平

均死亡日数を減少させたが、致死率の増加および平均死亡日数に有意差は認められなかった。

肉眼所見：CAV群では、対照群と比較して軽度の発育不良が認められた。CAV群では、臨床症状や肉眼病変はみられなかった。vvMDVおよびvvMDV-CAV群のヒナは、発育不良を示した。肉眼的に、リンパ腫様病変が心臓、腎臓および脾臓などの内臓において小さな白色結節として認められた。vMDV-CAV群では、発育不良、羽・脚麻痺および腎臓、肝臓と性腺において腫瘍がみられた。しかしながら、vMDV群では、ほとんどの鶏がわずかな臨床症状を示し、vMDV-CAV群と比較して良好な発育を示した。vMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群の数羽では、羽の皮下、大腿部および胸部皮下において暗赤色出血巣が認められた（図1a）。

PCV値：PCV値の範囲、平均値および全群における貧血を示す鶏の状況は、表3に示してある。対照群とCAV群におけるPCV値の範囲は27～38%で、CAV群では平均PCV値の減少はみられなかった。vvMDVおよびvvMDV-CAVの両群では、5週齢時においてPCV値の有意な減少が認められたが、6週齢時では有意差はなかった。vMDV-CAV群およびvvMDV-CAV群の間では、有意差は認められなかった。vMDV群では、実験期間中に有意なPCV値の減少はみられなかったが、vMDV-CAV群の7週齢時に有意な減少が認められた。vMDV群の平均PCV値は、vMDV-CAV群の7週齢時よりも高かった。PCV値が25%以下であれば、貧血鶏と判断した [31]。

vMDVとvvMDV群における貧血鶏のPCV値は21～25%であるが、vMDV群の2例は8週齢時にそれぞれ15%と17%を示した。vMDVとvvMDV-CAV群における貧血鶏のPCV値は、12～25%であった。対照群とCAV群では貧血鶏はみられなかった。vMDVおよびvMDV-CAV群では、6/29（20.7%）、4/9（44.4%）の鶏でそれぞれ貧血が認められた。しかしながら、

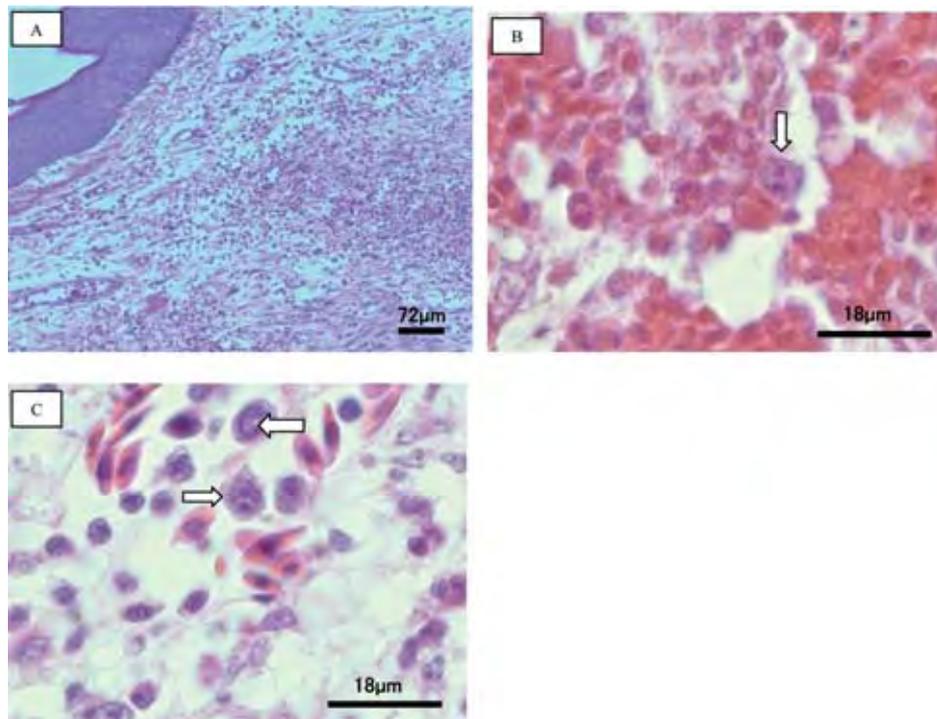


図 1

A : 46日齢の死亡鶏。大腿部皮下出血および水腫。(vMDV-CAV群), HE.
 B : 6週齢鶏の赤色骨髓。造血幹細胞におけるCAV核内封入体(矢印)。(vMDV-CAV群), HE.
 C : 7週齢鶏の骨髓低形成。造血幹細胞におけるCAV核内封入体(矢印)。(vMDV-CAV群), HE.

vvMDVおよびvvMDV-CAV群の両群では、それぞれ3/7(42.8%)が貧血であった。

病理組織学的変化

1 骨髓：すべての群における骨髓の病理組織像は下記に従って分類し、表4に示した。

(a) 脂肪髄：骨髓はわずかな造血領域を伴った脂肪であった。造血領域は、髓洞内にお

ける分化した赤血球と髓洞外における分化した顆粒球により構成されていた。脂肪髄は対照群およびCAV群の全例で認められた。

(b) 造血(赤色)骨髓：骨髓はわずかな脂肪組織と豊富な分化した赤血球と顆粒球によって構成されていた。リンパ腫はみられなかった。貧血のボーダーライン上であっ

表 4 実験群におけるCAV接種後の経時的死亡率

群	脂肪髄	赤色髄 (29~33%)	限局性/び慢性リンパ球増殖性 病変を伴う造血性骨髓		低形成 (12~17%)	低形成と過形成の両方 あるいはいずれか一方を 伴ったリンパ増殖性病変 (20~24%)
			非貧血 (26~34%)	貧血 (22~25%)		
対照	20/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
CAV	20/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
vMDV	0/20	7/20	9/20	4/20 ^a	0/20 ^A	0/20 ^B
vMDV-CAV	0/11	4/11 ^{b,c}	3/11	0/11	2/11 ^A	2/11 ^{b,B}
vvMDV	0/7	3/7	1/7	3/7	0/7	0/7
vvMDV-CAV	0/9	4/9 ^b	1/9	2/9	1/9 ^b	1/9

^a 2羽はPCV値が15%と17%.

^b 1羽ではPCV値が未検査.

^c 1羽では貧血の境界(25%).

^{A,B} フィッシャーの正確確率検定における有意差(p<0.05).

たvMDV-CAV群の1例を除き、罹患鶏(n=18)は非貧血であった。

(c) 軽度の多発性リンパ増殖性病変から重度のリンパ腫に至る造血骨髄における限局性またはび慢性リンパ球増殖：造血細胞の減少は、リンパ増殖性病変の程度と相関していた。骨髄はリンパ増殖性病変のため高い細胞性、または造血性を示していた。これらはMDVおよびMDV-CAV群で認められた。

(d) 骨髄低形成：造血芽球細胞は重度に減少し、いくつかの腫大した細胞がみられた。髄洞内、髄洞外における赤血球系、顆粒球系細胞の重度の減少はそれぞれ顕著であった。髄洞内には分化した赤血球がわずかにあるか、ほとんど細胞は認められなかった。無定形血漿様成分とわずかな線維細胞が骨髄組織を置換していた。低形成では、髄洞内と髄洞外において赤血球系造血および顆粒球系細胞活性がそれぞれ続発してみられた(過形成結節)。低形成性骨髄は、vMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群における3例で認められた。

