

学 位 論 文 題 名

Etiological studies on Marek's disease vaccine breaks

（マレック病ワクチンブレイクに関する病原学的研究）

学位論文内容の要旨

マレック病（MD）は、MD ウイルス（MDV）に起因する家禽の腫瘍性疾病であって、これまで我が国の養鶏産業に大きな被害をもたらしてきた。1970年代入り、弱毒化 MDV、七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）、野外分離弱毒および非腫瘍原性 MDV を用いた生ワクチンが開発され、同時にこれらのワクチンの普及によって MD の発生は激減した。しかし、日本を始め世界各国で鶏群に対して MD ワクチンが適切に接種されていたにもかかわらず通常の損耗率を越える MD の発生がしばしば観察され、養鶏産業上の大きな問題となってきた。現在このような現象は、ワクチンブレイク（vaccine breaks）と呼ばれ、その発生原因の解明と早急な対策が求められている。

我が国では養鶏と並んで養鶉産業も発達しているが、最近、各地で日本ウズラ群にも MD の発生が報告された。ウズラにおける MD の流行は MD ワクチンの投与によって抑制されているが、しばしば鶏と同様にワクチンブレイクが観察され、これの予防対策も養鶉産業分野の緊急な課題となっている。

ワクチンブレイクの要因に関して欧米では、病原性の極めて強い MDV（超強毒株）が HVT ワクチン接種鶏から分離されたことから、ワクチンによって防御しきれないほどの超強毒株の存在がワクチンブレイクの主要因であると考えられた。しかし、これまで日本ではこのような超強毒株の存在は全く知られていない。

一方、1979年湯浅らは鶏から正二十面体ウイルスである鶏貧血因子（chicken anemia agent, CAA）を分離し、世界最初に報告した。CAA は、鶏の造血およびリンパ系に強い傷害を与えることから、この感染によって鶏が日和見感染症の誘発やワクチン効果の阻害など様々な影響を受けていることが推測された。

本論文では、ワクチンブレイクの原因を病原学的に解明する目的で以下のことを実施した。(1) 鶏および日本ウズラからの MDV の分離とその病原性の確認。特に超強毒分離株の性状の検討。

(2)MDV 分離株に対する異なった鶏品種の感受性の検討。(3)鶏での MDV 感染に対する MD ワクチンの効果判定。(4)鶏における MD ワクチン接種と CAA 感染の関係。(5)MD ワクチンウイルスの毒力の再検討。

得られた結果は、以下のように要約される。

1. 12群の HVT ワクチン接種および未接種のホワイトレグホーン鶏群で発見された61羽のマレック病罹患鶏から採材し、それらの皮膚乳剤あるいは血液を培養細胞（鶏胚あるいはアヒル胚線維芽細胞および鶏腎細胞）に接種して13株の MDV 様ウイルスを分離した。同様に、MD の発生が疑われた 8 群の HVT ウイルス接種および未接種の日本ウズラから得られた61羽分の皮膚乳剤あるいは血液について MDV の分離を試みた。細胞培養系ではワクチン接種の有無にかかわらずウズラから MDV を分離できなかったが、鶏雛にウズラ血液を接種することによりワクチン接種群から 2 株と未接種群から 2 株計 4 株の MDV 様ウイルスが分離された。

鶏およびウズラ由来の新鮮分離株は、いずれも鶏胚線維芽細胞で円形の変性細胞からなるプラークを形成した。また、各株の感染細胞は間接蛍光抗体法を用いた血清型別試験で 1 型の特異抗原を認識する単クローン抗体と反応し、さらに鶏における接種実験では供試分離株の全部が 1 型に特徴的な MD リンパ腫を形成したことから、これらは 1 型の MDV と同定された。これらの成績のうちウズラからの MDV 分離は、我が国では最初である。

形質の異なる 2 系統の鶏（P-と PDL-1）を用いて分離 MDV の病原性を調べた結果、分離株の毒力の程度は様々であって、死亡率は分離ウイルス株毎に 0-100%の幅で変動した。P-2 鶏における死亡率は、PDL-1 鶏におけるよりもやや高かったが、両者の間で MD 病変の出現率に有意差は認められなかった。これまで Witter らは、超強毒株に感染した鶏雛でファブリキウス嚢と胸腺の高度の萎縮を伴った早期死亡例が高率に見られることを報告した。本実験では分離株の中に早期死亡を引き起こす株が 8 株含まれていたが、早期死亡例の発生率は、PDL-1 鶏よりも P-2 鶏で明らかに高かった。鶏由来株のうちの 2 株（MS1 と MS2）は、鶏雛で早期死亡を惹起するとともに MD による高率な死亡例の発生を引き起こした。一方、ウズラ由来株では、QM3 株が最も高い致命率を示した。

MD 高感受性の P-2 鶏を HVT ワクチンで免疫した後に、鶏で高い致命率を示した鶏由来株（MS1 と MS2）とウズラ由来株（QM3）の計 3 株を用いて各々免疫鶏に攻撃接種したところ、免疫鶏は鶏由来株に対して十分な MD 防御能を示さなかったが、PDL-1 鶏ではワクチン接種後、鶏由来株の攻撃に対して十分な防御能を示した。このように高感受性鶏において HVT ワクチンの防御効果を低下させる現象ならびに鶏雛に対する高い病原性（高致命率と早期死亡の

