

ブロイラーのファブリキウス嚢萎縮の実態ならびに萎縮要因の検索

小西 豊・高瀬公三[†]・山崎憲一^{*1}・平良和代^{*2}・高江行一^{*2}

(家畜微生物学研究室, ¹財・化学及血清療法研究所, ²株・ジャパンファーム)

平成15年8月10日 受理

要 約

あるブロイラー農場の雛を対象に、導入時から出荷時まで毎週、ファブリキウス嚢 (F嚢) 萎縮の実態を調査した。F嚢は3週齢までは隔離したブロイラーと同じように発達し大きくなったが、4週齢以降急速に萎縮した。これらのF嚢を間接蛍光抗体法で観察したところ、4週齢において伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) 抗原が検出され、F嚢萎縮の要因の一つにIBDVが考えられた。病理組織学的検査においても、4週齢雛のF嚢にはIBDV感染によると思われるリンパ球の変性・壊死病変がみられ、それ以降の日齢では結合組織の増生が観察された。次に、IBDVに対する高度免疫血清を静脈内に注入し作製された受動免疫おとり鶏を農場に搬入し、ブロイラーと共に飼育することで、IBDV以外のF嚢萎縮要因の捕捉を試みた。この受動免疫雛の一部にF嚢萎縮を認めたが、その萎縮したF嚢をSPF鶏に経口投与してもF嚢萎縮は再現されなかった。

キーワード：ファブリキウス嚢，萎縮，ブロイラー，伝染性ファブリキウス嚢病

緒 言

B細胞産生の器官として重要なリンパ系組織の一つであるファブリキウス嚢 (F嚢) は、60～70日齢まで発達を続け、レイヤーで4g、ブロイラーで5g程度に大きくなり、その後急速に生理的に萎縮する。しかし、この生理的な萎縮の前に、感染症などの障害を受けるとF嚢は萎縮し、免疫抑制の状態に陥る。この障害の要因にはマレック病、大腸菌感染症、鶏貧血ウイルス感染症あるいはレオウイルス感染症などもあるが、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) 感染が最も重要な要因と考えられている [1, 2, 6]。このIBDV感染が早期であればあるほど免疫機能への障害は大きく、雛は重度の免疫抑制状態になる。IBDVの早期感染を防御しF嚢を正常に発達させるために、雛に高い移行抗体を与えることは効果的であり、今日ではそのための種鶏へのIBD免疫が積極的に行われている。また雛の移行抗体が消失する時期には生ワクチンが雛に投与

され、免疫によるIBDV感染対策が盛んに行われている [5, 7]。ところが、このようなIBDV感染対策が行われているにもかかわらず、農場の雛のF嚢は1ヵ月齢時には萎縮してしまっているのが実状である。このような早期のF嚢萎縮は雛の免疫機能に影響を与え、その育成成績を低下させていることが予想される。著者等はあるブロイラー農場において、F嚢萎縮の実態を調査し萎縮要因の究明を試みた。

材料および方法

1. ブロイラー農場

鹿児島県内のある大型ウインドウレス型のブロイラー農場の1鶏舎を使用した。この農場には4鶏舎あり、各鶏舎は縦90m、横9mで、中央がフェンスで仕切られている。入り口側に雌雛1万羽、また奥側には雄雛1万羽がそれぞれ同時に入雛、飼育され、雌雛は42～45日齢で出荷され、その後中央フェンス

[†] : 連絡責任者：高瀬公三(鹿児島大学農学部獣医学科家畜微生物学研究室, Tel : 099-285-8724, E-mail: ktakase@vet.agri.kagoshima-u.ac.jp)

^{*1} 〒860 - 8568 熊本市大窪一丁目6 - 1

^{*2} 〒899 - 8313 鹿児島県曽於郡大崎町野方3887

が取り除かれ、52～55日齢での出荷まで雄雛の飼育面積は2倍になる。鶏舎はおよそ20ルクスの明るさで、給餌は2列の自動給餌ラインで不断給餌し、また飲水は5列のニップル式給水装置で行われている。飼育管理者は毎日2回鶏舎内に入り、鶏群の状態を管理している。

ワクチンプログラムは、孵化場においてマレック病および鶏痘の生ワクチンが、また伝染性気管支炎 (IB) およびニューカッスル病 (ND) の生ワクチンが、それぞれ皮下あるいはスプレーで投与されている。農場に導入後、10日齢に IB 生ワクチンがスプレーで、15日齢で ND 及び IBD 生ワクチンが飲水で、21日齢に IBD 生ワクチンが飲水で、さらに28日齢に ND および IBD 生ワクチンが共に飲水で投与されている。

