脚弱鶏の関節材料からのトリレオウイルスの分離および分離株の性状

高瀬公三* 西川比呂志* 野中富士男* 山田進二*

(昭和 59 年 3 月 16 日受理)

Isolation of Avian Reoviruses from Tendons and Tendon Sheaths of
Chickens with Leg Weakness and Some Characteristics of the Isolates
Kozo TAKASE et al. (The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto 860)

SUMMARY

Avian reoviruses were isolated from the tendons and tendon sheaths of 19 chickens of 7 flocks out of 127 tested birds of 22 flocks with clinical evidence of leg weakness. Biological and serological characteristics were examined in 7 isolates selected from the 7 flocks each.

All the isolates produced cytopathic effect (CPE) in chicken kidney and chicken embryo liver and lung cells. Some of them failed to produce CPE in chicken embryo fibroblasts, duck kidney cells, duck embryo fibroblasts and Vero cells. All the isolates produced plaques of different sizes in chicken kidney cells. Two of the 7 isolates killed all chicken embryos when inoculated via yolk-sac, allantoic sac and chorioallantoic membrane. Crossneutralization test revealed that the isolates could be divided into three serogroups.

要 約

脚弱を示した 22 群 127 羽の鶏の腱および腱鞘よりウイルス分離を試みたところ、7 群 19 羽よりトリレオウイルスを分離した。分離株より 7 株を選び、その性状を検査した。鶏腎、鶏胚肝および肺細胞では全株が CPE を示したが、鶏胚線維芽、アヒル腎、アヒル胚線維芽および Vero 細胞では 4~6 株が CPE を示した。鶏腎細胞におけるブラックは、株により異なったサイズを示した。発育鶏卵卵黄嚢内接種では全株で 100% の死亡率であったが、平均死亡日には株間で差を認めた。尿腔内あるいは漿尿膜上接種では死亡率は株により異なり、0~100% を示した。中和試験では血清学的に 3 群に分けられた。

鶏の脚弱の原因疾患のひとつである腱鞘炎 (Tenosynovitis) はトリレオウイルス (以下、ARV) によって起こることが明らかにされ¹²⁾、レオウイルス性腱鞘炎²⁾と呼ばれている。さらに本症が進展すると腓腹腱断裂になるとされている^{3,4,7)}。

これまで諸外国においては、腱鞘炎、腱断裂、あるいはこれらが疑われる足関節材料 (腱および腱鞘) からの ARV の分離、分離株の性状および分離株を用いた再現試験に関して多くの報告がなされ、これらは総説^{7,12)}にまとめられている。わが国においては腱鞘炎あるいは腱断裂の野外発生病例^{3,9)}が報告されているのみで、足関節材料からの ARV の分離および分離ウイルスの性状については、ほとんど検討されていない。そのため、野外におけるレオウイルス性腱鞘炎の実態については不明な点が多く、本症は十分把握されていない。

著者らは、わが国のレオウイルス性腱鞘炎の実態をウ

イルスの側から明らかにする目的で、脚弱を示し腱鞘炎の疑われた鶏の足関節材料より ARV の分離を試み、分離ウイルスの 2, 3 の生物学的性状について検討した。

1. 材料および方法

1) 分離材料

当研究所に病鑑材料として持ち込まれた材料のうち、臨床的に脚弱が認められ、ウイルス性腱鞘炎の疑われた 22 群 127 羽が検査された。その内訳は表 1 に示すとおりである。検査鶏の足関節材料 (腱および腱鞘) を無菌的に採材し細切したのち、抗生物質を含むラクトアルブミン水解物加アール培地 (以下 LE 培地) を用い乳鉢で約 20% の乳剤を作製した。この乳剤を 3,000 rpm, 15 分間遠沈し、その上清液を分離材料とした。

2) ウイルス分離および同定

試験管に培養した鶏腎 (以下、CK) 細胞に分離材料の 0.2 ml を接種し、1 時間回転吸着後 LE 培地で 2 回洗浄したのち、同培地を入れ回転培養した。CPE の出

* (財)化学及血清療法研究所 (熊本市清水町大窪668)