(e) 低形成と過形成、またはいずれか一方と関連したリンパ増殖性病変：骨髄は細胞減少を示し、ほとんどの組織はいくつかのリンパ増殖性病変の結節を伴った骨髄低形成を呈していた。髄洞内における未分化の大型赤芽球系、髄洞外における顆粒球系細胞による過形成結節は、低形成性骨髄に散在し、8週齢時に最も強く認められた(回復期鶏)。vMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群における貧血鶏の3例がこれに分類された。

対照群およびCAV群では、骨髄は脂肪髄であった。CAV群の骨髄では、病変やCAV封入体は認められなかった。MDVおよびMDV-CAV群における骨髄病変は、造血、低形成、過形成およびリンパ腫などであった。1例あたり、

一つまたは複数のそれらの病変を有していた。vMDVおよびvvMDV群のすべてで、造血骨髄とリンパ増殖性病変がみられたが、低形成あるいは過形成ではなかった。vMDV群では7から8週齢の4例で、造血が抑制された顕著な骨髄におけるリンパ腫が認められた。それらの4例のみが貧血であった(表4)。vvMDV群では、3例の貧血鶏で骨髄におけるリンパ腫がみられた。vMDV-CAV群では、5から6週齢時の造血骨髄(図1b)に始まり、7週齢時の低形成(図1c)に続き、7から8週齢時の再生性過形成がそれぞれ認められた(表5)。vvMDV-CAV群では、貧血鶏は造血骨髄を有し(2例)、限局性リンパ増殖性病変を伴った低形成が1例でみられた。表5には、両群の実験期間中における骨髄病変の概略を示した。特徴的な好酸性核内封入体は、vMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群の造血組織および低形成骨髄における造血細胞でしばしば認められた(図1b, c)。

骨髄の病理組織学的病変は、PCV値および罹患鶏の臨床症状と関連していた(表4)。対照群およびCAV群のすべては、PCV値が27から38%を示す脂肪髄であった。造血骨髄は、MDVおよびMDV-CAV群のPCV値が29から33%を示す非貧血鶏で認められた。MDVおよびMDV-CAV群では、限局性またはび慢性のリンパ増殖性病変を伴った造血骨髄がみられた。罹患鶏は広範囲のPCV値を示し、骨髄におけるリンパ増殖性病変の程度に従って臨床的变化がみられた。14/23例では非貧血(26~34%)、7/23例では貧血(22~25%)および2/23例では重度の貧血(15および17%)を示した。骨髄の低形成は、vMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群でのみ認められた。罹患鶏は、PCV値が12から17%の重度の貧血を呈していた。低形成および過形成、またはいずれか一方と関連したリンパ増殖性病変が、vMDV-CAVとvvMDV-CAV群で認められた。罹患鶏は、PCV値が20から24

表5 実験群における骨髓、胸腺、F囊および脾臓の病理組織学的所見

組織	病変	vMDV				vMDV-CAV				vvMDV		vvMDV-CAV	
		5W ^a	6W	7W	8W	5W	6W	7W	8W	5W	6W	5W	6W
骨髓	造血骨髓	5/5 ^b	5/5	3/5	3/5	3/3 [●]	3/3 [●]	0/3	2/2	3/3	4/4	5/5 [●]	3/4 [●]
	低形成	0/5	0/5	0/5	0/5	0/3	0/3	1/3 [●]	0/2	0/3	0/4	0/5	1/4 [●]
	過形成	0/5	0/5	0/5 ^a	0/5	0/3	0/3	3/3 ^a	1/2	0/3	0/4	0/5	0/4
	リンパ腫	2/5	3/5	4/5	4/5	1/3	1/3	1/3	2/2	2/3	2/4	3/5	1/4
胸腺	変性性変化 ^c	0/5 ^B	0/5 ^C	0/5 ^D	0/5	3/3 ^B	3/3 ^C	3/3 ^D	1/2	4/4	4/4	3/3	3/3
	髄質におけるリンパ球増殖性病変	0/5	0/5	2/5	2/5	0/3	0/3	0/3	1/2	0/4	0/4	0/3	0/3
	胸腺皮質における再増殖	5/5 ^E	5/5 ^F	5/5 ^G	5/5	0/3 ^E	0/3 ^F	0/3 ^G	1/2	2/4 ^d	1/4 ^d	1/3 ^d	0/3
F囊	変性性変化 ^c	0/5 ^H	0/5 ^I	2/5 ^e	0/5	3/3 ^H	3/3 ^I	3/3	2/2	4/4	4/4	3/3	3/3
	間質におけるリンパ球増殖性病変	0/5	0/5	1/5	3/5	0/3	0/3	0/3	1/2	2/4	1/4	2/3	1/3
	リンパ濾胞の再増殖	5/5 ^J	5/5 ^K	3/5	3/5	0/3 ^J	0/3 ^K	0/3	1/2	0/4	0/4	0/3	0/3
脾臓	変性性病変 ^c	0/5 ^L	0/5	0/5	0/5	3/3 ^L	1/3	1/3	0/2	1/5	1/4	2/5	3/4
	リンパ球増殖性病変	1/5	2/5	4/5	3/5	0/3	2/3	3/3	1/2	3/5	3/4	4/5	2/4
	脾臓の再生	5/5 ^M	4/5 ^N	1/5	2/5	0/3 ^M	0/3 ^N	0/3	1/2	1/5	1/4	0/5	0/4

^a 鶏の週齢.

^b 罹患鶏数/実験羽数.

^c 胸腺皮質, F囊の濾胞および脾臓におけるリンパ組織減少および壊死.

^d 胸腺皮質の軽度再増殖.

^e 生理的組織変性を伴ったF囊の濾胞における再生.

^f 白脾髄の小動脈および小静脈周囲におけるリンパ組織増殖性病変. 重度の症例ではエリプソイド周囲まで進展していた.

● CAV封入体が認められた.

^{A to M} フィッシャーの正確確率検定における有意差 ($p < 0.01$).

^N フィッシャーの正確確率検定における有意差 ($p < 0.05$).

%の貧血を示していた. 低形成および過形成, またはいずれか一方を伴う骨髓低形成とリンパ増殖性病変は, vMDV群よりもvMDV-CAV群で有意 ($p < 0.05$) にみられた.

2 胸腺: vvMDVおよびvvMDV-CAV群では, 胸腺は重度に萎縮していた. 皮質における重度のリンパ球減少によって, 変性した髄質周囲における崩壊した間質が残存していた. 皮質の構造は, 血管と細網上皮細胞以外は消失していた. 変性したリンパ様細胞, 上皮性細胞と筋様細胞, ハッサル小体などが髄質で認められた. 胸腺の小葉全体は, 変性および壊死したリンパ組織の集合としてみられた (図2a). 数羽の鶏では, 胸腺の小葉が一つあるいは複数消失していた (1/9 vvMDV群, 3/9 vvMDV-CAV群). vvMDV群では, 3/9例において皮質の軽度の再増殖がみられた.

vMDV群では, すべての鶏は胸腺の完全な再生を示していた (図2e). 胸腺皮質は, 好塩基性の小型リンパ球の再増殖によって充

満していた. ほとんどの鶏の皮質はリンパ球によって厚くなっていた (18/20) ($p < 0.001$). リンパ球浸潤による髄質の重度な過形成が2/20例でみられ, 皮質では中等度の再増殖を示していた. 他の2/20例では, 一つまたは複数の小葉におけるリンパ腫がみられた.

