



鶏伝染性喉頭気管炎の実験病理学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2009-08-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小田切, 美晴 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00009378

鶏伝染性喉頭気管炎の実験病理学的研究

小田切 美晴

Experimental Pathology on Infectious Laryngotracheitis of Poultry

Yoshiharu ODAGIRI

Laboratory of Veterinary Pathology, College of Agriculture

(Received October 31, 1981)

Summary

The outbreak of Infectious laryngotracheitis (ILT) was observed by YOSHIMURA and ODAGIRI in Japan in 1962. In recent survey, this disease seems to become a major menace to the Japanese poultry industry.

The present studies were undertaken to clarify the pathogenesis of ILT (chapter 1, 2), to establish the quick method for the diagnosis (chapter 3), to obtain the specific ILT lesions other than the respiratory organ in chicken (chapter 4), to clarify the pathology of ILT virus infection in chick embryo (chapter 5) and to clarify the susceptibility of Japanese quail to the virus (chapter 6).

Experimental results are summarized as follows.

Chapter 1 Immuno-histological findings in laryngotracheal lesions of the experimentally infected chicken

Twenty-five chickens were inoculated with ILT virus, and laryngotracheal lesions were examined from day to day.

Respiratory symptoms were observed from 3 days p.i., and some birds became fatal. From the 8th day, they began to recover.

Macroscopically, severe inflammatory changes of laryngotrachea were seen from 3 to 7 days after exposure. Characteristic microscopic lesions of the disease, i.e., syncytial cell formation with intranuclear inclusion bodies were observed in the epithelial cells of mucous glands and adjacent epithelia at 2 days p.i.. From 3 days p.i., these findings were also seen in the basal layer, and inflammatory edema accompanied with the infiltration of heterophils and macrophages were observed in the epithelial layer and lamina propria. These changes were most marked at 3 to 5 days p.i.. From 7 days p.i., inclusion bodies disappeared.

As the result of immunofluorescent studies, viral antigens were observed exclusively in the characteristic microscopic lesions of the laryngotrachea from 2 to 6 days p.i., and

not in the propria and submucosa where infiltration of heterophils and macrophages was observed. At 6 days p.i., the viral antigens were abundant in the exudates of the laryngo-tracheal lumen as a result of epithelial desquamation, while fluorescence disappeared in the epithelial layer.

Chapter 2 The ultrastructural findings in the tracheal epithelia of the experimentally infected chicken

The earliest changes were observed in the nuclei at the 24 hours after infection. The nucleoplasm appeared homogenous due to accumulation of chromatin at the nuclear membrane.

At 24 to 36 hours p.i., inclusion bodies of relatively high density were presented in nearly whole area of nuclei. Various types of immature particles were observed in association with the inclusion bodies. Virus particles which were formed in the nuclei were enveloped by two processes, i.e., nuclear budding and envelopment at the nuclear membrane, and at a segment of preexisting or newly-formed membrane in the cytoplasm.

Loss of cilia and syncytial cell formation were detected in an advanced stage of degeneration on the second day after exposure. Cytoplasmic vacuoles were abundant and contained large number of enveloped virus particles. Enveloped particles of different sizes were found in the nuclear vesicles (ca. 110–160m μ) and in the cytoplasmic vacuoles (180–310m μ).

Chapter 3 Quick smear method for the detection of inclusion bodies

For the purpose of securing the rapid diagnosis of this disease, various smear methods for the detection of inclusion bodies were examined on the tracheal mucous membrane of chickens inoculated with the virus, and the following results were obtained.

- 1) GENDRE's fluid (alcoholic BOUIN), BOUIN's fluid and SCHAUDINN's sublimate alcohol were recommended for the fixation of smear.
- 2) Among many stains, the most excellent result was attained with hematoxylin and eosin staining, but GIEMSA's stain was not suitable for the purpose.
- 3) It was very difficult to discriminate virus DNA with acridin orange staining.