現を5日間観察し、CPE 陰性の材料は3代まで盲継代を行った。

培養の結果、CPE の認められた材料についてはブラック法でクローニングしたのち、CK 細胞培養上清の鶏赤血球凝集（以下 HA）反応を実施し、HA 陽性で抗ニューカッスル病ウイルス（以下、NDV）血清によりそれが特異的に抑制されたとき、分離ウイルスを NDV とした。HA 陰性のとき、その培養上清の濃縮抗原を用いた寒天ゲル内沈降反応で抗鶏アデノウイルス（以下、FAV）・Ote 株血清あるいは抗 ARV・Uchida 株血清と特異的に反応する沈降線を形製したとき、それぞれ FAV あるいは ARV と同定した。なお、FAV・Ote 株および ARV・Uchida 株は農林水産省家畜衛生試験場、川村斉博士より分与を受けた。

3) 培養細胞に対する病原性

初代培養細胞としては SPF 鶏およびアヒル由来の腎、鶏胚線維芽、鶏胚肝、鶏胚肺およびアヒル胚線維芽（以下、CK, DK, CEF, CELi, CELu および DEF）の各細胞を、継代細胞としてはミドリザル腎由来の Vero および GMC 細胞を用いた。各細胞を試験管に培養したのち、ウイルスを試験管1本当たり $10^{4.0-4.5}$ PFU 接種し、1時間回転吸着させたのちそのまま維持培地を入れ再び回転培養した。培養後5日目まで CPE の出現を観察した。CEF, DK, DEF, Vero および GMC 細胞においては2代まで盲継代した。

ブラック形製にはシャーレに培養した CK 細胞を用いた。ウイルス接種後1時間吸着させたのち洗浄を2回行い、1次寒天培地を重層し、その後5日目にニュートラルレッド 0.01% を含む2次寒天培地を重層した。翌日ブラックを観察した。

4) 発育鶏卵に対する病原性

SPF 発育鶏卵1個当たり、 $10^{4.0}$ PFU のウイルスを卵黄囊内（6日齢）、尿腔内あるいは漿尿膜上（いずれも10日齢）に接種したのち、18日齢になるまで孵卵し、胚の生死を観察した。死亡率100%の群は平均死亡日を求めた。別途約 $10^{2.0}$ PFU を漿尿膜上に接種し、4日目に解卵し膜上のボックの形状を観察した。

5) 中和試験

中和試験には分離株および ARV・Uchida 株を用いた。抗血清には、ウイルスの CK 細胞培養上清を80日齢の SPF 鶏に経口および気管内投与し、21日目に再び同材料を同部位に追加投与したのち8日目に採血したものを使用した。中和試験は KAWAMURA ら⁹⁾の方法に準じた。

2. 成 績

1) ウイルス分離状況

ウイルスの分離状況を表1に示した。ウイルスが分離されたのは9/22群（41%）、24/127羽（19%）であっ

表1 検査鶏群およびウイルス分離状況

鶏群	飼養地 (県)	鶏種	日齢	分離成績	代表株名
1	鹿児島	B ¹⁾	20	— ²⁾	
2	鹿児島	B	20	ARV ³⁾	2/2 ⁴⁾ 56-168
3	鹿児島	B	26	ARV FAV ³⁾	3/7 2/7 56-256 T3
4	鹿児島	B	29	—	
5	佐賀	B	39	—	
6	福岡	B	50	ARV	2/5 57-F
7	熊本	B	50	NDV ³⁾	3/4
8	兵庫	B	63	ARV	1/5 57-161
9	福岡	B	65	—	
10	福岡	B	77	—	
11	山口	B	85	ARV	7/10 56-189
12	山口	B	112	—	
13	熊本	B	120	—	
14	山口	B	126	—	
15	山口	B	180	ARV	1/6 56-93 L
16	山口	B	189	—	
17	山口	B	270	—	
18	愛媛	L ¹⁾	30	ARV	3/10 57-162
19	鹿児島	L	40	FAV	1/7
20	熊本	L	70	—	
21	熊本	L	80	—	
22	宮崎	L	170	—	

注) 1) B:ブロイラー L:レイヤー 2) ウイルス分離陰性 3) ARV:トリレオウイルス FAV:ニフトリアデノウイルス NDV:ニューカッスル病ウイルス 4) 分離陽性数/検査数

た。このうち、ARV は7/22群（32%）、19/127羽（15%）より分離され、また FAV は2群3羽より、NDV は1群3羽より分離された。ARV が分離された7群は20～180日齢までのブロイラー6群およびレイヤー1群であり、これら分離陽性鶏群における分離率は19/45羽（42.2%）であった。分離陽性例は CK 細胞初代あるいは2代目で CPE が確認され、3代目で初めて CPE の出現した例は認められなかった。ARV の分離陽性鶏群よりブラック法によるクローニングで、表1に示す株を代表株として選り以下の試験に供試した。