2. 受動免疫おとり鶏

(財)化学及血清療法研究所(熊本市)由来の特定病原体不在 (SPF) 2 週齢雛の静脈内に、市販の IBD 不活化ワクチンを注射して得た高度免疫鶏血清 (IBDV・K 株を用いた中和試験での抗体価が16,000倍) を3週齢の SPF ヒナの静脈内に0.2ml/羽宛投与し、受動免疫ヒナを作出した。この受動免疫ヒナは、免疫血清投与翌日の血中 IBDV 中和抗体価が平均1,024倍であり、その7日後のそれは121倍を示した。

3. 間接蛍光抗体法による抗原検索

採取した F 嚢を0.5×0.5cm の大きさにし短冊状のろ紙にのせた後、冷ヘキサソ (ナカライテスク) に浸して急速に凍結した。凍結した F 嚢は凍結切片作製時まで-80℃に密封保存された。クリオスタット (ブライト) を使用して作成された凍結切片はスライドガラス上にアセトンで固定され、使用時まで-20℃に密封保存された。染色用一次反応血清には当該試験ブロイラー鶏群の出荷前7週齢時プール血清 (10羽分) および別途 SPF 鶏にて作成した IBD 特異抗血清を、共にリン酸緩衝食塩液で50倍に希釈後使用し、二次反応血清には市販の fluorescein-isothiocyanate (FITC) 標識抗鶏 IgG 家兔抗体 (コスモ・バイオ) を使用した。各反応は37℃、45分間湿箱で行い、洗浄後 Gel/Mount (コスモ・バイオ) で封入し、落射式蛍光顕微鏡 (ニコン) により特異蛍光の有無を観察した。

4. 病理組織学的検査

採取した F 嚢を10%ホルマリンで固定し、定法に従って包埋、薄切およびヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、顕微鏡で観察した。

5. 中和抗体価測定

IBD 中和抗体を血清希釈法で測定した。中和用ウイルスには IBD V・K 株を、培養細胞には鶏胚線維芽細胞を用い、96穴マイクロプレート上で行った。被検血清は測定前に非働化处理され、イーグル MEM 培地で2倍階段希釈された。これに200TCID₅₀/0.1ml に調整された IBD V を等量ずつ混和し、5℃、12時間中和した。これの50μl を定法により200万個/ml の濃度に調整され96穴マイクロプレート上に播種された鶏胚線維芽細胞浮遊液に接種し、5%CO₂存在孵卵機内で培養した。培養5日後に細胞変性効果 (CPE) を観察し、定法に従い抗体価を算出した。



Photo. 1. Inside the broiler house where the sentinel birds were kept in a cage (arrow). (A: Sentinel birds in a cage located in broiler house)

6. 実験1：ブロイラー F 嚢の経時的観察

ブロイラー雛の F 嚢萎縮の実態を調査するため、試験鶏舎に導入された雛から、毎週無作為に選抜された11羽ずつを実験室内に搬入し、採血、体重測定、剖検ならびに F 嚢重量の測定を実施した。F 嚢についてはさらに、病理組織学的観察および蛍光抗体法による観察のため一部を採取した。比較のために、別途ブロイラー雛を実験室内で飼育し、農場ブロイラー雛と同様な項目を測定した。なお、F 嚢は、(F 嚢重量/体重)×100によって F 嚢体重比を算出し比較した。血液からは血清を分離し、IBD V に対

する中和抗体価を測定した。

7. 実験2：受動免疫おとり鶏のF囊の観察

IBD 受動免疫おとり雛を、40日齢以上のブロイラーが飼育されている12農場の鶏舎に、各々9～13羽ずつおとり鶏として導入し、農場の通常プログラムに沿って7日間飼育した。この間IBD 受動免疫雛はブロイラーと同じ病原体に感染するように網で囲われたケージ内で飼育された (Photo. 1)。農場導入後7日目に当研究室に搬入し、体重測定、採血、さらに剖検したのちF囊を取り出し、その重量を測定した。F囊重量を前述のように体重比に換算し、この値が0.25未満の場合をF囊萎縮と判断し、その材料をさらに4週齢のSPF鶏に投与しF囊萎縮の再現を試みた。

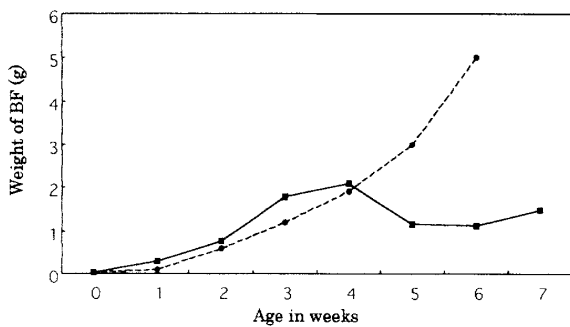


Fig. 1. Weight of BF of broiler chickens (—■— broiler chickens in a farm, —●— broiler chickens in an isolator)