vMDV-CAV群では, 再増殖性胸腺皮質において連続的なリンパ組織減少が認められた. CAV接種1週目では, 皮質に軽度のリンパ球消失がみられ, 星空像が認められた. リンパ芽球のほとんどは腫大し, CAV封入体を有していた (図2c). CAV接種2週目では, 皮質の菲薄化を伴ったリンパ組織減少が重度化していた. 接種後3および4週では, 皮質は完全に減少し, 取り残された胸腺皮質ではわずかな細胞退廃物と上皮性細胞の過形成がみられた (図2f). 一方, CAV接種後4週目の1例では, 胸腺皮質において完全な再増殖がみられた ($p < 0.001$). CAV接種後1, 2, 3週におけるほとんどの鶏の皮質外層で

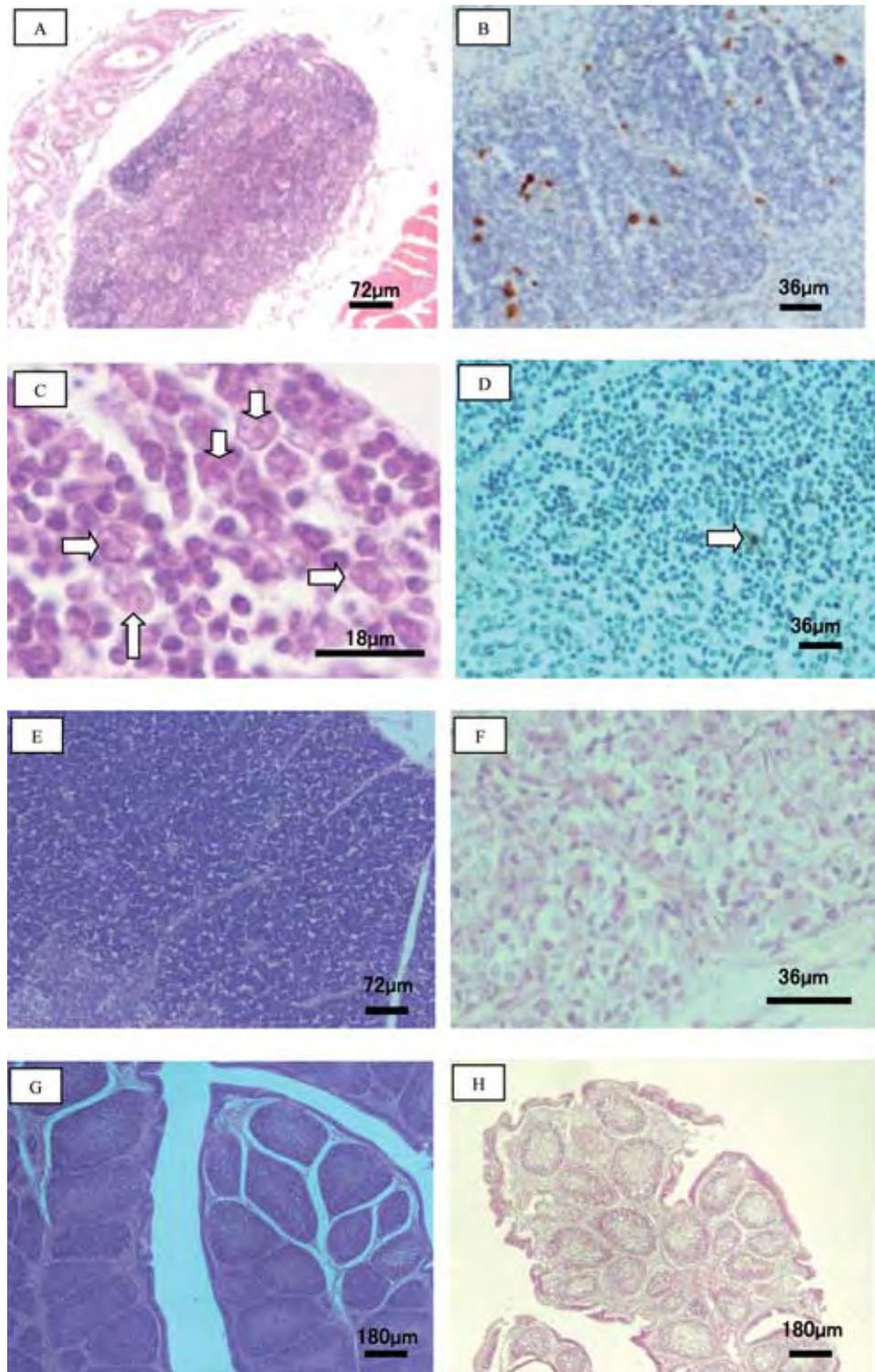


図 2

- A : 6 週齢鶏の胸腺皮質. 重度のリンパ組織減少. (vMDV-CAV群), HE.
- B : 6 週齢鶏の胸腺皮質. 多数のリンパ球にCAV抗原陽性像. (vMDV-CAV群), ABC法.
- C : 6 週齢鶏の胸腺皮質. 中等度のリンパ組織減少. 多くの細胞の核はCAVの好酸性核内封入体 (矢印) を伴って巨大核を呈している. (vMDV-CAV群), HE.
- D : 5 週齢鶏の胸腺皮質. リンパ球の核内におけるCAV抗原陽性像 (矢印). (vMDV-CAV群), ABC法.
- E : 6 週齢鶏の胸腺皮質. リンパ球による再生像. (vMDV群), HE.
- F : 6 週齢鶏の胸腺皮質. 重度のび慢性リンパ組織減少. リンパ球の欠落と細網組織の過形成. (vMDV-CAV群), HE.
- G : 5 週齢鶏のF嚢. リンパ球によるリンパ濾胞の再生. (vMDV群), HE.
- H : 5 週齢鶏のF嚢. 濾胞萎縮と嚢胞形成を伴うび慢性リンパ球減少. (vMDV-CAV群), HE.

は、リンパ芽球や細網細胞において多数のCAV封入体がみられた。封入体は、重度の減少例よりも軽度の減少例で多数認められた（接種後1および2週）。接種後4週では、封入体はわずかにみられた。

vMDV-CAV群よりもvMDV群において胸腺の再生例が有意（ $p < 0.001$ ）に多く認められた（表6）。MDVおよびMDV-CAV群における胸腺病変は、表5に示した。

- 3 **F囊**：vvMDVおよびvvMDV-CAV群では、F囊は重度に萎縮し、多数の上皮性陰窩を伴う薄い粘膜ヒダが認められた。粘膜ヒダのリンパ濾胞は、いくつかは減少し、ほとんどは破壊されていた。濾胞は重度に壊死、減少を呈しており、細網細胞や上皮細胞によって置換され、最後には囊胞が形成された。vvMDVおよびvvMDV-CAV群では、それぞれリンパ球の浸潤を伴った濾胞内における線維増生が1例ずつでみられた。vvMDVおよびvvMDV-CAV群では、リンパ増殖性病変がそれぞれ3/8、3/6例で認められた。

vMDV群では、ほとんどの鶏でF囊の完全な再生がみられた。粘膜ヒダはリンパ濾胞が充満し、円柱上皮が覆っていた（図2g）。濾胞の皮質は、小型リンパ球とリンパ芽球により充実性を呈し、髄質はリンパ球、上皮性細胞およびマクロファージが充満していた。16/20（ $p < 0.001$ ）の鶏が、十分にF囊の再生を示していた。他の4/20例は、間質におけるリンパ増殖性病変を伴い、中等度の再生を呈していた。

vMDV-CAV群における病変は、主に濾胞リンパ球の減少であった。CAV接種後の最初の週では、濾胞のリンパ球がび漫性に脱落した（図2h）。接種後2週では、リンパ組織減少によって髄質のリンパ様細胞は欠落したままであった。髄質は細網細胞を呈するのみであったが、皮質では塩基性の変性細胞がみられた。接種後3および4週では、濾胞の