Chapter 4 Extra-pulmonary lesions of the experimentally infected chicken

For the examination of tissue susceptibility to ILT virus other than respiratory tract and conjunctiva, chickens were inoculated with the virus intravenously (group A), intracerebrally (group B), and by cloacal brushing (group C) and feather follicle brushing (group D), and they were examined successively.

Respiratory symptoms were not observed in all of group.

In group A, the liver showed multiple miliary necrotic foci from 3 days p.i.. Characteristic microscopic lesions of the disease were observed in the hepatic cells and epithelial cells of interlobular bile duct and further in the epithelial cells of thymic medulla from 3 to 5 days. In group B, the liver was studded with miliary necrotic foci from 5 days p.i.. Microscopically, characteristic lesions were observed in the epithelial cells of choroid

plexus and arachnoidal methothelia from 1 to 5 days p.i., the hepatic cells and the epithelial cells of interlobular bile duct showed same lesions as those in group A at 5 to 6 days p.i.. In group C, the mucous membrane of cloaca proctodeum and cloaca bursa showed reddening and catarrhal inflammation from 2 to 5 days p.i.. The characteristic microscopic lesions were observed in the epithelial cells of cloaca proctodeum from 1 to 4 days p.i., and also seen in the epithelial cells of bursal mucosa, as well as epithelial reticular cells of medulla of bursal follicle from 1 to 6 days p.i.. In group D, feather follicle of the inoculation area became swollen as grain of millet or rice at 4 to 6 days p.i.. Characteristic microscopic lesions were observed in the epithelial cells of feather follicle and feather root from 1 day p.i.. They became severe, and were also found in the adjacent epidermal germinal epithelial cells at 3 to 5 days p.i..

As the result of immunofluorescent antibodies studies in group A, C and D, viral antigens were confirmed agreeing with the appearance of intranuclear inclusions.

Chapter 5 Pathology of ILT virus infection in the chick embryo

ILT virus was inoculated respectively on the chorioallantoic membrane of 10-day-old chicken embryos (group A), into the amniotic cavity of 11-day-old embryos (group B), and into the yolk sac of 4-day-old embryos (group C).

In group A, the liver was studded with multiple miliary necrotic foci at 6 to 9 days p.i., and hepatic cells of the foci showed microscopically characteristic lesions of ILT. ILT lesions were found further in the epithelial cells of bile ducts, oral mucosa, oral gland, pharyngeal mucosa, esophageal mucosa, gland of proventriculus, uriniferous tubules, thymic medulla, bursal mucosa and proctodeum.

In group B, ILT lesions were found in the liver as in group A, and also in the epithelial cells of feather follicle, outer sheath and basal layer of feather, epidermal germinal layer, conjunctiva, nasal mucosa, infraorbital sinus, oral mucosa, oral gland, laryngo-tracheal mucosa, tertiary bronchi, air sac mucosa, esophageal mucosa, gland of proventriculus, pancreatic acini, intralobular duct of pancreas, bursal mucosa and proctodeum.

In group C, characteristic histopathological lesions of ILT could not be found.

Chapter 6 Susceptibility of the Japanese quail

Japanese quails were inoculated with ILT virus by nasal instillation (group A), conjunctival (group B), laryngeal (group C), into air sac (group D), intracerebrally (group E), cloacal brushing (group F), and feather follicle brushing (group G).

In group A, characteristic histopathological lesions of the disease were found in the epithelial cells of nasal mucosa and lacrimal duct in only one case. In group D, the lesions were observed in the epithelial cells of the primary, secondary and tertiary bronchi and air capillaries, but not in the larynx and trachea. In group E, the liver showed minute necrotic foci, which revealed focal necrotizing hepatitis, i.e., swelling, necrobiosis, presence of intranuclear inclusions, syncytial cell formation and necrosis of the hepatic cells, but no lesions were found in the brain and meninges. In group G, feather follicles of the inoculation area became swollen as grains of millet at 3 to 6 days p.i.. Characteristic microscopic lesions were observed in the epithelial cells of feather follicles and feather roots from 1 day p.i.. They became severe, and were also found in the adjacent epidermal germinal layer at 3 to 5 days p.i.. As the result of immunofluorescent studies

in group D, E and G, viral antigens were confirmed agreeing with the appearance of intranuclear inclusions.

