

オカメインコ幼雛に対するオウム嘴羽病ウイルスの病原性

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
巻/号	647
掲載ページ	p. 549-553
発行年月	2011年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



オカメインコ幼雛に対するオウム嘴羽病ウイルスの病原性

板橋知子 佐々木 淳 倉持 好 御領政信[†]

岩手大学農学部 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

(2010年11月12日受付・2011年3月10日受理)

要 約

オカメインコにおける甚急性型オウム嘴羽病 (Pbfd) の作出を目的として、Pbfdウイルス (PbfdV) 接種実験を行った。PbfdV抗体フリーのオカメインコの幼雛 (1~7日齢) 5羽にウイルス乳剤を筋肉内接種し、接種後1, 3, 4, 6, 10週に剖検、全身諸臓器の病理組織学的検索を行った。また、剖検時に採取した組織を用いて、PCR法による病因学的検索を行った。接種後3週以降の症例でPbfdVの感染が成立していることが確認されたが、発症時期や病理組織学的検索結果は甚急性型Pbfdよりも急性型Pbfdの特徴と一致した。これらのことから、孵化間もないオカメインコ幼雛がPbfdVに感染しても急性型Pbfdを発症し、甚急性型の実験的再現は難しいことが明らかになった。

——キーワード：オカメインコ、オウム嘴羽病、接種実験。

日獣会誌 64, 549~553 (2011)

オウム嘴羽病 (psittacine beak and feather disease : Pbfd) は *Circoviridae* に属するオウム嘴羽病ウイルス (PbfdV) に起因する感染症であり [1-3]、発病した鳥は羽及び嘴に壊死性病変を起こす [1, 2, 4-6]。Pbfdの臨床疾患のタイプは、症状及び病理像から、甚急性型、急性型、慢性型の3つに分類されるが、これらはウイルスの暴露経路、感染ウイルスの力価、そしてウイルスに暴露されたときの個体の状態に影響されると考えられている。また、鳥種によっても臨床症状の発現様式が大きく異なることが知られている [1, 7, 8]。著者らは今までにコキサカオウムにみられたオウム嘴羽病に関する報告 [9]、さらに、オカメインコにおける接種実験 [10] を行ってきた。一方、オカメインコではPbfdV遺伝子は検出されなかったという報告 [11] もなされている。そこで、本研究ではオカメインコにおける甚急性型の作出を目的として、オカメインコ幼雛におけるPbfdV接種実験を行った。

材料及び方法

Pbfd罹患コキサカオウム [9] より採材した皮膚及び羽から作製した20%乳剤0.3mlを、PbfdV抗体フリーのオカメインコ (*Nymphicus hollandicus*) の幼雛5羽に、孵化後1~7日の間に大腿部筋肉内及び胸筋内接種した (表1)。接種後1, 3, 4, 6, 10週に剖検し、全

身諸臓器を採材した。羽はブアン固定、その他の組織・臓器は10%ホルマリン固定を行い、常法に従いパラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) を施し鏡検した。また、ウイルス粒子の形態観察を目的とし、ホルマリン固定後の羽軸を1mmに細切、PBSで洗浄後、5%グルタルアルデヒドによる前固定、1%オスミウム酸による後固定を行い、常法に従い脱水・透徹、エポン樹脂包埋、超薄切片作製後、酢酸ウラニル・クエン酸鉛による二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (H-800, (株)日立ハイテクノロジー、東京) にて観察した。さらにPbfdV特異的塩基配列を検出するため、病理解剖時に採材した羽、脾臓、肝臓、腎臓、胸腺、ファブリキウス嚢 (F嚢) について、5'-TGGTACAAGGAGGACTGTGAC-3' (878-898) 及び5'-CCAGCACTTAATAAACACTCAG-3' (1224-1245) をプライマーとしたPCR法 [13] による病因学的検索

表1 実験群の設定及び臨床所見

鳥No.	接種日齢	観察期間	臨床所見
1	5日齢	1週間	著変なし
2	4日齢	3週間	著変なし
3	3日齢	4週間	体幹部の羽の脱落
4	7日齢	6週間	全身の羽の脱落, 食欲低下
5	1日齢	10週間	持続的な羽の脱落, 食欲低下

[†] 連絡責任者：御領政信 (岩手大学農学部獣医病理学研究室)

〒020-8550 盛岡市上田3-18-8 ☎019-621-6217 FAX 019-621-6274 E-mail : goryo@iwate-u.ac.jp