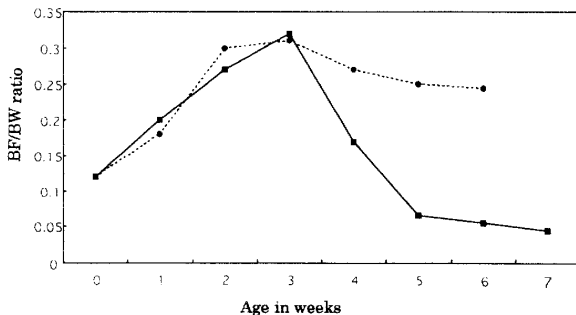


Fig. 2. BF/BW ratio of broiler chickens (—■— broiler chickens in a farm, —●— broiler chickens in an isolator)

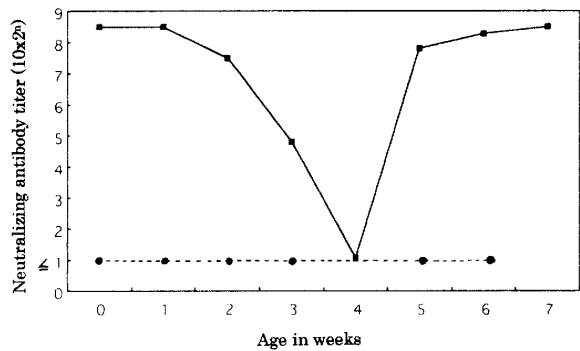


Fig. 3. Neutralizing antibody titers of broiler chickens (—■— broiler chickens in a farm, —●— broiler chickens in an isolator)

結 果

1. ブロイラー F 囊の経時的観察 (実験 1)

1) F 囊重量

農場で今回調査対象となったブロイラー群の育成成績 (出荷成績) は、農場管理者の記録によれば通常の範囲内にあり、また雛の導入から出荷まで問題となる疾病の発生もなかった。このような中で、搬入されたブロイラー雛の体重は順調に増加したものの、F 囊重量は Fig. 1 に示すように、4 週齢で増加はわずかとなり、5 週齢では明らかに萎縮した。また Fig. 2 に示すように、F 囊体重比は 3 週齢まで実験室内で隔離飼育した群とはほぼ同じように上昇したが、4 週齢を過ぎると急激に低下し、その後、観察終了時まで回復することはなかった。これら F 囊の萎縮は個体間のバラツキはなく、4 週齢以降の雛の全例に、ほぼ同程度に認められた。

2) F 囊の間接蛍光抗体法による染色

F 囊萎縮の要因が微生物感染によるものであれば、出荷前の鶏の血清中にはその抗体が産生されているのではないかと考え、間接蛍光抗体法の一次血清として出荷前のプール血清を用いた。経時的に採取された F 囊の凍結切片を出荷前のプール血清および抗 IBD 血清を一次抗体に用いた間接蛍光抗体法で観察した結果を、Table 1 に示した。すなわち、出荷前プール血清を反応させると 4 週齢のみの F 囊の濾胞内に特異蛍光が観察され (Photo. 2)、これは抗 IBD 血清との反応と一致したことから、IBD V 抗原と判定された。

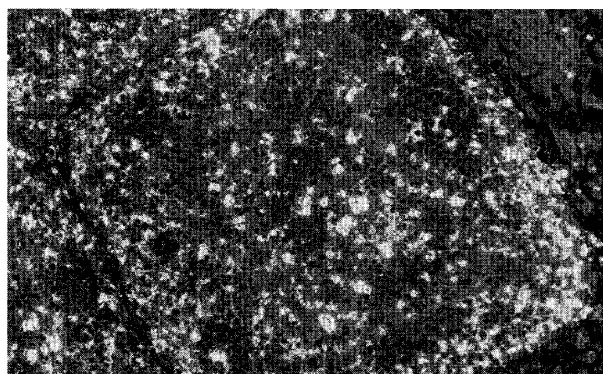


Photo. 2. Specific immunofluorescence observed in the atrophied bursa of a 4-week-old broiler.