In group B, C and F, characteristic lesions of the disease could not be found.

目 次

緒 言	83
第 1 章 実験感染鶏の喉頭気管病変の免疫組織的所見	83
第 1 節 実験方法	83
1. ウイルスとニワトリ	83
2. 蛍光抗体液	83
3. 感染実験と観察の方法	83
第 2 節 成績	84
1. 症状および肉眼所見	84
2. 蛍光抗体法所見	84
3. 各種染色法による組織学的所見	85
第 3 節 考察	85
第 4 節 小括	86
第 2 章 実験感染鶏の気管上皮細胞の電子顕微鏡的所見	87
第 1 節 材料および方法	87
1. ウイルスとニワトリ	87
2. 実験方法	87
第 2 節 成績	87
1. 症状および肉眼所見	87
2. 電子顕微鏡的所見	87
第 3 節 考察	88
第 4 節 小括	89
第 3 章 迅速診断法の検討	90
第 1 節 材料および方法	90
1. 喉頭・気管材料	90
2. 検査材料の塗抹法	90
3. 実験の種類	90
実験 1 : 固定液と染色液の選定	90
実験 2 : 塗抹標本による診断法の実用性の検討	91
第 2 節 成績	91
1. 固定液と染色液の選定	91
2. 塗抹標本の実用性	92
第 3 節 考察	92
第 4 節 小括	93

第 4 章 非経気道的接種法による実験感染鶏の病理学的所見	93
第 1 節 材料および方法	93
1. ウイルスとニワトリ	93
2. 実験方法	93
第 2 節 成績	94
1. 静脈内接種群	94
3. 脳内接種群	96
3. クロアカ内接種群	97
4. 羽包内接種群	98
第 3 節 考察	99
第 4 節 小括	100
第 5 章 発育鶏卵内接種による胚子病変	101
第 1 節 材料および方法	101
1. ウイルスと発育鶏卵	101
2. 実験方法	101
第 2 節 成績	101
1. 漿尿膜上接種群	101
2. 羊膜腔内接種群	102
3. 卵黄包内接種群	103
第 3 節 考察	103
第 4 節 小括	104
第 6 章 ILTウイルスに対するウズラの感受性	104
第 1 節 材料および方法	105
1. ウイルスとウズラ	105
2. 実験方法	105
第 2 節 成績	105
1. 結膜嚢内接種群	105
2. 鼻腔内接種群	105
3. 喉頭粘膜上接種群	106
4. 気嚢内接種群	106
5. 脳内接種群	106
6. クロアカ肛門洞粘膜上接種群	107
7. 皮膚羽包内接種群	107
第 3 節 考察	107
第 4 節 小括	108

総括	109
謝辞	109
引用文献	110
写真および写真の説明	116

緒 言

鶏伝染性喉頭気管炎 (Infectious laryngotracheitis, 以下 I L T) はヘルペス群ウイルス (Herpesviridae) に属する I L T ウイルスを原因とするニワトリの急性呼吸器病で、病鶏は鼻汁漏出、発咳、喘鳴、咯血などの激しい呼吸器症状を示し、しばしば窒息死に陥る。呼吸器症状のほか眼結膜の発赤、腫脹や流涙などの眼症状を呈する場合もある。^{42,51,103)}

