

学 位 論 文 要 旨

氏名 Amanallah Ahmed Fahmy El Bahrawy

題 目 :

英文 : Pathological study on the pathogenesis of the pancreatic and renal lesions in chickens after experimental infection with the 9a5b Newcastle disease virus mutant isolate.

和文 : 高病原性変異ニューカッスル病ウイルス (9a5b) の実験感染による膵臓病変および腎臓病変の病理発生に関する病理学的研究

論文要旨 :

Newcastle disease virus (NDV) infection in bird usually causes systemic infection and widespread pathological lesions in most of body organs. Pancreatic and renal pathologic lesions are usually reported during NDV infection in several avian species for example chicken, turkey, pigeon, goose and double-crested cormorants. Until now, little is known about pancreatic and renal lesions in NDV infections and the pathogenesis of NDV in the pancreas and kidney of infected chickens remains unclear. Previously, a comparative study between chickens and ducks after experimental infection with 9a5b mutant NDV was performed by our laboratory and the pancreatic and renal lesions were more prominent in chickens than ducks; therefore, we aimed in this study to investigate the pathogenesis of pancreatic and renal lesions in chickens using the same isolate in detail from an early infection phase (6 hpi) till the late phase of infection (10 dpi). Also, to investigate the pathogenesis of NDV strains that may spontaneously mutate from avirulent to virulent ones. The virulent 9a5b mutant NDV isolate was inoculated intranasally in 32-day-old specific pathogen-free white Leghorn chickens. The pancreas and kidney was grossly examined and both fixed in formalin for histopathological and immunohistochemical investigations. Pancreas was fixed in gluteraldehyde for electron microscopic examinations. The kidney was further examined by RT-PCR and virus titration. In the chicken pancreas, inflammatory changes were observed in the peripancreatic tissue at the early stage of infection (12 hpi) and became more prevalent towards the end of the experiment. Multifocal areas of necrotizing inflammation were detected in the exocrine portion of the pancreas by 5 dpi and became more severe at 10 dpi. The endocrine islets were generally preserved, but slight degenerative changes were observed at 10 dpi. Immunohistochemistry (IHC), NDV-nucleoprotein (NP) positive signals were detected in the peripancreatic soft tissues (macrophages and other

(別紙様式第 3 号)

lymphoid cells) by 1 dpi. In the exocrine portion of the pancreas, NDV-NP positive signals were detected at 5 dpi and increased in intensity and distribution by 10 dpi. NDV particles were confirmed in the cytoplasm of exocrine acinar cells by transmission electron microscopy. CD3-positive cells were observed in the peripancreatic soft tissues earlier than in the pancreatic tissue. Moreover, in comparing with control chicken, insulin immunopositivity was unchanged, except on the last day of experiment, when insulin IHC was slightly reduced. In the kidney study, histopathologically, tubulointerstitial nephritis was detected in both renal cortex and medulla but it was more abundant in the medulla. Nephrotropism of the 9a5b NDV isolate in the chicken kidneys was confirmed by IHC, RT-PCR, and virus isolation from an early time after infection (1 dpi). Virus detection was consistent among these three methods and started at 1 dpi, peaked at 5 dpi, and diminished at 10 dpi. Massive degenerative changes and infiltration of CD3 immunopositive cells accompanied replication of the 9a5b NDV isolate in chicken kidneys.