3) F 囊の病理組織学的観察

毎週農場から搬入された11羽の雛の中から無作為に抽出した6羽のF 囊を、病理組織学的に観察した。Table 2 に示すように、F 囊の濾胞は3週齢まで順調に発達し、変化は認められなかった。しかし、4週齢になると明らかなリンパ球の変性・壊死が全例に認められた。その後5週齢になると、リンパ球の変性・壊死は軽度となったが、濾胞の萎縮と濾胞周囲の結合組織の増生が全例に認められ、この変化はその後出荷前の7週齢まで重度となって続いた。この間、一部のF 囊の濾胞あるいは間質に軽度の出血あるいは偽好酸球が認められた。

4) 中和抗体価の推移

中和抗体測定結果を Fig. 3 に示した。導入時に高い移行抗体が認められたが、週齢と共に下降し4週齢で最低となった。しかし、5週齢になると急上昇が認められ、その抗体価は導入時の移行抗体とほぼ同じレベルに達した。

2. 受動免疫おとり鶏のF 囊の観察 (実験2)

各農場でブロイラーと共に7日間飼育された受動免疫雛のF 囊体重比、およびその受動免疫雛の萎縮したF 囊乳剤を投与されたSPF 雛のF 囊体重比を、それぞれ Table 3 に示した。F 囊体重比が0.25未満のF 囊は7群13羽に認められた。しかし、この萎縮したF 囊乳剤を投与されたSPF 鶏のF 囊体重比はいずれの群も0.28以上を示した。すなわち、おとり鶏に認められたF 囊萎縮は再現できなかった。

Table 1. Detection of infectious agents in the bursa by indirect immunofluorescence technique

Chicken age (weeks)	First antiserum used	
	Serum collected from the broilers before shipping	Anti-IBDV specific serum
1	0/7 ^{a)}	0/7
2	0/7	0/7
3	0/7	0/7
4	7/7	7/7
5	0/7	0/7
6	0/7	0/7
7	0/7	0/7

a) No. of specific immunofluorescence-positive BFs / No. examined

Table 2. Histopathological examination of BFs of broilers at each age

Chicken age (weeks)	No. of BFs examined	Degeneration and necrosis of lymphocytes	Fibrous hyperplasia of the connective tissue
1	6	- - - - - ^{a)}	- - - - -
2	6	- - - - -	- - - - -
3	6	- - - - -	- - - - -
4	6	+++++	- - - - -
5	6	+++ - - -	+++++
6	6	- - - - -	+++++
7	6	- - - - -	+++++

a) - : no change, + : positive, # : severely positive

Table 3. Atrophy of BFs of sentinel SPF birds introduced into 12 broiler farms

Farm	No. of sentinel birds	Mean BF/BW ratio of sentinel birds	No. of sentinel birds showing atrophied BF ^{a)}	No. of SPF chickens showing atrophy of BF after inoculation of homogenates of atrophied BFs from sentinel birds
A	10	0.30	3	0
B	10	0.41	1	0
C	10	0.42	1	0
D	10	0.35	1	0
E	13	0.27	4	0
F	10	0.40	2	0
G	9	0.42	0	NT ^{b)}
H	10	0.43	0	NT
I	10	0.57	0	NT
J	12	0.44	0	NT
K	10	0.47	1	0
L	10	0.55	0	NT

a) BF showing BF/BW ratio less than 0.25

b) NT : Not tested

考 察

本来 F 嚢は60~70日齢頃まで発達し、約4~5g程の大きさになり、その後生理的に萎縮する。このことは今回のブロイラー雛を実験室内で隔離し飼育した場合の成績によっても確認された。しかし、農場のブロイラー雛は、4週齢で既にF嚢萎縮が観察されはじめ、5週齢以降F嚢重量が増加することはなかった。本調査では、4週齢の時期にIBDVウイルスによるF嚢への感染のあったことが、蛍光抗体法による病原体検索、病理組織学的観察による病変、あるいはIBDV中和抗体価の動きなどから判った。既に、IBDV感染がF嚢萎縮を引き起こすことは良く知られているが、特に幼雛期のF嚢が障害を受けると免疫抑制になり、雛の育成成績の低下を招く[3]ことから、このような早期IBDV感染は避けられなければならない。そのため、多くのIBDV生ワクチンが開発され、使用されるようになった[5]。この調査農場でも弱毒生ワクチンが15、21および28日齢に計3回投与されていた。蛍光抗体法で観察されたIBDV抗原はこの生ワクチン株であった可能性は否定できないが、もしワクチン株であればF嚢萎縮はもっと軽度であろう。一方、強毒IBDVの感染であるとすれば、F嚢にはより重度な病変、すなわち水腫あるいは出血なども観察されるべきである。別の可能性として、海外で報告されている変異株[4]の侵入、あるいは、弱毒ワクチン株の感染に他の要因が混在あるいは重複し萎縮した可能性も考えられる。