I L T は 1925 年、MAY ら⁷⁴⁾ により、米国ロードアイランド州の一農家で発見された。その後本病は急速に広がり、現在では世界各地に発生し、ニワトリの重要な伝染病の一つに数えられている。日本では中村ら⁸¹⁾ が、1933~37年の間に3回にわたって熊本種畜牧場内の輸入鶏に認めたが、いずれも局地的発生に止まり、やがて終息した。その後約25年間、国内では1例の発生報告もなかった。1962年3月、吉村および小田切¹¹³⁾ は大阪府下に大流行したニワトリの呼吸器病を病理学的、病因学的に調査した結果、I L T ウイルスに起因することを解明した。これが国内における本病の本格的発生報告の先駆となり、引続いて奈良県など周囲府県においても、その発生が確認された⁴⁷⁾。以後本病は着実に汚染地域を広げ、関係技術者の防疫上の努力にもかかわらず、現在では国内各地に常在化し、養鶏産業に見過ごすことのできない損害をもたらしている^{52,53,68,77,100,104,114,115)}。家畜伝染病予防法においても、本病が届出伝染病に指定されていることから、その重要性が推測されよう。限られた面積に万単位のニワトリを飼育する現在の養鶏形態は、すべての鶏病に対して温床を提供するが、特に本病は根絶が極めて困難である。その根底には特殊な宿主・寄生体関係 (host-parasite relationship) が存在することもあり得よう。

I L T の古典的病理学は、主として欧米の研究者^{4,26,68,92,102)} によりほぼ確立され、病理学的診断の根拠となっている。しかしながら従来の研究のほとんどは、病変好発部位のヘマトキシリン・エオシン染色による組織学的観察に止まるため、病変とウイルス増殖の関係、病変好発部位以外の臓器・組織病変、ニワトリ胚子の組織病変、ニワトリ以外の動物の感受性あるいは本病の迅速診断法など解明しなければならない多数の課題が残されている。

本実験研究は、日本における I L T の再発見に引

き続いて、上述の諸項目の検討を目的として計画された。以下にその成績を記述する。

第 1 章 実験感染鶏の喉頭気管病変の免疫組織学的所見

SEIFRIED の報告⁹²⁾ 以来、I L T の病変は、喉頭・気管を中心とする呼吸器粘膜に好発する急性剝離性滲出炎を基本とし、これらの部位の上皮細胞に集団的に出現する核内封入体を特徴とすることが明らかにされている。このように本病の古典的病理学はほぼ確立されているが、観察される激しい炎性病変が I L T ウイルスの増殖とどのように関連するのか、その詳細な病理発生は解明されていない。そこで筆者は従来の組織学的検査法に、抗原抗体特異反応を応用した蛍光抗体法検査を加えて、実験感染鶏の喉頭気管病変を経日的に観察し、本病の病理発生を検討した

第 1 節 実験方法

1. ウイルスとニワトリ

接種材料には、I L T ウイルス 352 株鶏胚漿尿膜継代ウイルスを用いた。このウイルス株は、筆者らが 1962 年、大阪府下において本病をはじめて発見した際、症例の気管から分離され¹¹³⁾ 以来鶏胚漿尿膜上を経代することにより維持されているものである。

ニワトリは、大阪府下の一孵化場より孵化直後入手し、使用時まで隔離飼育した健康な白色レグホン種雄ヒナを用いた。

2. 蛍光抗体液

I L T ウイルス 352 株感染耐過鶏の血清より川村の記載⁶⁹⁾ に従って γ -グロブリン分画を取り出し、これに蛍光色素 Fluorescein isothiocyanate を標識した直接蛍光抗体液である。DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーとニワトリ肝粉処理により非特異蛍光分画を除去したのち、I L T ウイルス 352 株に感染したニワトリヒナ腎単層培養細胞を用いて特異性を検討し、最終反応力価の 4 単位を使用した。

3. 感染実験と観察の方法

92 日齢ヒナ 25 羽の左側後胸気嚢内に、 $10^{4.8}$ EID₅₀ / ml のウイルス液を 0.1 ml ずつ接種した。症状を観察しながら、接種後 1 日から 15 日まで経日的に殺処分した。肉眼的観察を行なった後、喉頭・気管をメス