破壊が重度であり、壊死細胞退廃物を充満した囊胞様構造がみられた。濾胞間結合組織は過形成を示し、単核細胞の浸潤が1例で認められ（8週齢）、それは粘膜ヒダにおけるリンパ腫であった。他の鶏（8週齢）の濾胞は、リンパ球により完全に再増殖していた（ $p < 0.001$ ）。

F囊において再生のみられた鶏は、vMDV-CAV群よりもvMDV群の方が有意に多かった（ $p < 0.001$ ）（表6）。MDVおよびMDV-CAV群におけるF囊病変は、表5に示してある。

- 4 **脾臓**：脾臓の病理組織学的検索により3つの病変が明らかとなり、それらを以下にまとめた（表5）。

(a) **再生性脾臓**：脾臓はほとんど正常の大きさと形状を保っていた。脾臓組織は、大型リンパ球によるエリプソイド周囲のリンパ鞘（PELS）およびリンパ濾胞（胚中心）の再増殖を示した。2～3例では胚中心は肥大し、多数みられた。動脈周囲リンパ鞘（PALS）における再増殖も明瞭であった。PELSとPALSは、赤脾髄を分画していた。vMDV群のおよそ半数（12/20）の脾臓は再生性であり、2例では一つまたは二つのリンパ腫病巣を伴っていた。vMDV-CAV群（ $p < 0.05$ ）の8週齢の1例では、脾臓の再生がみられた。vvMDV-CAV群では、2例が脾臓の再生を示していた。一方、vvMDV-CAV群では1例も再生を示さなかった。

(b) **変性性病変**：Bリンパ球依存域（PELSおよびリンパ濾胞）のリンパ組織減少、フィブリン様物質の沈着を伴うエリプソイド血管の明瞭化、わずかな大型リンパ球を伴うリンパ濾胞の消失または萎縮、被膜の弛緩などが特徴であった。PALSの減少および萎縮のため、白脾髄は減数、相互に離開し、脾臓組織のほとんどは赤脾髄であった。

vMDV群では脾臓においてリンパ組織減少は認められなかったが、一方、vMDV-CAV群のおよそ半数の鶏 (5/11) ($p<0.001$) ではリンパ組織減少がみられた。vMDV-CAV群では、接種後1から2週後にリンパ組織減少がみられたが、2、3および4週目ではリンパ増殖性病変が認められた。vvMDVおよびvvMDV-CAV群では、2/9および5/9例でそれぞれリンパ組織減少がみられた。

(c) リンパ球増殖性病変：これにはPALSのわずかな過形成の始まりから、PALS, PELSおよび小静脈周囲組織などにおける重度のリンパ腫、圧迫された赤脾髄の残存など様々な変化があった。時折、脾臓の再生と関連したわずかなリンパ腫の結節がみられた。脾臓におけるリンパ増殖性病変は、MDVおよびMDV-CAV群において同等に分布していた。リンパ増殖性病変は、vMDV, vMDV-CAV, vvMDV-CAV群においてそれぞれ50% (10/20), 54.5% (5/11) および66.6% (6/9) で認められた。

脾臓における再生は、vMDV群よりもvMDV-CAV群において有意 ($p<0.05$) に多く認められた。しかし、脾臓におけるリンパ組織減少を示す鶏数は、vMDV-CAV群で有意 ($p<0.001$) に多かった (表6)。MDVおよ

びMDV-CAV群における脾臓病変について、表5に示してある。

5 坐骨神経：病変はPayne & Biggs (1967) に従い、A, BおよびC型に分類した。A型は、脱髄を伴う小型、中型および大型リンパ球、細網細胞、マクロファージなどの混在によって構成される。B型は、間質の水腫、小型リンパ球と形質細胞の浸潤、脱髄などが特徴である。C型は、わずかな領域における小型リンパ球と形質細胞浸潤に特徴づけられる。混合型は、部分的にA型 (ほとんどは根部) で、他の神経の一部ではBあるいはC型を示す。MDVおよびMDV-CAV群において、それぞれの型における細胞構成成分は同一であった。しかしながら、それぞれの型の発生頻度は群間において異なっていた (表6, 7)。AおよびB型では、主にワーラー変性、軸索の断片化、脱髄などが認められた。最も著しい変化は、A型で認められた。vvMDV, vvMDV-CAVおよびvMDV-CAV群において、A型は3/15, 5/17および8/18例でそれぞれみられた。vMDV群では、A型の病変は認められなかった。混合型は、vvMDV-CAV, vMDVおよびvMDV-CAV群においてそれぞれ2/17, 3/20および1/18例でみられた。vvMDV, vvMDV-CAV, vMDVおよびvMDV-CAV群において、B型は5/15, 1/17, 5/20および2/18

表6 実験群における坐骨神経および皮膚の病理組織学的病変

組織	病変	vMDV					vMDV-CAV					vvMDV			vvMDV-CAV		
		5W ^a	6W	7W	8W	D	5W	6W	7W	8W	D	5W	6W	D	5W	6W	D
坐骨神経	A型	0/5 ^A	0/5	0/5	0/5 ^B	ND ^b	2/3 ^A	1/3	0/3	2/2 ^B	3/7	2/5	0/4	1/6	2/5	2/4	1/8
	B型	1/5	2/5	2/5	0/5	ND	1/3	0/3	1/3	0/2	0/7	1/5	1/4	3/6 ^D	0/5	1/4	0/8 ^D
	C型	4/5 ^C	3/5	2/5	3/5	ND	0/3 ^C	2/3	2/3	0/2	2/7	2/5	3/4	2/6 ^E	1/5	1/4	7/8 ^E
	混合型	0/5	0/5	1/5	2/5	ND	0/3	0/3	0/3	0/2	1/7	0/5	0/4	0/6	2/5	0/4	0/8
皮膚および羽髄	炎症型	5/5	5/5	4/5	3/5	ND	3/3	3/3	2/3	1/2	2/7	3/5	1/4	1/1	2/5	2/4	2/6
	リンパ腫型	0/5	0/5	1/5	2/5	ND	0/3	0/3	1/3	1/2	0/7	1/5	2/4	0/1	3/5	2/4	0/6
	皮下出血および水腫	0/5	0/5	0/5	0/5	ND	0/3	0/3	1/3	0/2	2/7	0/5	0/4	0/1	0/5	0/4	4/6

^a 鶏の週齢。

^b 死亡例なし。

^{A,C,D,E} フィッシャーの正確確率検定における有意差 ($p<0.05$)。

^B フィッシャーの正確確率検定における有意差 ($p<0.01$)。

例でそれぞれみられた。C型は、vvMDV, vvMDV-CAV, vMDVおよびvMDV-CAV群において7/15, 9/17, 12/20および6/18例でそれぞれ認められた。全体として、坐骨神経におけるリンパ増殖性病変と非増殖性病変は、vvMDV群では3/15 (20%) および12/15 (80%), vvMDV-CAV群では群では7/17 (41.2%) および10/17 (58.8%) でそれぞれ認められた。vMDV群では、3/20 (15%) および12/15 (85%) でリンパ増殖性病変と非増殖性病変がそれぞれみられたが、それらの病変はvMDV-CAV群の9/18 (50%) でも示された。

A型の病変は、vMDV群よりもvMDV-CAV群で有意 ($p < 0.05$) にみられた。しかしながら、B型はvvMDV-CAV群よりもvvMDV群で有意 ($p < 0.05$) に認められた。BおよびC型の両方では、非増殖性の神経病変を伴

うCAVの発症例は有意 ($p < 0.05$) に減少し、vMDV-CAV群では腫瘍病変を伴う発症例が有意 ($p < 0.05$) に増加した。

6 皮膚：皮膚病変は、炎症性およびリンパ腫であった。炎症性病変は、リンパ球、マクロファージおよびわずかな形質細胞により構成され、一方、リンパ腫は濾胞周囲性リンパ増殖性反応としてリンパ球とリンパ芽球により構成されていた (表6および7)。

