

鶏白血病不在鶏の開発と維持

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	水野, 喬介 立山, 幸男 山田, 進二 小原, 速美 伊藤, 伊佐夫 市原, 強 市原, 鶴雄
巻/号	29巻8号
掲載ページ	p. 449-453
発行年月	1976年8月

鶏白血病不在鶏の開発と維持

水野喬介* 立山幸男* 山田進二* 小原速美* 伊藤伊佐夫* 市原 強* 市原鶴雄*

(昭和50年11月18日受付)

Production and Maintenance of Chicken Flocks Free from Avian Leukemia

KYOSUKE MIZUNO, et al. (Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto 860)

SUMMARY

Chickens of four strains of the White Leghorn breed were introduced, selected by the RIF test, and raised in an isolated chicken house. As a result, a flock of chickens free from avian leukemia virus (ALV) was produced and maintained successfully.

1. Of 140 chickens introduced, 42 were subjected to the RIF test. Of them, 35 birds (83.3%) were free from ALV. All of them, except 3 C/B birds (7.1%),

were susceptible to viruses of groups A and B. No C/A chickens were found.

2. Neutralizing Antibody against group A viruses was detected from 16 of 24 birds, but that against group B viruses was from no birds.

3. Hereditary susceptibility to group E viruses was found in 20.0% and resistance to the same viruses in 66.7%. Both properties were noticed in 13.3%.

鶏白血病ウイルス(以下ALVと略)は鶏の間に広く浸潤しており、またラウス肉腫ウイルス(以下RSVと略)との関係からみた宿主域、相互干渉のパターンあるいは抗原性から、現在のところA, B, C, DおよびEの5群に分けられている。しかし実際野外ではAおよびB群に属するウイルスが問題とされている。

ALVは卵を介して垂直伝播し、また感染後直ちに症状を発現せず、容易に診断できないことから、本症の防遏に著しい障害を与えている。鶏白血症を含めた鶏病の研究のためにALV不在鶏が必要となり、すでにALV不在鶏群の作出についてはResistance Inducing Factor(以下RIFと略)テストを用いてウイルス排泄鶏の摘発淘汰が行われてきた^{4,8,10)}。著者らもRIFテストによってAおよびB群ウイルス不在鶏を選抜し、この鶏を繁殖してALV不在鶏群を維持することができたので、その成績を報告する。

実験材料および方法

鶏：実験に用いた鶏は白色レグホン種で、1970年3月に熊本県養鶏試験場から導入したGおよびO系、また1971年3月に福岡県種鶏場から導入したIおよびN系で、90~120日齢のものである。

鶏舎および鶏の管理：実験鶏は独立した陽圧式のウィンドレス鶏舎で飼育し、種卵を採取するために1羽の雄に4~5羽の雌を配し、4~5日目ごとに1~2日間同居させ自然交配させた。管理人が鶏舎に入出入りする場合はシャワーで全身を洗淨のうえ、消毒した衣服に着がえた。

* 化学及血清療法研究所(熊本市清水町大窪668)

RSV：RIFテストおよび中和試験に用いたAおよびB群の指示ウイルスは、農林省家畜衛生試験場から分与をうけたBryan hightiter株のRSV(RAV-1)およびRSV(RAV-2)である。また、E群ウイルスはRSV_E(O)で、このウイルスの感受性検査は長崎大学医学部宮本教室で行なわれた。

RIFテスト：10日齢の鶏胎児(CE)細胞の培養はRUBIN⁹⁾の方法にしたがい、個別的に細胞培養を行なった。培養液はトリプトース・フォスフェイト・ブロス10%、牛血清5%、ファンギンソン0.5mg/mlを含んだEagle培地を用いた。寒天培地は培養液に0.9%になるように寒天(Bact agar)を加えたものを使用した。

初代CE細胞は3~4日後トリプシン処理して継代用2枚およびRIFテスト用6枚の2代CE培養を作成した。継代用はさらに3~4日間培養後、これをトリプシン処理し、前記同様に3代継代を行なった。RIF1次テストは1000PFUのRSV(RAV-1)およびRSV(RA