で縦断し、その一部をドライアイスアセトンで冷却したN-ヘキサン中で凍結した。また残る喉頭・気管および全身諸臓器を10%ホルマリン水で固定した。

N-ヘキサン中で凍結した喉頭・気管材料を、冷凍ミクロトームを用いて4 μ に薄切し、風乾後冷アセトンで固定した。4 $^{\circ}$ Cの蛍光抗体液中で12時間反応させた後、グリセリンで封入し、蛍光抗原の所在、消長を蛍光顕微鏡により観察した。10%ホルマリン水で固定した材料から、法に従ってパラフィン薄切標本、または凍結薄切標本を作製した。染色には主としてヘマトキシリン・エオシン染色（以下H・E染色）、必要に応じてFEULGEN反応、ピロニン・メチル緑染色、過沃素酸-SCHIFF (PAS) 染色、オイルレッドOによる脂肪染色を用い、組織学的観察を行なった。

第2節 成績

1. 症状および肉眼所見

接種後1日では、ヒナは異常を示さなかったが、2日より沈うつとなり、採食不良を呈した。ILTに好発する異常呼吸は3日より出現し、7日まで観察された。最盛期の5、6日では喘鳴、咯血などの激しい呼吸器症状を現わして顔面が暗赤色となり、死亡する例が認められた。8日より異常呼吸は消失し、10日以降ではヒナは元気を回復した。

肉眼的には、喉頭・気管粘膜は2日から充血し、

3日では水腫性に肥厚した。4~6日の例では、粘膜面に針頭大~粟粒大の出血巣が散在性に認められた。3~8日の異常呼吸の出現時期にほぼ一致して、喉頭・気管の管腔内には滲出物の貯溜を観察した。3日では白色半透明の粘液が増量し、4~6日ではこれらの粘液中に黄白色クリーム様物と少量の凝固血液が混在した。死亡した例では、多量のクリーム様滲出物と凝血塊が管腔内に充満して観察された。7、8日の例では滲出物は黄色チーズ様物となり、粘膜面に偽膜様に附着して見られた。10日例より滲出物は消失した。12日以降の例では、粘膜に針頭大の白色隆起が多数認められた。

喉頭・気管以外では、2~8日の例の接種部気嚢および左肺に著しい充血、水腫と黄色の粘液の増量を観察した。その他の臓器には異常を認めなかった。

2. 蛍光抗体法所見

直接蛍光抗体法による所見の推移を、H・E染色標本と対比してFig. 1の模式図に示した。ウイルス増殖を物語る蛍光抗原は、1日例では喉頭、気管のいずれの部位にも認められなかったが、2日より両粘膜の粘液腺上皮細胞に出現した。粘液腺を構成する数個またはその全部の上皮細胞がFluorescein isothiocyanateの色調を取り、黄緑色に輝いた。一部の領域では特異蛍光は、早くも粘液腺に隣接する粘膜上皮細胞にも波及していた。蛍光抗原は、上皮細胞の核内に局限して微細顆粒状に分布するものも