図1 接種後5週 (No. 5)
ほぼ全身の羽が脱落し、新しい羽軸の出現が認められる。

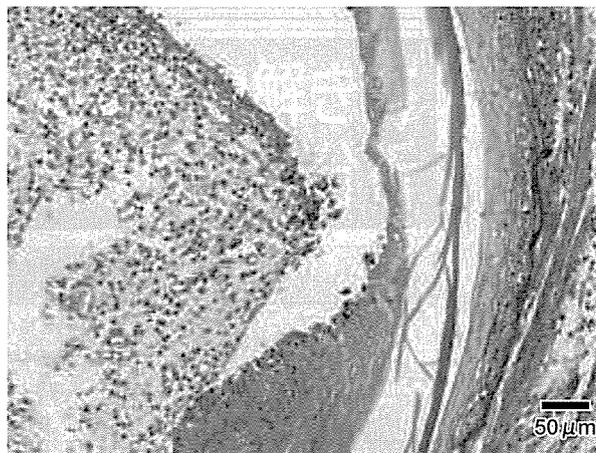


図3 接種後4週 (No. 3), 羽軸 (HE染色 中拡大)
羽髄への炎症細胞浸潤, 羽上皮細胞の壊死が認められる。

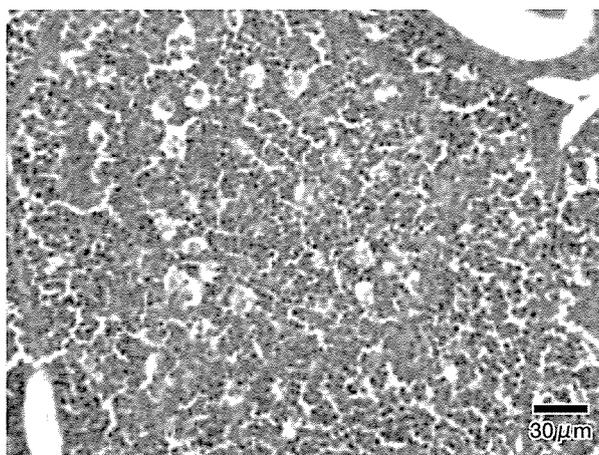


図2 接種後3週 (No. 3), ファブリキウス囊 (HE染色 中拡大)
皮質領域において散在性に星空像が認められる。

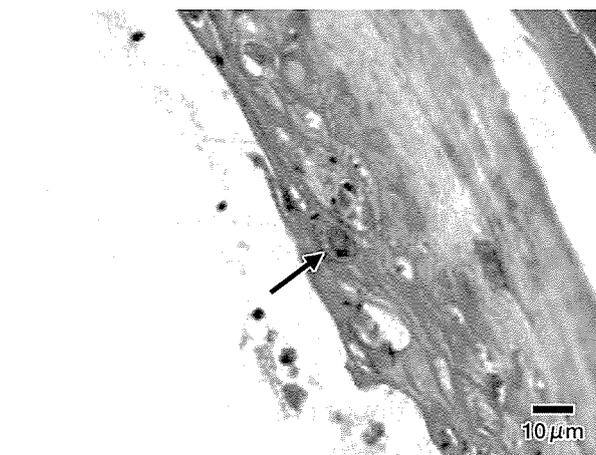


図4 接種後4週 (No. 3) 羽軸 (強拡大)
羽髄大食細胞における好塩基性細胞質内封入体 (矢印)。

を行った。なお、実験は岩手大学動物実験委員会の承認を得て実施され、鳥は炭酸ガス殺後に剖検に供した。

成 績

臨床所見：No. 3から5は接種後4週から徐々に羽が抜け始め、羽軸の屈曲、壊死、出血が認められた。No. 3及び5は接種後5週にはほぼ全身の羽が脱落し、一時的に食欲が低下した(図1)。その後、5週後半からふたたび食欲が回復し、続いて新しい筆毛が成長してきた。新しい筆毛は、はじめは正常に成長したが、やがてその一部が前回の脱羽時と同様の異常を示して脱落するようになった。この徴候は、接種後10週に剖検するまで継続して認められた(表1)。

剖検所見：接種後1及び3週 (No. 1及び2) では、肉眼的に著変は認められなかった。接種後4, 6及び10週 (No. 3～5) では、羽軸の屈曲、壊死、出血、羽鞘の狭