惹起) から, MS 1 株と MS 2 株はともに欧米で報告されていると同様の超強毒株型 MDV であることが判明した。P-2 鶏に, HVT と 2 型 MDV の 2 価ワクチンおよび 1 型 MDV の CV1988 ワクチンをそれぞれ接種したところ, これらのワクチンは鶏由来株 (MS 1 と MS 2) の攻撃に対して HVT ワクチン単独より高い MD 防御能を示した。

2. 一日齢の鶏雛に HVT ワクチンを接種後, 4 日齢で CAA を接種し, さらに 8 日齢で強毒 MDV を攻撃接種したところ, CAA 接種群では CAA 未接種鶏群に比べて MD 発生率が有意に高く ($p < 0.05$), CAA 感染が MD ワクチンの効果を減弱させることが判明した。しかし, 鶏の品種間でこの抑制効果に差は認められなかった。また, CAA 感染鶏での MDV の攻撃時期を 18 日齢に遅らせた場合, MD ワクチン効果の減弱は認められなかった。鶏に対する CAA の病原性は, MD ワクチン株との重感染により増強されたが, CAA 感染は MDV の病原性を増強しなかった。さらに, CAA 感染は, 鶏における MD のワクチンウイルスの増殖に顕著な影響を与えなかった。CAA 感染鶏における MD ワクチン免疫の抑制の機序は明らかにできなかったが, この免疫抑制効果は CAA と MD ワクチンとの重感染によって引き起こされるリンパ組織の傷害に起因すると推測される。

3. MD 生ワクチンウイルス株として用いられている MDV CV1988 株, MDV SB 1 株および HVT FC126 株の病原性を形質の異なる 3 系統の鶏 (PDL-1, P-2 と L151) を用いて調べたところ, CV1988 株を接種された PDL-1 鶏で低率ながら脚弱を伴う末梢神経病変が認められた。

以上のように, 欧米において, ワクチンブレイクの主要因と考えられている超強毒株が日本の鶏から初めて分離されたことから, HVT ワクチンで免疫された鶏群におけるワクチンブレイクの一因として, これらの超強毒株の関与が示唆された。また, 現行ワクチンの中に超強毒株に対して強い免疫効果を現わすものも認められ, さらにこれらのワクチンによる防御効果が, 鶏の品種と関連していることも明らかにされた。また, 常在的に広く分布する CAA による孵化後早期の鶏雛群の感染もまた, ワクチン接種鶏群におけるワクチンブレイクの一因となり得ることが示された。さらに, MD ワクチン株の中には, 稀ながら鶏に MD 病変を引き起こすもののあることも判明した。すなわち, ワクチンウイルス自体がいまだ鶏に対して完全には弱毒化されていないために, 高感受性鶏ではワクチンブレイクによる MD の発生する可能性のあることも明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	橋本信夫
副査	教授	板倉智敏
副査	教授	小沼操
副査	助教授	高島郁夫

養鶏産業に甚大な被害をもたらしたマレック病（MD）は生ウイルスワクチンの開発とその広範な使用によって激減した。しかし最近ワクチンを接種したにもかかわらず発病するいわゆる“ワクチンブレイク”現象が各地で観察され、その原因の解明が急がれていた。

申請者はマレック病鶏からマレック病ウイルス（MDV）の超強毒株を分離して生ワクチン免疫鶏に接種し、実験的にワクチンブレイクを検証するとともに、鶏に免疫抑制を起こすウイルス性の鶏貧血因子（CAA）の感染と MD ワクチン効果との関連を検討し、ワクチンブレイク現象の解明を試みた。本論文はこれらをまとめたもので英文79頁からなり、参考論文12編を付している。

まず、わが国の MD 罹患鶏から分離された多数の MDV について鶏に対する病原性を調べたところ、ほとんどが強毒型に属し、また潜伏期が短くて内臓病変の程度が著しく強く、致死率100%に達する超強毒株も2株検出された。そこで MD 高感受性鶏を用い、MD ワクチンで免疫した後に超強毒株を攻撃接種したところ、高率に MD の発生が認められた。すなわち従来のワクチンで防御し切れないような超強毒株の感染がワクチンブレイクの原因となることが明らかとなった。さらに各種生ワクチン株について3系統の鶏を用いて毒力を検定してところ1系統で低率ながら MD を起こすものが認められ、弱毒化の不完全な生ワクチンのあることが判明した。またわが国に広く常在性に分布する CAA を孵化早期に MD ワクチン投与を受けた鶏に感染させた後、MDV 強毒株で攻撃接種したところ MD の高率な発生が認められた。すなわち鶏雛での CAA 感染が免疫抑制を引き起こして MD ワクチンの効果を減弱させ、ワクチンブレイクの一因となり得ることが示唆された。

これらの知見は養鶏産業上大きな問題となっているマレック病の予防対策を確立する上で貢献するところ大である。よって審査員一同は今井邦俊氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。