表1 導入鶏の系統、数および抗体の保有

導入先	系統	導入数		RIF テスト 終了羽数	中和抗体 ¹⁾	
		雄	雌		A群	B群
熊本県養鶏試験場	G	10	40	17	5/8 ²⁾	0/8
	O	4	20	7	1/2	0/2
福岡県種鶏場	I	20	40	8	5/7	0/7
	N	20	40	10	5/7	0/7
計		54	140	42	16/24	0/24

¹⁾ 供試ウイルス：RSV(RAV-1)およびRSV(RAV-2)

²⁾ 分母は検査数、分子は陽性数

鶏白血病不在鶏の開発と維持

V-2) をそれぞれ2枚のシャーレに接種した。翌日 RSV を接種したシャーレは寒天を含んだ固形培地を重層し、6日間培養してフォーカスの数をかぞえ、感受性の CE 細胞培養における RSV のフォーカス数と比較した。このようにして、各代指示ウイルスを接種し、細胞の感受性を調べ、対照の非感染感受性細胞における RSV のフォーカス数と比較し、その比が1/10以下を陽性、1/3~1/10を疑陽性、1/3以上を陰性と判定した。

RIF 1次テストで陽性ないし疑陽性と判定された CE 細胞について、ALV の存在の有無を調べるため、ALV フリーでしかも A および B 群ウイルスに対して感受性の細胞に培養液を接種し RIF 2次テストを実施した。

表2 供試鶏の RIF テストおよび中和抗体の検査

系 統	鶏番号	1次テスト(細胞の抵抗性)		2次テスト(ウイルスの分離)		R I F テス ト 判 定	中 和 抗 体	
		A ¹⁾	B ²⁾	A	B		A	B
G	1	0/16 ³⁾	0/16			-	+	-
	2	2/16	16/16	0/2	0/14	-	+	-
	3	2/20	0/20	0/2		-	NT ⁵⁾	NT
	4	2/22	1/22	0/1	0/1	-	-	-
	5	7/21	2/21	1/4	0/2	+(A) ⁴⁾	NT	NT
	6	1/21	0/21	0/1		-	NT	NT
	7	3/18	18/18	0/3	0/6	-	+	-
	8	2/20	1/20	0/2	0/1	-	NT	NT
	9	1/15	8/15	0/1	0/7	-	-	-
	10	1/25	2/25	0/1	0/2	-	+	-
	11	2/34	0/34	0/2		-	NT	NT
	12	5/24	1/24	2/5	0/1	+(A)	NT	NT
	13	3/36	8/36	0/3	0/6	-	NT	NT
	14	2/20	3/20	0/2	0/3	-	-	-
	15	0/22	3/22		0/3	-	NT	NT
	16	3/25	1/25	0/3	0/1	-	NT	NT
	17	1/18	0/18	0/1		-	+	-
O	1	2/25	1/28	0/2	0/1	-	NT	NT
	2	1/25	0/25	0/1		-	NT	NT
	3	2/20	20/20	0/2	0/10	-	NT	NT
	4	1/31	1/31	0/1	0/1	-	NT	NT
	5	0/24	0/24			-	+	-
	6	0/28	0/28			-	NT	NT
	7	0/18	1/18		0/1	-	-	-
I	1	10/30	9/38	1/5	0/3	+(A)	+	-
	2	10/45	10/45	1/8	0/6	+(A)	NT	NT
	3	5/47	9/47	0/4	0/8	-	-	-
	4	1/20	4/20	0/1	0/3	-	+	-
	5	1/15	0/15	0/1		-	+	-
	6	2/18	2/18	0/2	0/2	-	+	-
	7	2/20	0/20	0/2		-	-	-
	8	5/28	8/28	0/5		-	+	-
N	1	1/32	0/32	0/1		-	-	-
	2	7/23	0/23	0/7		-	+	-
	3	1/29	6/29	0/1	0/4	-	+	-
	4	10/18	0/18	5/5		+(A)	+	-
	5	0/23	0/23			-	NT	NT
	6	0/20	1/20		0/1	-	-	-
	7	0/15	0/15			-	NT	NT
	8	7/22	0/22	4/4		+(A)	NT	NT
	9	9/28	1/28	4/4	0/1	+(A)	+	-
	10	0/14	2/14		0/2	-	+	-