2) 分離株の培養細胞に対する病原性

分離株の培養細胞に対する病原性を CPE の発現により観察した。成績を表2に示した。CEF, DK, DEF および Vero 細胞では CPE の発現しない株が認められた。CPE の発現しなかった GMC 細胞を除くすべての供試細胞で初代より明瞭な CPE を認めたのは、56-168 および 57-F 株の2株のみであった。

CK 細胞におけるブラックサイズは表2に示すように株間で異なっていた。すなわち、直径1～3mmの小型ブラックが56-168および57-F株で、2～4mmの中型のブラックが56-256 T3株で、また3～5mmの大型の

表2 分離株の培養細胞に対する病原性

株 名	培 養 細 胞								ブラック サイズ ¹⁾
	CK	CELi	CELu	CEF	DK	DEF	Vero	GMC	
56-168	+	+	+	+	+	+	+	—	1~3
57-F	+	+	+	+	+	+	+	—	1~3
56-256T3	+	+	+	+	+	+	—	—	2~4
56-93L	+	+	+	+	+	+	—	—	3~5
56-189	+	+	+	+	+	—	—	—	3~5
57-161	+	+	+	+	+	+	+	—	3~5
57-162	+	+	+	—	—	—	—	—	3~5

注) 1) CK 細胞, 接種後6日目測定直径 (mm)

2) +: CPE 陽性 (+*: 継代2代目で陽性) —: CPE 陰性

写真1 鶏腎細胞におけるブラック

ブラックが他の4株で認められた(写真1)。

3) 分離株の発育鶏卵に対する病原性

分離株を SPF 発育鶏卵に接種した場合の胚の死亡率および平均死亡日を表3に示した。卵黄嚢内接種における死亡率は7株とも100%であった。尿腔内および漿尿膜上接種による死亡率は株により異なり、0~100%を示した。とくに56-168および57-F株は、いずれの部位に接種しても死亡率は100%であった。さらにこの2株は平均死亡日も早く、卵黄嚢内接種では2.5日を示した。漿尿膜上にはすべての株で小さなボックが認められ、株間に相違はなかった。

表3 分離株のSPF発育鶏胚に対する病原性

株 名	接 種 部 位		
	卵黄嚢内	尿 腔 内	漿尿膜上
56-168	100 ¹⁾ (2.5) ²⁾	100 (4.6)	100 (5.0)
57-F	100 (2.5)	100 (5.0)	100 (4.6)
56-256T3	100 (3.9)	0	10
56-93L	100 (4.0)	30	30
56-189	100 (6.4)	0	0
57-161	100 (3.4)	0	0
57-162	100 (8.1)	0	0
対 照	0	0	0

注) 1) 胚の死亡率(%)

2) 平均死亡日

4) 分離株の中和試験

分離株の中和試験成績を表4に示した。56-93L, 56-189, 57-161および57-162株は抗Uchida株血清によりUchida株と同程度に強く中和されたが、56-168および57-F株は抗56-168株血清により、また56-256T3株は抗56-256T3株血清によりそれぞれ強く中和された。

3. 考 察

脚弱鶏の関節材料からARVの分離を、多くの野外材料について試みた報告はわが国ではみあたらない。今回の著者らの分離率は19/127羽(15%)で、JONESら⁹⁾の13/52羽(25%)より低かった。ARVの分離率を日齢別にみると、63日齢以下では5/10群(50%)であったが64日齢以上では2/12(17%)であり、若齢での分離率のほうが高日齢より高い傾向を示した。なお、ARV以外にFAV

およびNDVが分離されたが、脚弱鶏の関節材料からのFAV分離例(鶏群番号3および19)については、わが国での最初の分離例としてすでに報告¹¹⁾した。

ARVはCK, CELi, CELu, CEF, DEFおよびVero細胞のほか、鶏精巢細胞および幼齢ハムスター腎細胞で増殖することが報告^{1,9,12)}されているが、株間の差を検討した報告は少ない。SAHU and OLSON⁹⁾は、関節由来株の株間における培養細胞に対する態度に差を認めている。今回の7株の間にもCPEの発現に差が認められ、SAHU and OLSON⁹⁾の報告に類似した成績であった。

発育鶏胚の死亡率および平均死亡日にも株間で差が認

表4 分離株の中和試験

株 名	抗 血 清		
	Uchida	56-168	56-256T3
56-168	0.6 ¹⁾	2.6	1.0
57-F	1.2	3.0	1.0
56-256T3	1.6	1.0	3.3
56-93L	3.2	0.8	1.9
56-189	3.3	. ²⁾	.
57-161	3.4	.	.
57-162	3.2	.	.
Uchida	3.2	1.0	2.3