窄が認められたのみであった。

病理組織学的所見：接種後3, 4, 6及び10週の胸腺では皮質領域に、F囊では髓質領域において軽度のリンパ球の壊死・脱落が観察され、星空像を呈していた(図2)。接種後3, 4及び6週では、全例の羽に大食細胞をはじめ偽好酸球、リンパ球、形質細胞の羽髄内への浸潤が軽重さまざまな程度で認められた(図3)。接種後10週では、一部の羽に同様の変化が認められた。接種後3, 4, 6及び10週の羽の羽髄大食細胞には好塩基性細胞質内封入体がみられ(図4)、羽上皮細胞には好塩基性核内封入体が観察された(図5)。羽髄の大食細胞における細胞質内封入体は接種後3及び4週ではあまり観察されず、接種後6及び10週で頻繁に観察された。羽上皮細胞における核内封入体は接種後3及び4週で頻繁に観察されたが、接種後6及び10週では頻度が低下した。全例において、脾臓、肝臓及び腎臓に著変は認められな

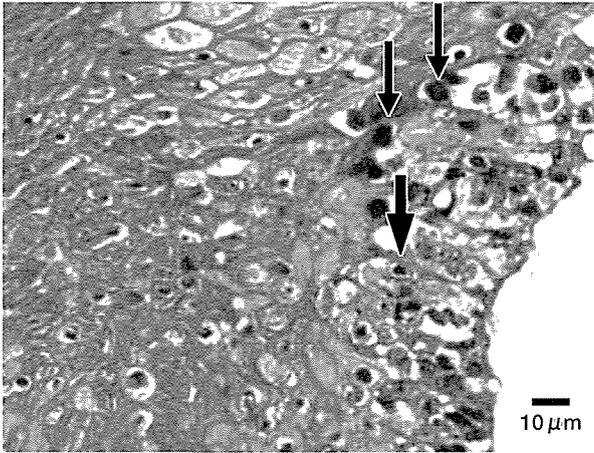


図5 接種後4週 (No. 3), 羽軸 (HE染色 強拡大).
羽上皮細胞における好塩基性核内封入体 (矢印).

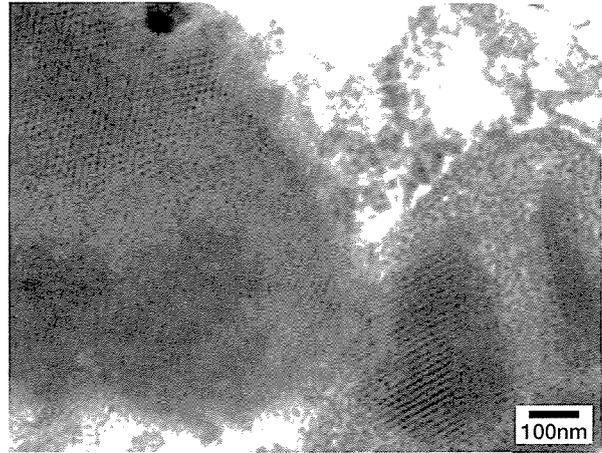


図6 接種後4週 (No. 3), マクロファージ内核内封入体.
酢酸ウラニル, クエン酸鉛二重染色.
直径約17nmのウイルス粒子が格子状・結晶状に配列している.

表2 組織学的所見

鳥No. (剖検週齢)	胸腺	F 囊	皮膚
No. 1 (1週目)	—	—	—
No. 2 (3週目)	皮質におけるリンパ球の壊死・脱落, 星空像	髄質におけるリンパ球の壊死・脱落, 星空像	羽上皮細胞にまれに核内封入体
No. 3 (4週目)	同上	同上	羽軸の出血・壊死, 羽軸へ炎症細胞の浸潤, 核内封入体の形成, 細胞質内封入体はまれ(27)*
No. 4 (6週目)	同上	同上	同上 (30)*
No. 5 (10週目)	同上	同上	同上 (33)*

— : 病変なし

*カッコ内は初めて脱羽が観察された日齢

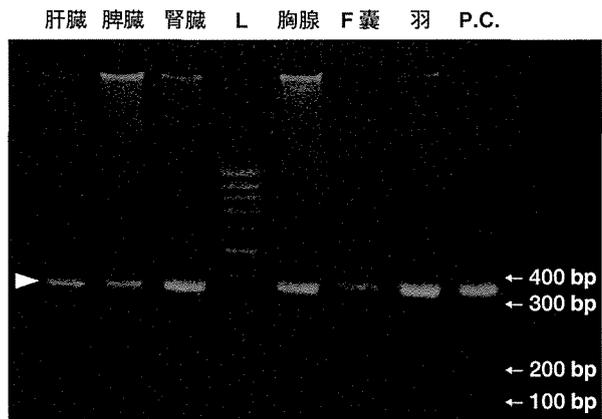


図7 PCR成績. 接種後10週 (No. 5)
採材した全臓器において368bpのバンド (矢頭) が観察される.
L : Stable 100 bp DNA Ladder (SIGMA Genosys Japan社)
P. C. : 陽性対照

った (表2).

