

学 位 論 文 題 名

Pathological Studies on Skin Lesions Caused
by Marek's Disease Virus in Chickens

鶏のマレック病ウイルスに起因した皮膚病変に関する病理学的研究

学位論文内容の要旨

マレック病ウイルス（MDV）はアルファヘルペスウイルス亜科に属し、鶏にTリンパ球由来の悪性腫瘍を内臓、皮膚、神経、筋肉などを含めた全身に引き起こす。日本において、1992年以後、食鳥検査制度が実施されたが、これを契機に皮膚病変を主徴とするマレック病（MD）が多発するようになった。皮膚病変を主徴とするMDに関しては、病変の形成過程、病型をはじめ、内臓病変、羽髄病変、さらには羽包上皮の核内封入体形成との関係など不明な点が多い。よって著者は、この皮膚病変の本態を知る目的で本研究を実施した。

第1章では、MD皮膚病変の病理発生を明らかにする目的で研究を行った。

検索材料としては、1週齢のSPF鶏20羽（A群）と25羽（B群）の腹腔内にMDV Md/5株を接種し、両群共ウイルス接種後（PI）1週間隔で、9～10週齢まで、皮膚小片を同一個体から生検した。また、B群はPI1週間隔で3羽ずつ殺処分し、材料を得た。これらの材料は、肉眼的ならびに病理学的に検索した。

検索の結果、皮膚病変は羽包周囲に始まる様々な程度と質のリンパ球性細胞集簇を基本としていた。この病変から、皮膚病変は腫瘍性（進行型と退縮型に細分）と非腫瘍性に大別された。腫瘍性進行型病変は、A群では5/20羽に、B群では1/25羽に発現した。この病変では、リンパ球性細胞集簇がPI1週から実験終了まで進行性に増大し、PI4週以降では、皮膚に肉眼可視の顆粒状腫瘍病変が認められた。また、病変が大型化するに従って、複数のリンパ球性細胞の濾胞状集簇がみられ、病変は真皮から皮下組織に及び、同時に細胞分裂像も増加した。細胞集簇内の反応性リンパ球（炎症性変化）と腫瘍性リンパ芽球（腫瘍性変化）の比率は、実験初期では前者が優勢、中期では両者がほぼ同等、終期では後者が優勢であった。腫瘍性退縮型病変は、A群では11/20羽、B群では10/25羽に認められた。PI3週までの退縮型病変は、進行型のPI3週までの病変と同じく、羽包周囲における大部分小型リンパ球と若干のリンパ芽球の集簇であった。しかし、PI4週以降では、その細胞集簇は漸次小型化し、増殖した結合組織内に埋れていた。腫瘍性進行型6例中5例と、退縮型21例全例は、内臓にMD病変を保有していた。また、両型共、PI1週以降常に、羽包上皮にMD核内封入体が認められた。非腫瘍性病変はA群の2/20羽にみら

れ、これはPI 1~3 週にわたる一過性の小型リンパ球小集簇巣で、羽包上皮の核内封入体もこの時期にのみ観察された。

以上の所見より、MD 皮膚病変は、羽包周囲に始まるが、MDV によるリンパ球集簇巣が進行性に腫瘍を形成する場合と、退行して腫瘍を作らない場合のあることが示された。

第2章では、自然発生するMD の皮膚病変の病理学的特徴を明らかにする目的で研究を行った。

検索例は、食鳥検査時、皮膚に結節性病変が認められた15 農場からの8~9 週齢の肉用鶏91 羽である。肉眼的に、皮膚結節は小型（直径3~5 mm）からこれが融合した大型のもの（10 cm x 5 cm x 0.7 cm）まで、様々であった。皮膚病変の組織像は、羽包周囲の真皮から皮下組織に及ぶリンパ球性細胞の集簇であったが、個々の集簇巣の大きさによって炎症性の小型リンパ球（SL）と腫瘍性のリンパ芽球（LB）の比率が異なっていた。この比率に従って、MD 皮膚病変は、組織学的に type A から E まで5つに分類した。すなわち、主に SL で構成された小集簇巣は type A、SL に若干の LB がある小集簇巣を type B、SL と LB 両者がほぼ同じ比率の中型集簇巣を type C、LB が優勢で若干の SL がある大型集簇巣を type D、主に LB で構成された大型集簇巣を type E に分類した。肉眼的な皮膚結節は、この病変の分類とも関係があった。すなわち、肉眼的に結節が大きくなるほど、組織学的には type A から type E 病変に移行した。

以上の結果から、自然発生の MD 皮膚病変は、炎症性病変から腫瘍性病変まで多様な病変を示し、組織学的には type A から type E まで5つに分類できることが示された。これらの病変は、第1章の結果から type A（主に炎症性）から type E（主に腫瘍性）に進行する事が示唆された。