In conclusion, the 9a5b NDV infection in the chicken pancreas induced inflammatory reaction and viral replication in the peripancreatic soft tissues earlier than in the pancreatic tissue. Furthermore, necrosis affected mainly the exocrine portion of the pancreas while the endocrine portion was generally unaffected by the NDV infection. In the chicken kidney, the 9a5b NDV mutant isolate had showed a nephrotropism to the chicken kidney from an early time after infection (1 dpi). Tubulointerstitial nephritis was more severe in the renal medulla than the cortex. Local inflammatory response in kidney tissues may play an important role in suppressing viral replication. Pathological changes that were caused by NDV in the chicken kidneys were similar to those caused by avian influenza virus, infectious bronchitis virus, and avian nephritis virus and this highlights the importance of including NDV in the differential diagnosis of kidney disease in chickens.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Amanallah Ahmed Fahmy El Bahrawy
審 査 委 員	主 査： 鳥取大学 教授 森田 剛仁
	副 査： 山口大学 教授 森本 将弘
	副 査： 鳥取大学 教授 伊藤 壽啓
	副 査： 鳥取大学 教授 山口 剛士
	副 査： 鳥取大学 准教授 寸田 祐嗣
題 目	Pathological study on the pathogenesis of the pancreatic and renal lesions in chickens after experimental infection with the 9a5b Newcastle disease virus mutant isolate. (高病原性変異ニューカッスル病ウイルス (9a5b) の実験感染による膵臓病変および腎臓病変の病理発生に関する病理学的研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>ニューカッスル病ウイルス (NDV) は多くの種類の鳥類に感染し、全身諸臓器に多様な病変を起こすウイルスであり、現在、日本を含む世界中の国々で致死的な病変を起こす強毒型 NDV が発生し問題となっている。膵病変および腎病変は様々な種類の鳥類の NDV 感染時に生じるとされているが、その詳細な病理発生機序については不明な点が多い。これまで当研究室では、水禽類から分離した弱毒型 NDV (Goose/Alaska/415/91) を鶏の気嚢で 9 回、脳で 5 回継代したことにより得られた変異強毒型 “9a5b NDV” を鶏 (白色レグホン) および水禽類 (マガモ) に接種し、9a5b NDV の病原性について検討した。その結果、水禽類よりも鶏に膵病変および腎病変がより強く惹起された。それ故、本研究では鶏の 9a5b NDV 感染時における膵病変および腎病変の病理発生機序を詳細に検討するために、感染後初期 (接種後 6 時間) から後期 (接種後 10 日後) の膵臓および腎臓における病理学的解析を実施した。</p> <p>32 日齢の SPF 白色レグホンに変異強毒型 9a5b NDV を経鼻接種し、接種後 6 時間、12 時間、1、2、3、5、10 日に臨床症状を観察後、病理解剖を実施した (各々 3~4 例)。病理学的検索では、全身諸臓器のヘマトキシリンエオジン (HE) 染色による組織学的検索、膵臓については抗 NDV 核蛋白抗体、抗 CD3 抗体および抗インスリン抗体を使用した免疫組織学的検索、並びに電子顕微鏡学的検索を実施した。腎臓については抗 NDV 核蛋白抗体および抗 CD3 抗体を使用した免疫組織学的検索、さらに腎組織中のウイルス増殖の変化を解析するために Reverse transcription(RT)-PCR およびウイルス力価測定 (10-day-old</p>	

embryonated SPF chicken egg を使用) を実施した。

初めに、脾臓では炎症性病変が NDV 接種後 12 時間に脾臓周囲組織に出現し、それは接種後 10 日目まで持続した。炎症性病変はマクロファージおよびリンパ球を主体とした炎症性細胞の浸潤であり、脾外分泌部組織に多巣状性壊死病変が接種後 5 日目から認められ、接種後 10 日目ではその程度は強くなった。脾内分泌部組織には接種後 10 日目に軽度の変性所見が認められたのみであった。免疫組織学的検索では、抗 NDV 核蛋白抗体に対する陽性像が、接種後 1 日目に脾臓周囲組織に浸潤しているマクロファージおよびリンパ球の細胞質に検出された。さらに、その陽性像は接種後 5 日目に脾外分泌細胞の細胞質に検出され、接種後 10 日目に陽性シグナルの増強と分布がより広くなった。電子顕微鏡的検索では、ウイルス粒子が脾外分泌細胞の細胞質に観察された。接種後初期に観察されたリンパ球の大多数は CD3 陽性リンパ球 (T リンパ球) であった。脾内分泌部細胞におけるインスリン陽性シグナルの程度は、対照例に比しほとんど差が認められず、接種後 10 日目にインスリン陽性シグナルの減弱がわずかに観察されたのみであった。以上より、脾炎の病理発生として、NDV 感染初期に、脾臓周囲にウイルス感染細胞 (マクロファージおよびリンパ球) の浸潤が生じ、徐々に脾外分泌組織に波及し、脾外分泌細胞の壊死が惹起されることがわかった。

次に腎臓については、病理組織学的に尿細管間質性腎炎が皮質および髄質に観察され、特に髄質において炎症の程度が著明であった。炎症性細胞は主に CD3 陽性リンパ球 (T リンパ球) であり、T リンパ球の浸潤は接種後 10 日目に著明であった。抗 NDV 核蛋白抗体に対する陽性像が、接種後 1 日目に腎尿細管上皮細胞の細胞質に検出された。免疫組織学的検索、RT-PCR、ウイルス力価測定等の方法により、接種後 1 日目から 5 日目の腎組織における 9a5b NDV の複製が確認された。腎組織におけるウイルスの検出量は、これら 3 つの手法により同様の傾向が得られた。すなわち、ウイルスの検出は接種後 1 日目より確認され、接種後 5 日目にピークを迎え、接種後 10 日目にはその検出量は減じていた。以上より、接種後 1 日目より腎尿細管上皮細胞において 9a5b NDV の複製が生じ、腎全域 (特に髄質) に尿細管間質性腎炎が惹起されることがわかった。接種後 10 日目に認められた T リンパ球の著明な浸潤は、この時期のウイルス複製の抑制に関与している可能性が示唆された。これら感染後期の腎病変は、インフルエンザウイルス、伝染性気管支炎ウイルス、鶏腎炎ウイルスにより引き起こされる腎病変に類似していることから、自然界で同様の病変を認めた場合、これらの感染症や NDV 感染症を類症鑑別として考慮する必要があると思われた。

本研究は、今後、野外で発生する可能性がある強毒型 NDV による鶏の脾病変および腎病変の病理発生機序および病変の推移に関する基礎的データを示した。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文にふさわしい価値があるものと考えられた。