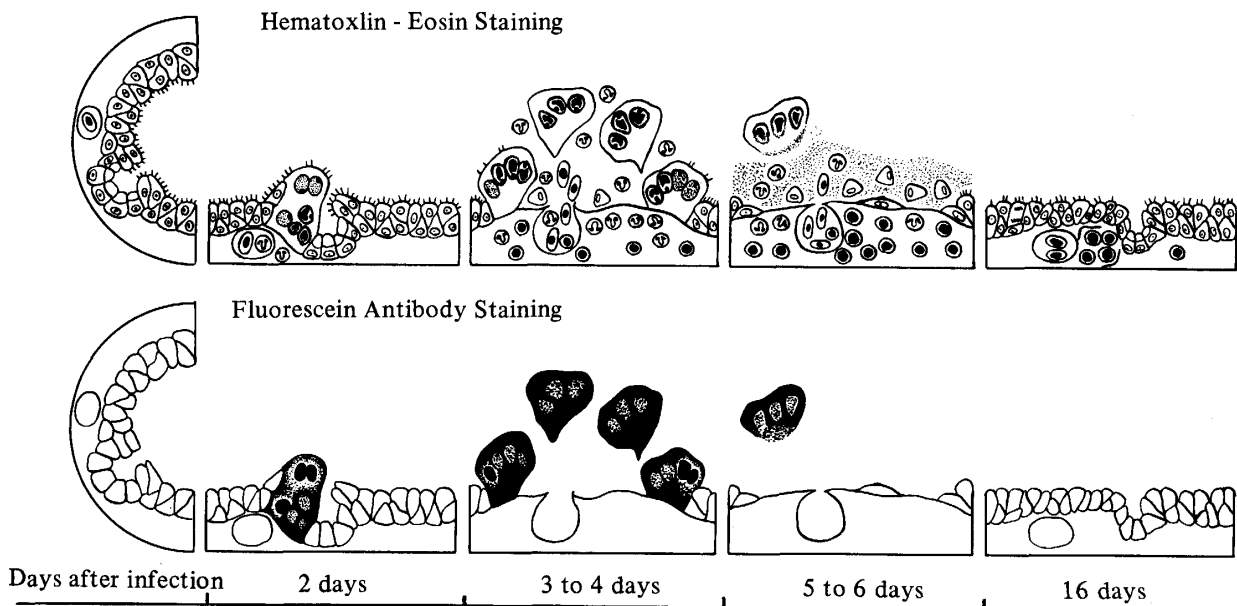


Fig. 1 Scheme of histological and immunohistological findings of laryngotracheal mucous membrane of the artificially infected chicken.

あったが、2日例では多くのものが核と細胞質の双方に陽性を示した。またこれらの蛍光抗原陽性の上皮細胞は、単独に観察されることはまれで、数個以上が陽性細胞の集団を形成していた。蛍光抗体法検査標本に連続して薄切し、H・E染色を施した対照標本では、蛍光抗原陽性の上皮細胞集団に一致して、核内封入体含有細胞が集団をなして出現するのを認めた。

特異蛍光は、3日例より粘膜の広範囲の上皮細胞に広がり、4日例では上皮層のほとんど全部の上皮細胞が黄緑色の強い蛍光を発した。表層部の上皮細胞はもとより、深部の基底細胞にも容易に観察されたが、細胞癒合の結果合胞体と化して粘膜面に突出し、剥離直前と考えられる上皮細胞集団に増光が著しかった。これに反して、上皮細胞以外の組織構成細胞および上皮層内や結合組織内に浸潤する多数の偽好酸球、リンパ球は完全に陰性であった。上皮細胞の剥離が高度となる5、6日の例では、蛍光抗原は粘膜上皮層では急激に減少し、他方管腔内の滲出物中に多量に認められた。粘膜上皮層では蛍光抗原は、剥離直前の変性上皮細胞集団になお明瞭に観察されたが、上皮の欠損した粘膜面を一部被覆する扁平な再生上皮細胞には存在しなかった。7日以降では上皮細胞はほぼ修復され、蛍光抗原は陰性となった。

3. 各種染色法による組織学的所見

H・E染色を始め各種染色法による組織学的検査の結果、ILTに特有の集団的核内封入体出現は、2日例より粘液腺上皮細胞に好発した。また粘液腺に隣接する上皮細胞にも出現し、周囲には偽好酸球浸潤を観察した。核内封入体は3、4日をピークとして粘液腺上皮はもとより線毛上皮、杯細胞および基底細胞などすべての上皮細胞に多数出現した。しかし核内封入体は、上皮細胞以外の細胞には全く認められなかった。

封入体は染色性により2種類に分けられる。第1型はヘマトキシリン・エオシン両色調に染み(H・E両染色)、Feulgen反応に弱陽性を示し、腫脹した細胞核内全域を占めて観察され、第2型はエオシンに好染し周囲に明庭を有する。前者は比較的感染早期と考えられる細胞内に、後者は変性のより進行した細胞内に多く観察された。またこれらの核内封入体を含む上皮細胞集団は、細胞癒合により