第3章では、MD 皮膚病変の組織内における MDV リン酸化蛋白質である pp24, pp38, pp41 発現細胞の分布を、免疫組織化学的ならびに遺伝子工学的手法を用いて解析した。

検索には、MDV Md/5 株を接種して MD 皮膚腫瘍病変を誘発した SPF 鶏5 羽（第1章例）、同肉用鶏7 羽（3 週齢の肉用鶏に第1章例と同じ方法で MDV 接種）および MD 自然発生例24 羽（第2章例）の皮膚病変から作製したパラフィン包埋切片を使用した。MDV リン酸化蛋白質を認識するモノクローナル抗体 M21 を用いた免疫染色（Streptavidin-biotin 法）の結果、腫瘍化した皮膚病変に形成された壊死巣に限局して、抗原強陽性リンパ芽球が多数認められた。また、核内封入体を有する羽包上皮細胞も陽性を示した。一方、変性・壊死に陥っていない腫瘍組織においては、弱陽性細胞がまれに認められるのみであった。

MD 皮膚腫瘍病変における MDV リン酸化蛋白質遺伝子の転写産物を定量的に解析するため、皮膚パラフィンブロックから羽包上皮を取り除いた切片を作製した。これより抽出した全 RNA に対して、主要な MDV リン酸化蛋白質である pp38 遺伝子転写産物を特異的に増幅するプライマー対を使用した Reverse-transcription polymerase chain reaction を行った。増幅産物は、internal probe を用いたサザンハイブリダイゼーションによって検出した。その結果、pp38 mRNA は壊死に陥った腫瘍組織において大量に発現し、壊死に陥っていない腫瘍組織においては微量しか発現していないことが確認された。

以上の結果から、pp38は腫瘍化に関与するというよりは、むしろ腫瘍内の壊死病変の形成に関係することが明らかになった。また、MDV感染羽包上皮細胞がpp38抗原陽性であることから、pp38はMDVによるcytolytic infectionに関係していることが考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	板 倉 智 敏
副 査	教 授	橋 本 晃
副 査	教 授	小 沼 操
副 査	教 授	岩 永 敏 彦

学 位 論 文 題 名

Pathological Studies on Skin Lesions Caused by Marek's Disease Virus in Chickens

鶏のマレック病ウイルスに起因した皮膚病変に関する病理学的研究

マレック病 (MD) は古くから知られ、かつては主たる病変の座を強調して、内臓型、神経型、眼型、皮膚型などと型別されていた。ところが、1960 年代に入ってから、MD の全ての病型がヘルペスウイルスを原因とすることが明らかにされ、以来型別は強調されなくなった。しかし、現実には、皮膚病変を主徴とする MD が存在し、近年、日本および外国においてその病変の発生が問題視されるようになった。そこで申請者は、その野外例および実験例を形態学的に検索し、病変の病理発生を明らかにした。

最初に、MD 皮膚病変を実験的に作出し、これを病理学的に検索した。特に、同一個体から 1 週間隔で皮膚小片を生検し、病変の形成過程を明らかにした。すなわち、皮膚病変は羽包周囲におけるリンパ球性細胞集簇で始まり、これから進行して腫瘍に発展するものと、全く進展せず退縮するもののあることが指摘された。腫瘍に進展する場合は、リンパ球性細胞集簇巢内にリンパ芽球性（腫瘍性）細胞が多くなっていた。なお、腫瘍に進展する例は、羽包上皮に核内封入体を形成し、羽髄にも腫瘍性病変を有していた。

次に、食鳥検査所で皮膚に MD 病変（結節）を有する肉用鶏 91 羽を収集し、これらについて皮膚病変を中心に検索した。この結果、皮膚の組織病変は、羽包周囲の真皮から皮下織に及ぶリンパ球性細胞の集簇で構成されていた。この細胞集簇は、炎症性の小型リンパ球と腫瘍性のリンパ芽球の様々な比率からなり、前者の細胞が優勢な場合は肉眼的に小型の結節を、後者の細胞が優勢な場合は肉眼的に大型の結節を形成していた。

以上のように、申請者は MD の実験例と自然発生例を比較研究し、MD の皮膚病変の形成機序を明らかにした。

さらに、MD 皮膚病変の組織内における MD ウイルスリン酸化蛋白質である pp38 の発現状況を免疫組織学的ならびに遺伝子工芸手法で検索した。その結果、pp38 抗原は腫瘍組織内の壊死細胞に検出され、変性、壊死に陥らない細胞には検出されなかった。こ

れにより、pp38 と細胞融解性変化との関連性が示唆された。

以上の成果は、MD ウイルスに起因する皮膚病変の病理発生の理解に大きく貢献する。よって審査員一同は、趙 庚五氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。