1) A群ウイルス 2) B群ウイルス 3) 分母は検査数, 分子は陽性数 4) A群ウイルス陽性 5) 検査せず

中和抗体検査: 中和試験は被検血清を原液または5倍希釈して2000 PFU/0.1 ml に調整した RSV (RAV-1) および RSV (RAV-2) と等量に混和し、36°C 1時間感作後AおよびB群ウイルスに感受性の2代継代細胞に0.1 ml あて2枚のシャーレに接種した。翌日寒天培地を重層して1週間培養後、フォーカス数をかぞえ、陰性血清対照の RSV のフォーカス数と比較し、その比によって判定を行なった。

成 績

1. 中和抗体の保有状況

導入された鶏は G, O, I および N 系で、合計雄 54 および雌 140 例であった。完全に RIF テストが終了した 42 例の母鶏の一部について、A および B 群ウイルスに対する抗体保有の状況を調べた成績は表 1 および 2 に示す通りであった。G 系では RIF テストの終わった 17 例中 8 例の母鶏で 5 例、O 系 7 例中 2 例の母鶏で 1 例、I 系 8 例中 7 例の母鶏で 5 例、N 系 10 例中 7 例の母鶏で 5 例が、A 群ウイルスに対する抗体を保有していたが、B 群ウイルスに対する抗体を保有している鶏は見出せなかった。

2. RIF テスト

RIF テストの成績は表 2 に示す通りで、A 群ウイルスに対して 42 例中 33 例 (78.6%) からの卵を用いた RIF 1 次テストで陽性を示し、系統別の検査卵では 3~56% に陽性が認められた。しかし培養液中からウイルスの確認された RIF 2 次テスト陽性は 7 例 (16.7%) のみであった。B 群ウイルスに対しては 42 例中 26 例 (61.9%) の卵を用いた RIF 1 次テストで陽性を示し、系統別の検査卵では 3~100% に認められたが、ウイルスの排泄している例はなかった。このうち G-2, G-7 および O-3 の卵は RSV (RAV-2) に対して 100% RIF 陽性であったが、ウイルス証明では陰性を示したことから、B 群ウイルスに対し遺伝的に抵抗性をもつ鶏 (C/B) であることがわかった。A 群ウイルスに対する遺伝的抵抗鶏 (C/A) は見出せなかった。なお A 群ウイルスに対し 20% 以上の卵で RIF 陽性を示す 8 例中 7 例 (87.5%) にウイルスを証明した。

ウイルス排泄と中和抗体の保有との関係を見ると、両検査を行なった 24 例中ウイルスを排泄している 3 例は全例抗体を有しており、またウイルスを排泄していない 21 例では、抗体の保有するものが 12 例認められた。ウイルス排泄例のうち I-1, N-4 および N-9 の 3 例では血清中に RSV (RAV-1) に対する中和抗体と同時に A 群ウイルスも検出された。

なお ALV 不在であることを確認したこれらの導入鶏の中に、老齢で殺処分された O-5, N-3 および I-5 の 3 例は内臓に腫瘍病変を認めた。これらの腫瘍病変部および肝について ALV の分離を試みたが、全例陰性であった。

3. 卵への ALV 移行

卵からの ALV の検出状況は図 1 に示す通りで、鶏によって異なっており、I-1 および I-2 では 25 および 27 日間に 11 および 15 個を検査し、わずかに 1 個のみがウイルス保有卵であった。いっぽう、N-4, N-8 および N-9 の鶏では 16 日から 30 日の間に 11・16 および 17 個検査し、このうち 3~4 個のウイルス保有物が見出された。