ほとんどの皮膚病変は炎症性であり、血管周囲におけるび慢性リンパ球浸潤により構成されていた。Choら (1996) によって見出された再生像と類似した、表皮と関連するまたは羽包周囲におけるリンパ球の結節が、vMDV群で認められた。ほとんどの鶏の羽髄では、リンパ増殖性病変はみられなかった。炎症性病変は、vvMDV, vvMDV-CAV, vMDVおよびvMDV-CAV群の5/10, 6/15, 17/

表7 MDVおよびMDV-CAV群における主な病変の相違点

MDV群	MDV-CAV群
vvMDV ・致死率 (52.6%) および平均死亡日数 (32日) ・リンパ腫を伴う骨髄における貧血 ・ファブリキウス囊および胸腺における重度の萎縮 (いくつかの症例では、軽度の増殖がみられた) ・坐骨神経 (20% A型, 33% B型 ^A , 47% C型) ・皮膚 (30% リンパ腫性, 50% 炎症性, 20% 病変なし)	vvMDV-CAV ・死亡率 (64.3%) および平均死亡日数 (30日) ・骨髄における低形成および、またはリンパ腫を伴う重度の貧血 ・胸腺, ファブリキウス囊および脾臓における重度の萎縮 ・坐骨神経 (41% A型, 6% B型 ^A , 53% C型) ・皮膚 (33% リンパ腫性, 40% 炎症性) ・皮下出血および水腫 (26.6%)
vMDV ・死亡率 (21.6%) および平均死亡日数 (41.5日) ・PCV値 (21-25%) を示す骨髄に重度のリンパ腫を伴う貧血 (20.7%) ・胸腺 (18/20) Cおよびファブリキウス囊 (16/20) ^D におけるリンパ球の完全な再増殖および再生, 50%の鶏における再生性脾臓 ・坐骨神経 (15% A型 ^F , 25% B型, 60% C型) ・皮膚 (15% リンパ腫性, 85% 炎症性)	vMDV-CAV ・死亡率 (38.9%) および平均死亡日数 (39.2日) ・PCV値 (12-25%) を示す骨髄低形成とリンパ腫を伴う貧血 (44.4%) (4/11) ^B ・軽度の減少ではじまり重度の減少となる胸腺 (10/11) ^C , ファブリキウス囊 (10/11) ^D および脾臓 (5/11) ^E の再生性リンパ組織におけるリンパ組織減少 ・坐骨神経 (50% ^F A型, 11% B型, 33% C型) ・皮膚 (11% リンパ腫性, 61% 炎症性) ・皮下出血および水腫 (16.6%)
	vMDVおよびvvMDV-CAV ・様々な内臓におけるMD腫瘍細胞と同様にリンパ組織におけるCAV封入体 ・CAV抗原陽性 ・CAVによる皮下出血および水腫

^{A,F} フィッシャーの正確確率検定における有意差 ($p < 0.05$).

^B フィッシャーの正確確率検定における有意差 ($p < 0.01$).

^{C,D,E} フィッシャーの正確確率検定における有意差 ($p < 0.001$).

20および11/18例でそれぞれ認められた。リンパ腫病変は、vvMDV、vvMDV-CAV、vMDVおよびvMDV-CAV群の3/10、5/15、3/20および2/18例でそれぞれ認められた。CAV封入体は、vMDV-CAV群の羽髄におけるリンパ腫の腫瘍細胞においてしばしばみられた。

vMDV-CAV群（3/18例）およびvvMDV-CAV群（4/15）において、いくつかの症例では壊死に発展する皮下水腫および出血（表6および7）が認められた。皮下出血および皮下水腫は、骨髓低形成と関連していた（図1 a）。

免疫組織化学的検査：CAV抗原は、vvMDV-CAV群（図2 b）とvMDV-CAV群（図2 d）の主に胸腺皮質および髄質におけるいくつかの大型細胞で認められた。脾臓ではCAV抗原は明確な分布を示さず、PALSおよびPELS、赤脾髄におけるリンパ増殖性病変（図3 g）とリンパ組織減少（図3 h）の両方の病変部でみられた。CAV抗原は、核内において通常は微細顆粒状に染色されていたが、時折強く染色される大型の核内封入体も認められた。腫大したいくつかの核では、核内封入体とともに核辺縁部が顆粒状に強く染色されていた。CAV抗原は、5および6週齢のvvMDV-CAV群、5、6および7週齢のvMDV-CAV群の胸腺皮質と脾臓において検出された。8週齢においては脾臓では検出されたが、vMDV-CAV群の1例では前胃および坐骨神経の腫瘍細胞では検出されたものの、再生された胸腺では検出されなかった。

CD4およびCD8陽性細胞が、免疫染色によって検出された。CD4およびCD8陽性T細胞は、vMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群の胸腺皮質では減少していた。CD4陽性T細胞は、特に血管周囲に小さな集団として出現していた。CD8陽性T細胞は、vMDV-CAV群（5週齢）の軽度に減少した胸腺皮質に散在していた。しかし、vMDV群では皮質の全層にわたりCD8

陽性T細胞がび漫性に認められる一方で、CD4陽性T細胞は皮質と髄質で認められた。皮質におけるCD4陽性T細胞の染色程度は、CD8陽性T細胞よりも弱かった。

脾臓におけるCD4とCD8の染色性は、脾臓の病理組織像と一致していた。リンパ増殖性病変では、腫瘍性病巣は小動脈および小静脈周囲でみられ、PELSにまで拡大していた。腫瘍性病巣は主にCD4に陽性を示したが（図3 a）、CD8陽性細胞も脾臓組織に散在するか、集塊としてみられた。CD8陽性細胞は、腫瘍性病巣内においては集塊状にみられた（図3 d）。リンパ組織過形成では、CD4およびCD8陽性細胞は、およそ同等の染色性を示した。それらは脾臓ではび漫性に散在していたが、CD4陽性細胞は対照群と比較して中心動脈周囲で軽度に増加していた。リンパ組織が減少しているPALS（白脾髄）では、細胞はわずかでそれぞれが離れており、中心動脈は薄いCD4陽性細胞層によって囲まれているようにみえた（図3 b）。一方、CD8陽性細胞は赤脾髄に散在しており、PELSの染色されない広い部分を伴っていた（図3 e）。CD4陽性細胞は、再生および細胞の減少した脾臓において対照群よりやや多く染色された。対照群では、CD4陽性細胞は主に白脾髄に分布していた。CD8陽性細胞はPALT、静脈周囲リンパ組織、エリプソイド周囲および赤脾髄においてび漫性に分布していた。CD8陽性細胞の染色性は、CD4陽性細胞よりも強かった（図3 c, f）。

考 察

MDの発生における十分に解明されていない一つの問題として、免疫抑制と関連した、特にCAVをはじめとする他の病原体の影響があげられる。MDVに対するCAV混合感染の病原性については、初生ヒナにおける混合感染と比較して成鶏では十分に研究されていなかった。我々は本研究において、4週齢でのMDVとCAV混