そこで、あらかじめIBDVに対して免疫された雛を農場に導入することで、IBDV以外の萎縮要因（IBDV変異株も考慮）の検索・分離を試みた。IBDV免疫には高度免疫血清注入による受動免疫雛を考案した。およそ血中の中和抗体価が1,024倍の受動免疫雛を作出でき、これを7日間農場でブロイラーと一緒に飼育する方法で実施した。その結果、一部の受動免疫雛にF嚢萎縮が観察されたが、その萎縮したF嚢をSPF雛に経口投与したが萎縮は再現できなかった。もし、おとり鶏のF嚢萎縮がIBDVによるものであればSPF雛で再現できるはずである。すなわち、F嚢萎縮にはIBDV以外の要

因が関与している可能性が示唆された。その要因は感染性のものだけでなく、非感染性の要因、例えばストレスのようなものも考慮する必要がある。あるいは、既に前述したように、その要因には弱毒IBDVを含めて複数存在し、それらがお互いに関わりあうことによって重度なF嚢萎縮を引き起こしていることも考えられる。

今回のIBDV受動免疫おとり雛による試みは、7日間の農場飼育を設定した。これは受動免疫を賦与するために注入した抗体の半減期を考慮しての設定である。この7日間の飼育期間が短かったために感染性の萎縮要因を捕捉できなかったのかもしれない。今後はIBDV不活化ワクチンによる免疫おとり雛を作出し、もう少し長期間ブロイラー雛と同居させることでF嚢萎縮要因の捕捉を試みる必要があるだろう。

謝辞：本研究の凍結切片作成にご協力いただいた鹿児島中央家畜保健衛生所の関係各位に深謝する。

文 献

- [1] Allan, W. H., Faragher, J. T. and Cullen, G. A.: Immunosuppression of infectious bursal agent in chicks immunized against Newcastle disease. *Vet. Rec.*, **90**, 511-512 (1972)
- [2] Lukert, P. D. and Saif, Y. M.: Infectious bursal disease. In *Diseases of Poultry*, 10th ed. (Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., McCougald, L. R. and Saif, Y. M., eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 721-738 (1997)
- [3] McLloy, S. G., Goodall, E. A. and McCracken, R. M.: Economic effects of subclinical infectious bursal disease on broiler production. *Avian Pathol.*, **18**, 465-480 (1989)
- [4] Synder, D. B.: Changes in the field status of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.*, **19**, 419-423 (1990)
- [5] 高瀬公三：伝染性ファブリキウス嚢病とその予防。化血研所報黎明, **4**, 23 - 41 (1995)
- [6] 谷口稔明：伝染性ファブリキウス嚢病の病理学的変化。鶏病研究会報, **14**, 9 - 18 (1978)
- [7] 山田進二, 高瀬公三, 野中富士男, 香月伸彦, 矢野尊子, 内布洋一, 岡山政護, 山田昭：ひな用IBDV生ワクチンの性状、使用方法とその経済効果。畜産の研究, **41**, 494 - 500 (1987)

Atrophy of Bursa of Fabricius at Early Ages of Broiler Chickens

Yutaka KONISHI, Kozo TAKASE[†], Kenichi YAMAZAKI^{*1}, Kazuyo TAIRA^{*2}
and Yukikazu TAKAE^{*2}

(*Laboratory of Veterinary Microbiology, ^{*1}The Chemo-Sero-Therapeutic Research Inst., ^{*2}Japan Farm Co. Ltd.*)

Summary

In a broiler farm, the bursa of Fabricius of chickens was investigated every week from one to 7 weeks of age. The weight of bursas increased until 3 weeks of age, but decreased immediately after 4 weeks of age. By indirect-immunofluorescence antibody technique, infectious bursal disease virus (IBDV) antigen was detected in every specimen of bursa at 4 weeks of age, but not at other ages. Histologically, degenerative and necrotic lesions were seen in the bursa at 4 weeks of age, and thereafter fibrinous hyperplasia of the connective tissue was observed in every bursa examined. Specific pathogen-free (SPF) chickens immunized passively against IBDV were introduced into 12 broiler farms and co-housed with 7-week-old broilers for 7 days, as sentinel birds. Some of the sentinel birds showed atrophy of the bursa. However, atrophy was not reproduced when SPF chickens were inoculated orally with the emulsion of the atrophied bursas of the sentinel birds.

Key words : bursa of Fabricius, atrophy, broiler, IBD

[†]: Correspondence to: Kozo TAKASE (Laboratory of Veterinary Microbiology)