4. ALV 不在鶏群の維持

導入鶏から ALV 不在鶏を選抜し、その系統を繁殖して飼育した。系統は G および O 系で、陽圧式のウインドレス鶏舎にて飼育し、飼料および水は消毒したものを与えた。飼育鶏群の各世代ごとに中和試験あるいは RIF テストを行ない、ALV が不在かどうか検討した。その成績は表 3 に示す通りである。中和抗体の有無は RSV (RAV-1) および RSV (RAV-2) について、F₁ で 546,

表 3 ALV 不在鶏群の検査成績

検査年月	世代	検査数	検査方法 ¹⁾	
			中和抗体	RIF テスト
1972 年 2~10 月	F ₁	546	0/546 ²⁾	
1973 年 4~9 月	F ₂	939	0/939	0/86
1975 年 3~5 月	F ₃	245	0/245	0/198

¹⁾ 供試ウイルス: RSV (RAV-1) および RSV (RAV-2)

²⁾ 分母は検査数, 分子は陽性数

鶏番号	検査開始後日数																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
I-1	○	○		●	○						○	○							○	○				○	○	○				
I-2	○	○		○	○		●		○	○		○	○							○	○	○		○				○		
N-4	○	○		○	●	○	●		○		○		○	●	○	●														
N-8	○	○		○				○	●			○	●	○		○		●	○	○				○	○				○	
N-9	○	○	○		●		●				●	○	○		○	○	○	○	●		○		○	○				○		○

○ ウイルス分離陰性 ● ウイルス分離陽性

図 1 卵へのウイルスの排泄状況

F₂ で 939 および F₃ で 245 例検査したが、1 例も陽性例を認めなかった。また F₂ のものでは 86 例、F₃ のものでは G および O 系各 99 羽が 36 日間に産卵した 1689 および 1715 個計 3404 個の卵について、それぞれ RIF テストを行なったが、全例陰性の成績が得られた。

5. E 群ウイルスに対する感受性

RIF テストにより RSV (RAV-1) および RSV (RAV-2) に感受性を有する鶏の産出卵について、E 群ウイルスに対する感受性を検討した。いずれの系統のものも F₂ の卵が対象とされた。その成績は表 4 に示す通りである。系統ごとに 3~4 例検討しているが、検査 15 例中 10 例 (66.7%) が抵抗性、3 例 (20.0%) が感受性を示した。なお感受性と抵抗性の両性格を有するものが 2 例 (13.3%) 認められた。

表 4 A および B 群ウイルス感受性鶏の E 群ウイルスに対する感受性

系統	鶏番号	検査個数	感受性	抵抗性	判定
G	F ₂ -1	10	8	1	C/O ¹⁾
	2	5	0	5	C/E ²⁾
	3	6	6	0	C/O
	4	18	9	8	C/O-C/E
O	F ₂ -1	6	0	5	C/E
	2	6	1	3	C/E
	3	9	9	0	C/O
	4	4	0	4	C/E
I	F ₂ -1	6	0	6	C/E
	2	18	0	18	C/E
	3	7	0	7	C/E
N	F ₂ -1	4	0	4	C/E
	2	3	0	3	C/E
	3	7	0	7	C/E
	4	7	4	3	C/O-C/E

¹⁾ A, B および E 群ウイルスに感受性

²⁾ A および B 群ウイルスに感受性, E 群ウイルスに抵抗性

6. ALV に対する G および O 系鶏の感受性

A および B 群の ALV に対し感受性を有する G および O 系の鶏を用い、RSV (RAV-1) を感染させ、その発病と死亡状況について検討が加えられた。RSV (RAV-1) の 200 PFU を 30 日齢の鶏 20 例の翼膜下に接種し、

表 5 A および B 群ウイルス感受性鶏の RSV (RAV-1) 感染に対する感受性

系統	供試数	転 帰		χ ² 検定
		死亡 (%)	回復 (%)	
G	20	3 (15.0)	17 (85.0)	12.76 ¹⁾
O	20	15 (75.0)	5 (25.0)	