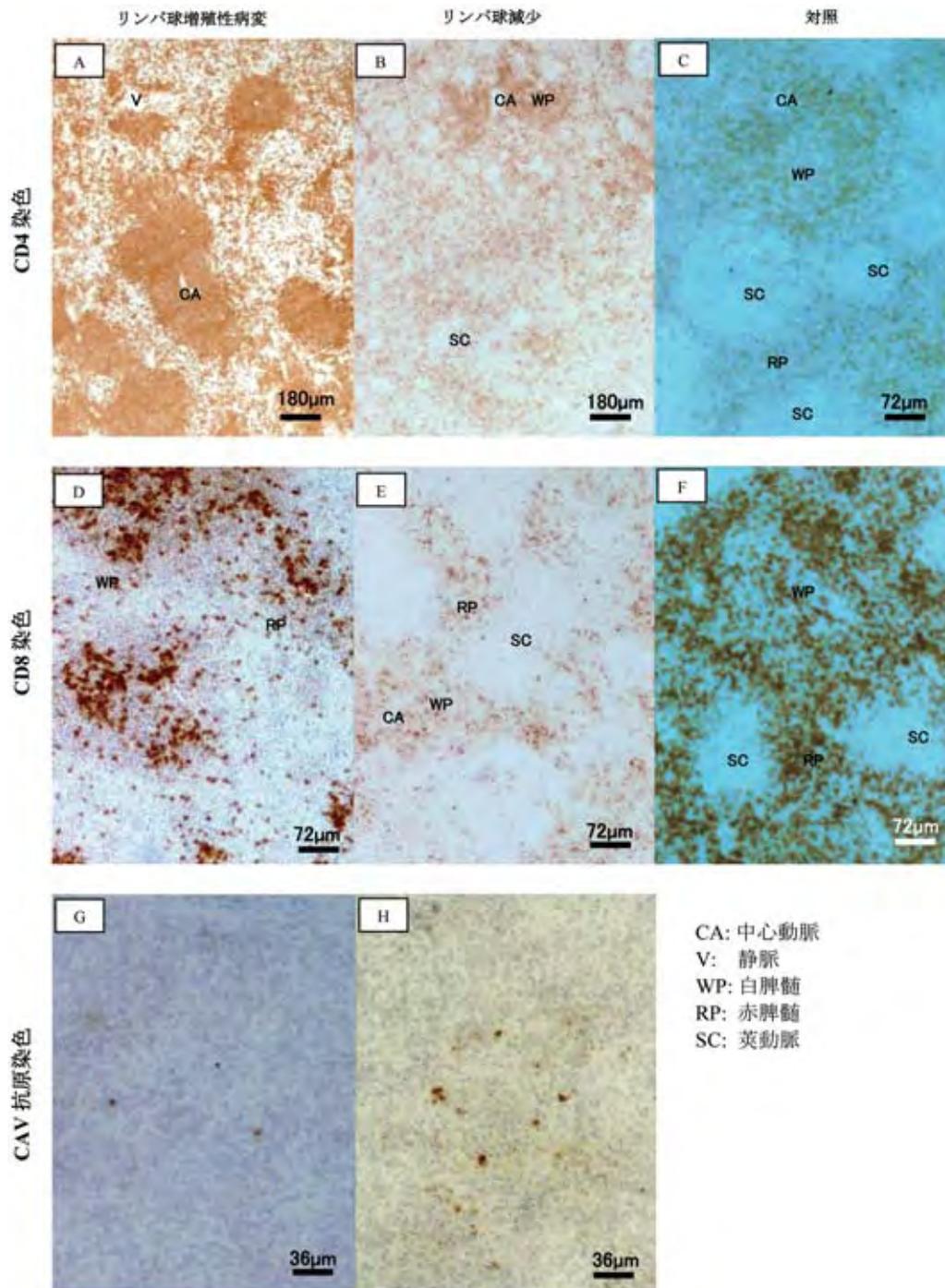


図 3

- A : 7 週齢鶏の脾臓。CD 4 陽性T細胞性腫瘍細胞の多発性集簇。 (vMDV-CAV群), LSAB法。
 B : 6 週齢鶏の脾臓。小動脈周囲のCD 4 陽性T細胞。リンパ球減少を示す赤脾髄に軽度広がっている。 (vMDV-CAV群), LSAB法。
 C : 7 週齢鶏の脾臓。赤脾髄の動脈周囲におけるCD 4 陽性T細胞の正常像。 (対照群), LSAB法。
 D : 7 週齢鶏の脾臓。CD 8 陽性T細胞が赤脾髄および小動脈のリンパ球増殖性病変部の周囲にび漫性に分布。 (vMDV-CAV群), LSAB法。
 E : 6 週齢鶏の脾臓。CD 8 陽性T細胞が赤脾髄において軽度みられる。 (vMDV-CAV群), LSAB法。
 F : 7 週齢鶏の脾臓。CD 8 陽性T細胞が赤脾髄および小動脈周囲で強陽性。 (対照群), LSAB法。
 G : 7 週齢鶏の脾臓におけるリンパ球増殖性病変。リンパ球の核内にCAV抗原陽性所見。 (vMDV-CAV群), ABC法。
 H : 6 週齢鶏の脾臓におけるリンパ球減少。多数のリンパ球の核内にCAV抗原陽性所見。 (vMDV-CAV群), ABC法。

合感染がPCV値および骨髄の病理に与える影響と、骨髄病変と臨床像との相関性について検討した。また、MDV-CAV混合感染によるリンパ組織、坐骨神経および皮膚病変への影響についても記述した。MDVとMDV-CAV混合感染における主な病変の相違については、表6に示した。

CAV感染のMDとの同時発生は、多くの国々における3週齢以上のコマーシャルブロイラー群や産卵開始前、または直前の産卵鶏農場で深刻な問題となっている[12, 24, 25, 47]。野外の状況に近づけるため、我々は初生ヒナにMDVを接種した後、4週齢時においてCAVを接種した。

CAVはMDV株によって引き起こされる死亡率を上昇させ、平均死亡日数を減少させた。死亡数はCAV接種後における死亡のことであるが(4週齢以降)、特にvvMDV-CAVおよびvvMDV群では高い死亡率を示した。vvMDV-CAVおよびvvMDV群における死亡率は、それぞれ64.3%および52.6%で、平均死亡日数はそれぞれ30日および32日であった。これは、vvMDVおよびCAVを混合感染させた4週齢ヒナにおいて高い死亡率を示した初めての報告である。高い死亡率は、おそらく二次的な免疫抑制の増強と内臓におけるリンパ腫の発症によるものと思われる。さらに、CAVはCAV接種後4週以内の死亡率をvMDV群の21.6%からvMDV-CAV群の38.8%へ上昇させた。CAVとMDV、IBDVまたは細網内皮症ウイルスなどとの混合感染は、罹患率と死亡率を増加させた[43-45]。

PCV値と骨髄病変との相関性は、一貫していた。vvMDVおよびvvMDV-CAV群における貧血鶏では、平均PCV値は5週齢時に有意に減少したが、6週齢時には有意に減少せず、貧血鶏の数と一致していた。vvMDVおよびvvMDV-CAV群の貧血鶏では、PCV値の範囲は21から25%で、vvMDV-CAV群で骨髄にリンパ増殖性病変と低形成を有し、PCV値23%を示