電子顕微鏡所見: 接種後3及び4週の羽上皮細胞の核内封入体, 4, 6及び10週の羽髓の大食細胞の細胞質内封入体に一致して, 直径約17nmのウイルス粒子の格子状あるいは結晶状配列が観察された (図6).

PCR法成績: 接種後3週以降の胸腺と羽, 4週以降のF囊, 3, 6及び10週の肝臓から, PBFDVの遺伝子が検出された (表3, 図7).

考 察

PBFDは臨床症状から, 初生雛にみられる甚急性型, 新生綿羽が抜けた後最初の羽毛発育時にみられる急性型, 換羽期ごとに発育羽毛の異常が進行性に出現する慢

表3 PCR法成績

鳥No. (剖検週齢)	脾臓	肝臓	腎臓	F囊	胸腺	皮膚
No. 1 (1週目)	※	-	-	-	-	-
No. 2 (3週目)	※	+	-	-	+	+
No. 3 (4週目)	※	-	-	+	+	+
No. 4 (6週目)	+	+	+	+	+	+
No. 5 (10週目)	+	+	+	+	+	+

※: 採材せず, +: 368bpのバンドが検出された

-: バンドは検出されなかった

性型に分類される [1, 7, 8]. 症状の程度は, 感染時期や鳥種, ウイルス量などによって左右され, 若齢であるほど重篤な症状を示すことが知られている [1, 7, 8, 14]. 今回目的としていた甚急性型PBFDは, 肺炎や腸

炎, 急激な体重の減少がおもな臨床徴候で, 病鳥は羽の異常を発現する前に死亡する. 組織学的変化は羽上皮細胞の水腫とF囊及び胸腺の重度の壊死に限られる [8]. しかし, 本実験では全例においてこのような徴候は認められず, 甚急性型Pbfdを発症した症例は得られなかった. 今回の実験群で最初に羽の脱落が観察されたのは27~33日齢で, 新生綿羽が抜けて最初の新しい羽が発育する時期であった. また, 組織学的には羽髄への炎症性細胞浸潤, 羽上皮細胞における好塩基性核内封入体並びに大食細胞における好塩基性細胞質内封入体が観察された. これらの所見は急性型Pbfdの特徴 [1, 7, 8] と一致することから, 孵化直後のオカメインコ幼雛におけるPbfdV感染では急性型Pbfdを発症し, 甚急性型Pbfdの作出は困難であることが示唆された.

PbfdVは羽並びに羽包において上皮向性であり, 上皮基底層の複製中の細胞を標的とすることが示唆されている [15]. 細胞質内封入体はこのような感染上皮細胞に由来し, ウイルスを含む感染細胞の残骸を貪食した大食細胞内で最大サイズに達すると考えられている [8, 15]. 本研究でも初めて封入体の形成が確認された接種後3週では, そのほとんどが羽上皮細胞に認められ, その後経時的に羽上皮細胞における封入体検出頻度が減少するとともに大食細胞における封入体検出頻度が増加した. 最も観察期間が長かった個体 (No. 5, 接種後10週) では, 羽上皮細胞に封入体はほとんど観察されなかった. どの封入体にも, 電子顕微鏡学的検索によって直径約17nmのウイルス粒子の格子状, 結晶状あるいは渦巻状配列が認められ, これらの所見は過去の報告 [15-17] と一致していた. このように封入体形成の場が経時的に羽上皮細胞から大食細胞へと遷移していることを伺わせる所見は, 上記の説を支持するものと考えられた. しかし, 骨髄内の大食細胞や循環血中の単球内でウイルス抗原が検出されることから, これらの細胞が直接感染する可能性も示唆されており [8, 15], 詳細についてはさらなる研究が待たれる.

Pbfdは一旦罹患するとウイルスを体内から完全に排除するような根本的治療はなく, 二次感染に対する対症療法による延命が行われるのみである. ワクチンの研究・開発も試みられているが, 現時点での予防法は感染鳥の隔離が主体となっている. 今後はPbfdの防遏を最終目的として, 感染実験による発病再現系の確立, ウイルス培養系の確立が望まれるところである.