¹⁾ 0.1% の危険率で有意差あり

30 日間観察を行なった。その成績は表 5 に示す通りである。G 系では観察期間中 3 例 (15.0%)、また O 系では 15 例 (75.0%) が死亡したが、その他の鶏では腫瘍を発現しないか、あるいは発現しても回復した。O 系の鶏は G 系のものよりも RSV (RAV-1) に対し感受性が強かった。

考 察

今回の検査において、導入鶏の ALV に対する中和抗体を検討したところ、A 群ウイルスに対する抗体は認められたが、B 群ウイルスに対する抗体は検出できなかった。これは導入鶏が純系という形で維持されてきたことにもよるが、水野ら⁵⁾ および日原ら³⁾ が報告しているように B 群ウイルスは鶏体内での増殖が A 群ウイルスよりも悪いため、感染をおこす機会が少ないことによると考えられる。

導入鶏の遺伝的感受性を検討したところ、A および B 群ウイルス感受性鶏が大部分で、C/B と考えられる鶏は 3 例見出されたのみであった。また C/A の鶏は見出せなかった。C/A 鶏は検査鶏群の 1~2% にしか存在しないという CALNEK²⁾ および清水ら⁹⁾ の報告から考えると、今回検査した系統の中にも C/A 鶏が存在するとしてもきわめて少ないので、もう少し例数をふやして検討すれば見出せたかも知れない。

A および B 群ウイルス感受性鶏の E 群ウイルスに対する遺伝的感受性は 20.0% が感受性、66.7% が抵抗性、また両方の性質を有するものが 13.3% 見出され、抵抗性のものが多かった。

次に RIF 1 次テストにおいて RSV (RAV-1) に対し 20% 以上の陽性率を示した 8 例中 1 例を除きウイルス排泄鶏であったこと、および C/A 鶏が少ないことを考えると、とくに C/A 鶏の検出を目的としたものでない場合 20% をこえる陽性率を示した鶏は、その段階で淘汰した方が開発研究の進行上有利と考えられる。

ALV 不在鶏を検討するための RIF テストを行なう際には、移行抗体の有するひなを選択的に行なう方が、ひなへの抗体移行がおこるため、初生時の水平感染を防御する意味からよいとされている。しかし今回著者らが行なった方法は経済性も考慮しなければならなかったため、中和抗体の有無は別にして、産卵のよいものを対象として選択した。供試鶏の中で ALV 感染例は全例抗体の産出が認められた。また検査した例の中に血清中に抗体を保有しながら、卵へウイルスの排泄している鶏が見出された。このような例のあることはすでに RUBIN ら⁷⁾ も報告している。今回の例のうち 3 例のものは血清中に中和抗体と同時に RSV (RAV-1) 感染に干渉を与える A 群ウイルスも見出された。このことは中和抗体を産生させたウイルスと血清中から分離されたウイルスとが同じ

抗原性を有するものではないと考えられ、これは ALV の重感染を示すものかも知れない。またこの場合、抗体がひなへ移行されたとしても、このようなウイルスは移行抗体に中和されず、このためひなの間では水平感染のおこる可能性があろう。

検査鶏の中に中和抗体陽性、RIF テスト陰性鶏でありながら、殺処分時の剖検で腫瘍病変の認められたものがあったが、この原因については不明である。

ALV の卵への排泄は 10 個連続調査すれば確実に検出できるとされている。今回の例では 10 個中 1~4 個のウイルス保有卵を認めたものが多かったが、2 例では 11 および 15 個に 1 個ときわめて排泄頻度の少ない例が認められた。このことは検査する卵の数を 15 個以上にふやす必要のあることを示唆している。

ALV の病原性は鶏の系統により差のあることが BURMESTER^らにより報告されているが、今回の ALV 不在鶏として確立された G および O 系の RSV (RAV-1) に対する発病抵抗性を検討したところ有意差があり、O 系の方が感受性が高かった。O 系の鶏は ALV の実験に使用できるものと考えられる。