した6週齢鶏1例を除いて、それらすべては骨髄低形成または過形成を有していなかった。vvMDVとvvMDV-CAV群の間には、PCV値に有意な差は認められなかった。初生ヒナにおける高病原性MDV株(AC1とRB-1B)の接種は、接種後14および19日目にPCV値の有意な減少を示した。さらに、RB-1B株の接触感染も、接種後26および34日目にPCV値を有意に減少させた[15]。vMDV群では、実験期間中にPCV値の有意な減少は認められなかった。これに対して、vMDV-CAV群では7週齢時にPCV値が有意に減少した。PCV値の有意な減少は、vMDV-CAV群におけるCAV誘発性の低形成と相関していた。一方、vMDV群では、低形成や過形成は認められなかった。しかし、2例における重度のPCV値の減少(15および17%)は、骨髄におけるリンパ腫の発生と関連していた。Glika & Spencer [15]は、MDVのAC-1株接種後19日目のPCV値は6および9%であったが、骨髄低形成の証拠はなかったと報告している。Goryo & Okada [16]は、vMDVとvvMDVを様々な日齢(初生、1週、2週、3週および4週)で接種したが、骨髄低形成は発生しなかったと報告している。MDVのConn-A分離株接種後3週間以内における骨髄低形成とPCV値の減少を記述したものが、Jakowskiら[21]によって報告されている。しかし、このウイルス株にはCAVの汚染があったことが後に判明した(34において引用)。我々の研究における骨髄低形成とCAV封入体の出現との関連から、CAVが骨髄造血前駆細胞に対して直接的な細胞傷害性を持つことが確認された[18]。vMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群における羽の皮下または胸部、大腿部筋肉の出血斑は、CAV感染の特徴として記述されている[46]。本研究では、皮下水腫および出血は、骨髄低形成と関連しており、7週齢で安楽殺した鶏と死亡鶏で認められた。Pope [29]は、それらの出血はCAVが引き起こした血小板減少症に関連して

いると述べている。貧血による酸素欠乏は、血管維持の不良により出血を悪化させる。

vvMDV-CAVの混合感染により病原性が増すと、死亡率の上昇とリンパ組織減少の憎悪を招く。vvMDV-CAV群では、胸腺とF囊が重度に萎縮していた。同様の病変がPope [28]によって報告されている。彼らは病原性MDVとCAVの両方の免疫を欠くヒナでは、両ウイルスの暴露により、コレステロール裂隙形成を伴うウイルス性萎縮を招くと報告している。次なる変化である細胞溶解および免疫抑制の始まりは、MDV接種2から3週後であり、それらは長期間継続する [33]。二次細胞溶解期は永久的な免疫抑制を伴い、リンパ腫への発展と関連している。Calnek [6]は、これらの組織においてウイルスが潜伏感染した細胞が、二次的な免疫抑制の高まりによって再活性化することを示唆している。Morimuraら [23]は、MDV (Md/5) がCD4陽性T細胞のアポトーシスとCD8発現のダウンレギュレーションを誘発し、二次的な免疫抑制のメカニズムとなることを示唆している。vvMDVを接種されたほとんどの鶏では胸腺およびF囊の重度萎縮がみられ、二次的な免疫抑制の原因となりうるが、いくつかの例では胸腺皮質における軽度の再生がみられた。しかし、vvMDV-CAV群における重度のリンパ組織減少は、二次的な免疫抑制およびCAVによる直接的な影響、またはいずれか一方によるものであろう。本研究では、vvMDV-CAV群の胸腺とF囊でのリンパ球減少におけるCAVの役割については、vMDV-CAV群よりも明確ではなかった。これはおそらく、vvMDV株と関連した早期および遅発性の二次細胞溶解期の結果として、CAVに対する標的細胞が欠落したことによるものかも知れない。

vMDV群では、胸腺皮質およびF囊のリンパ濾胞における完全な再生がほとんどすべての鶏でみられ、半数 (12/20) では脾臓の再生もみられた。同様に、胸腺とF囊は、JM16 (vMDV)

接種後14日目に有意な再生を示した [9]。HPRS-16株 (vMDV) を接種した脾臓の再生は、接種後15日目に始まり、接種後30から50日まで継続したが、そこには腫瘍性病巣がみとめられた [2]。それに対して、vMDV-CAV群では、胸腺皮質およびF囊における連続したリンパ球減少が認められた。また、脾臓はCAV接種後の初めの2週間では、リンパ球減少を示していた。リンパ球減少は、胸腺皮質での腫大したリンパ球における核内封入体とCAV抗原の検出からも明らかのように、CAVに起因していた。CAV封入体および抗原は、実験期間中を通して胸腺、脾臓および様々な内臓臓器の腫瘍細胞で認められた。CAV封入体および抗原は、vMDV-CAV群では持続して多数みられたが、1例の再生した胸腺ではCAV抗原は陰性であった。さらに、CAV封入体は内臓臓器におけるMD腫瘍細胞で持続的に認められたことから、MDはCAVの増殖および播種の機会を与えていることが示唆された。CAV抗原は26日齢の再生した胸腺では免疫組織化学的に検出されなかった [38]。しかし、実験期間中でのリンパ組織におけるCAVの持続感染はImaiら [20]と一致していた。彼らはIBDV-CAV混合感染鶏 (5週齢鶏) において、接種後7から28日までの血球からCAVを、そしてCAVの単独接種よりも高い抗体価を検出している。

CAV抗原は、胸腺皮質の他に脾臓のPALS、PELSおよび赤脾髄に分布している [38]。vMDV-CAVおよびvvMDV-CAV群におけるCD4およびCD8陽性T細胞の減少は、双方のウイルスが同時に複製するとき、CAVはMDに対する細胞傷害性T細胞 (CTL) 反応を阻害する可能性があるというMarkowski-Grimsrud & Schat [22]による研究結果により支持される。移行抗体が陰性であった鶏がCAVに感染したとき、細網内皮症ウイルス特異的CTLを発達させることができない。さらに、移行抗体が減弱した後の45日齢におけるCAVの感染により、

細網内皮症ウイルス特異的CTL反応の減少が生じた [22]. CAVによるCTLの減少は, MDV特異的CTLが存在する場合, MDV感染の制御に深刻な影響を与える [35]. 腫瘍性の脾臓では, CD 4 陽性T細胞の分布は, 小動脈と小静脈周囲, そして重度の腫瘍性病変ではPELS中にも広がっていた. 腫瘍性病巣のほとんどはCD 4 陽性T細胞で構成されていたが, CD 8 陽性T細胞も単一に, または集団で, さらに赤脾髄に拡散して出現していた. これらの所見は, Ichijoら [19] およびBaigent & Davison [2] の報告と一致している. 再生とリンパ組織減少のみられる鶏では, CD 4 陽性細胞の染色性は, 対照群と比較してやや強くみられた. 前者では軽度のリンパ増殖性反応を有しており, そこではMDVからの完全な回復がないということを示唆している. リンパ組織減少の鶏では, CD 4 陽性T細胞よりもCD 8 陽性T細胞の方がより影響を受けていることは明らかであった. さらに, 内臓臓器におけるリンパ腫病変中よりも, 胸腺や脾臓で多数の封入体がみられた. この所見は, CD 4 陽性細胞に比較してCD 8 陽性細胞の方がCAVの感染率が高いという報告と一致する [1, 3]. その上, MD培養細胞系に対するCAV感受性は, CD 4 陰性・CD 8 陽性細胞とCD 4 陰性・CD 8 陰性細胞では異なり, CD 4 陽性・CD 8 陰性細胞ではさらに影響を受けやすいのかも知れない [10].

特に末梢神経におけるMDリンパ腫の退縮は, Payne & Biggs [27] およびBurgessら [4] によって認められている. 腫瘍性から炎症性への移行は, MDによる臨床症状発現後の生残鶏において認められ, それは末梢神経病変の退縮と一致している [4, 27]. Choら [11] は, MDによる皮膚病変の退行を記述しており, それはリンパ球集簇の初期増加によって特徴付けられ(接種後1から3週目, Md/5株), その後(4から9週後)に内臓型リンパ腫への進行を伴ったリンパ組織集簇がみられる. 小型リンパ球は,

羽軸における主要な浸潤細胞である.