引用文献

[1] Gerlach H : Viruses, Avian Medicine : Principles and Application, Ritchie BW, et al eds, 862-948, Wingers Publishing, Florida (1994)

[2] Raidal SR, Cross GM : Acute necrotizing hepatitis caused by experimental infection with psittacine beak and feather disease virus, J Avian Med Surg, 9, 36-40 (1995)

[3] 真田直子, 真田靖幸 : コバタンにみられた「オウム類嘴一羽毛病」, 日獣会誌, 49, 551-555 (1996)

[4] Jacobson ER, Clubb S, Simpson C, Walsh M, Lothrop Jr. CD, Gaskin J, Bauer J, Hines S, Kollias GV, Poulos P, Harrison G : Feather and beak dystrophy and necrosis in cockatoos : Clinicopathologic evaluations, J Am Vet Med Assoc, 189, 999-1005 (1986)

[5] Ritchie BW, Niagro FD, Latimer KS, Steffens WL, Pesti D, Ancona J, Lukert PD : Routes and prevalence of shedding of psittacine beak and feather disease virus, Am J Vet Res, 52, 1804-1809 (1991)

[6] Sanada N, Sanada Y : The sensitivities of various erythrocytes in a haemagglutination assay for the detection of psittacine beak and feather disease virus, J Vet Med B, 47, 441-443 (2000)

[7] Phalen DN : Viruses, Avian Medicine and Surgery, Altman RB; et al eds, 281-322, WB Saunders, Philadelphia (1997)

[8] Ritchie BW : Circoviridae, Avian Viruses : Function and Control, Ritchie BW ed, 223-252, Weingers Publishing, Florida (1995)

[9] 中田朱美, 御領政信, 岡田幸助 : コキサカオウムにみられたオウム嘴羽病, 日獣会誌, 56, 459-463 (2003)

[10] 永瀬千佳, 御領政信, 岡田幸助 : オウム嘴羽病ウイルス接種オカメインコ幼雛における病理学的研究, 日獣会誌, 58, 547-550 (2005)

[11] 真田直子, 真田靖幸 : わが国におけるオウム嘴羽病の疫学調査, 日獣会誌, 60, 61-65 (2007)

[12] Pass DA, Perry RA : The pathology of psittacine beak and feather disease, Aust Vet J, 61, 69-74 (1984)

[13] Bassami MR, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR : Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circovirus, and chicken anemia virus, Virology, 249, 453-459 (1998)

[14] Wylie SL, Pass DA : Experimental reproduction of psittacine beak and feather disease/French Molt, Avian Pathol, 16, 269-281 (1987)

[15] Latimer KS, Rakich PM, Steffens WL, Kircher IM, Ritchie BW, Niagro FD, Lukert PD : A novel DNA virus associated with feather inclusions in psittacine beak and feather disease, Vet Pathol, 28, 300-304 (1991)

[16] Kiatipattanasakul-Banlunara W, Tantileartcharoen R, Katayama K, Suzuki K, Lekdumrogsak T, Nakayama H, Doi K : Psittacine beak and feather disease in three captive Sulphur-Crested Cockatoos (*Cacatua galerita*) in Thailand, J Vet Med Sci, 64, 527-529 (2002)

[17] Sanada Y, Sanada N, Kubo M : Electron microscopical observations of psittacine beak and feather disease virus in an Umbrella cockatoo (*Cacatua alba*), J Vet Med Sci, 61, 1063-1065 (1999)

Pathogenicity of Psittacine Beak and Feather Disease Virus
in Newly Hatched Cockatiels

Tomoko ITAHASHI*, Jun SASAKI, Konomi KURAMOCHI and Masanobu GORYO†

* Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda 3-18-8, Morioka, 020-8550, Japan

SUMMARY

An experimental inoculation of Psittacine beak and feather disease (PBFD) virus (PBFDV) was implemented to reproduce the peracute form of PBFD. Five newly hatched cockatiels free of PBFDV antibodies were inoculated intramuscularly with the viral emulsion, and investigated histopathologically at 1, 3, 4, 6, and 10 weeks after inoculation. Also, etiological examination with PCR analysis of tissues from various organs was performed. Although the results of PCR showed that infection with PBFDV was established after three weeks, the clinical signs and histopathology were consistent with those of acute PBFD rather than those of peracute PBFD. These results suggest that newly hatched cockatiels infected with PBFDV showed the acute form of PBFD, and that experimental reproduction of the peracute form may be difficult.

—Key words : cockatiel, psittacine beak and feather disease, experimental inoculation.

† Correspondence to : Masanobu GORYO (Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Iwate University)
Ueda 3-18-8, Morioka, 020-8550 Japan

TEL 019-621-6217 FAX 019-621-6274 E-mail : goryo@iwate-u.ac.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 549 ~ 553 (2011)