結 論

ALV 不在鶏群の作出を目的に 4 系統の鶏を導入し、RIF テストで選抜を行なった。その結果、次のような成績が得られた。

- 1) 導入鶏 140 例中 RIF テストを終了した鶏は 42 例で、このうち 35 例 (83.3%) が ALV 不在鶏であった。C/B 鶏 3 例 (7.1%) のほかは全例 A および B 群ウイルス感受性鶏で、C/A 鶏は見出せなかった。
- 2) 中和抗体は A 群ウイルスに対して 24 例中 16 例

に認められたが、B 群ウイルスに対する抗体陽性例は検出できなかった。

- 3) A および B 群ウイルス感受性鶏における E 群ウイルスに対する遺伝的感受性をみたところ、感受性 20.0%、抵抗性 66.7% および両方の性質を有するもの 13.3% であった。

- 4) ALV 不在鶏群の作出には連続産卵した 15 個以上の卵を検査する必要がある。

- 5) RIF テストによる鶏の選抜と隔離鶏舎飼育で ALV 不在鶏の作出とその鶏群の維持ができた。

本論文の要旨は第 76 回日本獣医学会に報告した。

摺筆に当たり終始ご指導いただいた農林省家畜衛生試験場清水武彦部長ならびに E 群ウイルスに対する感受性を検査していただいた長崎大学医学部 宮本 勉教授に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) BURMESTER, B.R., FONTES, A.K., WATERS, N. F., BRYAN, W.R. and GROUPE, V.: *Poult. Sci.*, 39, 199~215 (1960).
- 2) CALNEK, B. W.: *Avian Dis.*, 12, 104~111 (1969).
- 3) 日原 宏, 石崎良太郎, 水野善夫, 清水武彦: 農林省家畜衛生試験場報告 No. 61, 1~8 (1970).
- 4) HUGHE, W.F., WATANABE, D.H.: *Avian Dis.*, 7, 154~165 (1963).
- 5) 水野善夫, 湯浅 豊, 日原 宏, 石崎良太郎, 清水武彦: 農林省家畜衛生試験場報告 No. 60, 1~5 (1970).
- 6) RUBIN, H.: *Virology*, 10, 29~49 (1960).
- 7) RUBIN, H., FANSHIER, A., CORNELIUS, A. and HUGHES, W.F.: *Virology*, 17, 143~156 (1962).
- 8) 清水武彦, 石崎良太郎, 日原 宏, 水野善夫, 佐沢弘士, 杉森 正: 農林省家畜衛生試験場報告 No. 57, 9~15 (1968).
- 9) WATERS, N. F. and PRICKEIT, C. O.: *Poult. Sci.*, 23, 321~333 (1944).

《日 獣 の 図 書 案 内》

技術の手引き 11 農林省畜産局衛生課 共同監修
農林省家畜衛生試験場

家畜衛生に必要な—— 免 疫 の 概 念 と 術 式

農林省家畜衛生試験場 大木与志雄, ほか 7 氏の研究者執筆

A 5 版上製 180 頁 図版多数

定 価 1,400 円 (送料 160 円)

内容項目: 第 1 章 免疫概論—免疫 抗体 抗原 抗原抗体反応 抗体の産生 補体 過敏症 同種免疫と疾病 自己免疫病 第 2 章 血清反応—免疫血清の作製 抗体精製 濃縮 凝集反応 ウイルス凝集反応 沈降反応 免疫拡散法 免疫粘着現象 C/F 螢光抗体法 放射性同位元素標識抗体法 第 3 章 生体内における免疫反応—食食現象 抗体産生細胞の測定法 感染防御試験と中和試験 過敏症の実験法 参考書 索引

社団法人 日 本 獣 医 師 会

東京都港区南青山 7-2-10 (〒107)
電話 東京 (03) 406-5271 (代)
郵便振替口座 東京 6-68304 番