合胞体を形成し、粘膜面より管腔内に乳頭状に突出した。ついでこれらの変性上皮細胞は粘膜面より剥離し、ついには崩壊して消失した。このため3日例より上皮層は、その細胞配列は著しく乱れ、粘液腺は崩壊、消失した。また上皮層内には小空隙が形成され、空隙内には脱落した合胞体、偽好酸球、リンパ球の浸入が見られた。固有層および粘膜下織は、著しい充血、水腫と偽好酸球、リンパ球、プラズマ細胞および大食細胞の多数出現のため肥厚した。4、5日の例では上皮細胞の合胞体化と剥離が高度で、粘膜は著しいびらんを呈し、しばしば出血を伴い、上皮層の欠損した粘膜面は偽好酸球、リンパ球、大食細胞、漿液線維素性物質よりなる多量の滲出物で被覆された。合胞体内には多数の核内封入体と大小の細胞質内空隙が認められた。

核内封入体は、粘膜内では6日例から、また管腔内滲出物中では7日例から検出されなくなった。6日例では滲出物に接する粘膜面に扁平な再生上皮細胞が認められ、8日例から再生機転は旺盛になった。12日例から線毛の形成と粘液腺の再生が見られ、15日例では上皮層はほぼ正常な構造に復帰した。一方結合織層の充血、水腫および細胞浸潤などの炎性変化は、上皮の再生の進行に伴って急速に消退した。10日例からこれらの急性炎性浸潤と交替して、粘膜下織の細静脈周囲に大型円形核細胞が限局性に増殖し、実験最終日の15日例ではリンパ球構造を示した。

第3節 考察

ILTの本格的な病理学的観察は、本病が発見されてから6年後の1931年に、SEIFRIEDによって報告された⁹⁾。彼は人工感染例14羽および自然感染例16羽、計30羽のニワトリを詳細に観察し、喉頭・気管を中心とする呼吸器粘膜と結膜の上皮細胞に特異な核内封入体を発見した。この封入体は、実験的には感染後12時間の早期から気管上皮細胞内に認められ、24~72時間では結合織層に著しい水腫、細胞浸潤と小血管の出血を伴った。後期には上皮層の崩壊と結合織層における炎性変化は極めて高度となり、結合織層に壊死性変化と血管病変が出現したという。彼の観察は、実験例では感染後7日までの短期間に止まるが、自然感染例を含む病変の観察から、ILTウイルスはまず最初に粘膜上皮を侵襲して核内封

入体を形成し、次いで固有層から粘膜下織の領域へと移行して血管病変を惹起し、更に血流を介して全身に拡散するものと思つた。続いて THORP¹⁰²⁾ は、上皮細胞内の特徴的核内封入体は喉頭および気管上部に好発し、早期では粘膜の水腫性肥厚が、また経過が進行した後期では粘膜面に血様物や黄色の滲出物が附着すると記載し、SEIFRIED⁹⁹⁾ にほぼ一致する呼吸器病変を示している。しかし彼らは、症状と上部呼吸器における病変の出現状況が必ずしも時期的に一致せず、しばしば早期にも死亡例が認められたこと、また心臓、肺、肝臓、腎臓などの諸臓器に著しい出血、水腫および細胞浸潤が見られたことなどを重視し、本病を全身性のウイルス病と見なした。その後 COVER²⁶⁾ は 5 系のウイルス株による気管病変を比較観察した結果、核内封入体はウイルスに対する細胞反応の表現であり、その出現は組織反応の早期に限られると述べた。各種の組織反応の出現順序については、まず上皮細胞の線毛脱落と粘液腺の消失が起り、続いて上皮細胞の腫脹と核内封入体の出現が認められ、この時期に一致して固有層に大食細胞とリンパ球の浸潤および結合織線維の増殖が見られるが、これらの細胞反応がより高度に進行する時期には核内封入体は消失すると記載し、I L T の急性炎性像をほぼ明らかにした。BANG⁴⁾ は鼻腔粘膜を実験観察の場とし、また PURCELL⁸⁸⁾ は呼吸器を中心に全身組織を対象として、それぞれ接種直後から疾病耐過期に至るまで詳細に観察している。BANG⁴⁾ と PURCELL⁸⁸⁾ の見解は良く一致し、本病の基本的病変を、上皮細胞における集団的な核内封入体の出現と合胞体形成を特徴とする呼吸器粘膜の急性剥離炎と規定している。特徴的上皮細胞所見は、BANG⁴⁾ らは感染後 21 時間から 7 日まで、また PURCELL⁸⁸⁾ は 48 時間から 4 日まで認め、以後は変性上皮細胞の剥離、消失とともに再生上皮細胞が旺盛に増殖し、耐過期には粘膜の再生・修復と結合織層のリンパ滲胞形成を観察した。BANG⁴⁾ はこのように推移する I L T 病変は、非致死性の急性剥離性鼻炎研究の好適モデルの一つであると述べている。また PURCELL⁸⁸⁾ は噴霧接種による実験で、ウイルスによる侵襲部位は気管、肺、気嚢が主体をなし、呼吸器以外の部位に I L T 病変が出現することはないとし、本ウイルスの広範な臓器・組織侵襲性を否定した。HITCHNER⁴⁴⁾ の蛍光抗体法に