本研究では, 神経の非増殖性病変を有するわずかな鶏が, Sharmaら [37] によって記述された限局性リンパ球集簇による再生性病変と類似していた. CAVは, 非増殖性病変の見られる鶏の数を有意に減少させ, および腫瘍性病変を有する鶏の数を有意に増加させた. それらは, CAVによるリンパ組織, 特にCD 8 陽性T細胞の減少が, 他の内臓型リンパ腫と同様に坐骨神経や皮膚の病変の退縮を干渉しているのであろう.

本実験では, MDV-CAV混合感染における骨髓低形成が, CAV感染と関連していることが確認され, MDV非接種鶏では低形成はみられなかった. さらに, CAVは高病原性MDVと関連して二次的な細胞融解期を高め, vMDV感染からの回復に影響を及ぼした. CAVに誘発される潜在性の免疫抑制は, いくつかの面で非常に重要である. 第一に, MD, 敗血症, 細菌および真菌感染症などによるブロイラーの廃棄に, 最も重要な要素となっている. 第二には, ブロイラーのワクチンブレイクによってワクチン効果が損なわれ, 次々にMDが発症することである. 第三に, ワクチン接種によって細胞性免疫とのバランスがくずれ, 野外, 特に採卵鶏や種鶏におけるMD発生が頻発するようになる. 最終的には, MDに関する我々の所見のように, 細胞性免疫が回復に対し重要になった時に病気を悪化させてしまうのかもしれない.

引用文献

- [1] Adair BM, McNeilly F, McConnell, CDG, McNulty MS: Avian Dis, 37, 943-950 (1993)
- [2] Baigent SJ, Davison TF: Avian Pathol, 28, 287-300 (1999)
- [3] Bounous DI, Goodwin MA, Brooks R L, Lamichhane CM, Campagnoli RP, Brown J, Synder DB: Avian Dis, 39,

- 135-140 (1995)
- [4] Burgess SC, Basaran BH, Davison T F : *Vet Pathol*, 38, 129-142 (2001)
- [5] Buscaglia C, Nervi P, Risso M : *Avian Pathol*, 33, 190-195 (2004)
- [6] Calnek BW : *Critical Review in Microbiology*, 12, 293-320 (1986)
- [7] Calnek BW : *Current topics in Microbiology & Immunology*, 255, 25-56 (2001)
- [8] Calnek BW, Fabricant J, Schat KA, Murthy KK : *Avian Dis*, 21, 346-358 (1977)
- [9] Calnek BW, Harris RW, Buscaglia C, Schat KA, Lucio B : *Avian Dis*, 42, 124-132 (1998)
- [10] Calnek BW, Lucio-Martinez B, Cardona C, Harris RW, Schat KA, Buscaglia C : *Avian Dis*, 44, 114-124 (2000)
- [11] Cho K-O, Mubarak M, Kimura T, Ochiai K, Itakura C : *Avian Pathol*, 25, 325-343 (1996)
- [12] Davidson I, Kedem M, Borochovit H, Kass N, Ayali G, Hamzani E, Perelman B, Smith B, Perk S : *Avian Dis*, 48, 108-118 (2004)
- [13] De Boer GF, Jeunseen SHM, Van Roozelaar DJ, Vos GJ, Koch G : *Proceedings of the 38th Western Poultry Disease Conference*, Tempe, AZ, Brigham Young University, Provo, UT, pp.28 (1989)
- [14] Fehler F, Winter C : *Proceedings of the 2nd International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*, Institute fur Geflugelkrankheiten, Justus Liebig University, Giessen, Germany, pp.391-394 (2001)
- [15] Glika F, Spencer JL : *Avian Pathol*, 24, 393-410 (1995)
- [16] Goryo M, Okada K : In : *International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*, Rauischholzhausen, Germany, pp.392-405 (1994)
- [17] Goryo M, Suwa T, Matsumoto S, Umemura T, Itakura C : *Avian Pathol*, 16, 149-163 (1987)
- [18] Goryo M, Suwa T, Umemura T, Itakura C, Yamashiro S : *Avian Pathol*, 18, 73-89 (1989)
- [19] Ichijo K, Isogai H, Okada K, Fujimoto Y : *J Vet Med (B)*, 28, 177-189 (1981)
- [20] Imai K, Mase M, Tsukamoto K, Hihara H, Yuasa N : *Res Vet Sci*, 67, 233-238 (1999)
- [21] Jakowski RM, Fredrickson TN, Chomiak TW, Luginbuhl RE : *Avian Dis*, 14, 374-385 (1970)
- [22] Markowski-Grimsrud CJ, Schat KA : *Immunology*, 109, 283-294 (2003)
- [23] Morimura T, Hattori M, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M : *J Gen Virol*, 76, 2979-2985 (1995)
- [24] Morrow C, Fehler F : In : *Marek's Disease : An Evolving Problem*. 1st edn, Elsevier Academic Press, London, pp.49-61 (2004)
- [25] Otaki Y, Nunoya T, Tajima M, Nomura Y : *Avian Pathol*, 16, 291-306 (1987)
- [26] Payne LN : In : *Marek's Disease : An Evolving Problem*. 1st ed, Elsevier Academic Press, London, pp49-61 (2004)

- [27] Payne LN, Biggs PM : Studies on Marek's disease. 2- Pathogenesis. J Natl Cancer Inst, 39, 281-302 (1967)
- [28] Pope CR : Vet Immunol Immunopathol, 30, 31-44 (1991)
- [29] Pope CR : Vet Immunol Immunopathol, 30, 51-65 (1991)
- [30] Purchase HG, Biggs PM : Res Vet Sci, 8, 440-449 (1967)
- [31] Rosenberger JK, Cloud SS : Avian Dis, 33, 707-713 (1989)
- [32] Saijo K, Takeuchi J, Goryo M, Tamura S, Obata F, Fujikawa Y : English Summaries of the Studies on Poultry Diseases in Japan, p.24 (1980)
- [33] Schat KA : Cancer Surveys, 6, 1-37 (1987)
- [34] Schat KA : In : Diseases of Poultry 11th ed, Ames : Iowa State Press, pp.182-201 (2003)
- [35] Schat KA : In : Marek's Disease, An Evolving Problem, 1st ed, Elsevier Academic Press, London, pp. 49-61 (2004)
- [36] Schat KA, Calnek BW, Fabricant J : Infect Immun, 31, 199 (1981)
- [37] Sharma JM, Witter RL, Burmester BR : Infect Immun, 8, 715-724 (1973)
- [38] Smyth JA, Moffett DA, McNulty MS, Todd D, Machie DP : Avian Dis, 37, 324-338 (1993)
- [39] Witter RL, Schat KA : In : Diseases of Poultry 11th ed : Iowa State Press, Iowa, pp.407-465 (2003)
- [40] Witter RL, Sharma JM, Fadly MA : Avian Dis, 24, 210-232 (1980)
- [41] Vickers JH, Helmbolt CF, Luginbuhl RE : Avian Diseases, 11, 531-545 (1967)
- [42] Villegas P, Purchase HG : A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rd ed, American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, USA, pp.167-181 (1989)
- [43] von Bulow V, Fuchs B, Bertram M : J Vet Med series B, 33, 93-116 (1986)
- [44] von Bulow V, Fuchs B, Vielitz E, Landgraf, H : J Vet Med (B), 30, 742-750 (1983)
- [45] Yuasa N, Taniguchi T, Noguchi T, Yoshida I : Avian Dis, 24, 202-209 (1980)
- [46] Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I : Avian Dis, 23, 366-385 (1979)
- [47] Zanella A, Dall'Ara P, Lavazza A, Marchi R, Morena MA, Rampin T, Sironi G, Poli G : In : Current Progress on Marek's Disease Research, American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, pp.11-19 (2001)