注) 1) 中和指数

2) 測定せず

められ、分離株の発育鶏胚に対する病原性はそれぞれ異なっていると考えられる。

ARV のブラックサイズは同一ではなく、いくつかのサイズが認められているが^{8,9)}、今回の関節由来 7 株のブラックサイズも同一ではなかった。とくに小型のブラックを形成した 56-168 および 57-F 株が、多くの培養細胞で初代より CPE を示し、また発育鶏胚に対する病原性も最も強かった株であったことは、ブラック性状と病原性との関連を考えるうえで興味深い。

ARV の血清型は 11¹⁰⁾ に分けられているが、わが国では 5 つ⁹⁾ の血清型が確認されている。しかし、関節由来 ARV の血清型に関する検討は少ない^{9,10)}。SAHU and OLSON⁹⁾ は関節由来 5 株に 2 つの血清型の存在を認めている。著者らの分離株は抗 Uchida 株血清との中和成績より、56-168, 57-F および 56-256 T3 株は他の 4 株とは異なった血清型に属するものと考えられ、また抗 56-168 および抗 56-256 T3 株血清との反応より 56-168 株と 57-F 株は同じ血清型であるが、56-256 T3 株は別の血清型と考えられる。すなわち、7 株は血清学的に 3 群に区別できると思われる。

以上のように、足関節由来 ARV の性状は種々の点で異なっており、このことはレオウイルス性腱鞘炎が特定の ARV に起因せず、性状の異なった複数の ARV によって起きていることを示唆している。しかしながら、今回の分離株が野外の脚弱とどの程度関連していたかは明らかにされていない。この点を含めて、分離株の *in vivo*

における性状を今後検討する必要がある。

文 献

- 1) GUNERATNE, J. R. M., JONES, R. C. and GEORGIU, K.: *Avian Pathol.*, 11, 453~462 (1982).
- 2) 板倉智敏: 鶏病研報, 15, 143~153 (1979).
- 3) ITAKURA, C., MATSUKAWA, Y. and GOTO, M.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 39, 509~520 (1977).
- 4) JOHNSON, D. C. and VAN DER HEIDE, L.: *Avian Dis.*, 15, 829~834 (1971).
- 5) JONES, R. C., GUNERATNE, J. R. M. and GEORGIU, K.: *Vet. Rec.*, 102, 365 (1978).
- 6) KAWAMURA, H., SHIMIZU, F., MAEDA, M., et al.: *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 5, 115~124 (1965).
- 7) KIBENGE, F. S. B. and WILCOX, G. E.: *Vet. Bull.*, 53, 431~444 (1983).
- 8) 西村八郎, 藤江弥一, 土家敏嗣: 鶏病研報, 12, 176~181 (1976).
- 9) SAHU, S. P. and OLSON, N. O.: *Am. J. Vet. Res.*, 36, 847~850 (1975).
- 10) SAHU, S. P., OLSON, N. O. and TOWNSEND, R. W.: *Avian Dis.*, 24, 896~903 (1980).
- 11) TAKASE, K., MARUYAMA, T., NONAKA, F., et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 45, 517~518 (1983).
- 12) VAN DER HEIDE, L.: *Avian Pathol.*, 6, 271~284 (1977).
- 13) WOOD, G. W., NICHOLAS, R. A. J., HEBERT, C. N., et al.: *J. Comp. Pathol.*, 90, 29~38 (1980).

//////新 刊 紹 介//////

獣 医 伝 染 病 学

<第 二 版> 定 価 9,800 円

笹 原 二 郎 柴 田 重 孝 編
清 水 悠 紀 臣 椿 原 彦 吉

本書はその主たる目的が獣医教育にあり、従来の成書には取り上げられていなかった感染病を考える上に欠くことのできない基本的理論と実験防疫に必要な項目が盛り込まれており、さらに各論では実験動物、魚類の章が設けられていて、在来の型を破って多くの努力工夫がなされている。

教育者・研究者ならびに家畜伝染病防疫に携わる実務家はもちろんのこと、特に大学における教科書・参考書としてご利用をすすめる。

発 行 所 (株) 近 代 出 版

〔〒150 東京都渋谷区渋谷 1-10-1 八千代ビル〕

電 話 03-499-5191 振 替 東 京 9-168223