よる研究では、明視野による組織学的観察がなされなかったため、詳細な点は明らかにされていない。しかし点眼、気管内、クローカ内および噴霧の各接種による感染実験では、蛍光抗原は結膜、鼻・気管・気嚢粘膜、肺、ファブリシウス嚢およびクローカ粘膜にそれぞれ観察されたが、ウイルス血症を物語る所見は得られなかったとし、前記の PURCELL⁸⁸⁾ の結論と一致した。

筆者の喉頭・気管病変の免疫組織学的観察では、蛍光抗原は専ら粘膜上皮細胞に限定して出現し、その消長は核内封入体を含む細胞の推移と完全に一致し、偽好酸球、リンパ球、大食細胞、プラズマ細胞など上皮以外の細胞には抗原を認めなかった。I L T の激しい急性滲出性病変は、侵襲部位の上皮細胞内におけるウイルス増殖により、一次性に惹起された上皮細胞の変性、融合、壊死を根底として成立することを確認した。これらの成績の一部は、前述の通り BANG⁴⁾、PURCELL⁸⁸⁾、および HITCHNER⁴⁴⁾ によってすでに示されているが、筆者の観察により I L T の病理発生は、より一層明らかにされたものとする。

第 4 節 小括

I L T の喉頭気管病変の病理発生を明確にするため、92 日齢のニワトリ 25 羽の左側後胸気嚢内に、I L T ウイルスを接種したのち、1 日から 15 日まで経日的に殺処分し、喉頭・気管について直接蛍光抗体法検査を実施し、通常の組織染色標本の所見と比較検討し、以下の成績を得た。

1. 接種後 2 日からヒナは沈うつとなり、3 日から発咳、喘鳴、喀血などの呼吸器症状を示した。最盛期の 5、6 日では死亡する例があった。肉眼的には、喉頭・気管は 2 日より充血し、3 日では水腫性に肥厚した。4～6 日の例では粘膜面に針頭大～粟粒大の出血巣が認められた。異常呼吸の発現時期にほぼ一致して、接種後 3～8 日の例では喉頭・気管腔内に滲出物の貯溜を認めた。12～15 日の例では、粘膜下織のリンパ滲胞過形成に基づく多数の針頭大の白色隆起が認められた。

2. 免疫組織学的観察の結果、ウイルス抗原は粘液腺上皮細胞と粘膜上皮細胞に限定して出現し、組織を構成する他種の細胞や組織内に浸潤する各種の遊走細胞に認められることはなかった。またウイル

ス抗原の所在と消長は、核内封入体のそれと完全に一致し、封入体発現のピーク（接種後3～4日）にはウイルス抗原も豊富に認められた。接種後7日以降は両者とも消失し、この時期から出現する再生上皮細胞にも陰性であった。

3. ウイルス抗原は感染の早期には、核内に限局して分布するものもあったが、多くは核と細胞質の双方に見られた。

4. 以上の成績から、「ILT病変」はウイルスの上皮細胞内増殖により、一次性に惹起された細胞病変を根底として成立することが証明された。

第2章 実験感染鶏の気管上皮細胞の電子顕微鏡的所見

第1章の免疫組織学的観察の結果、ILTの喉頭・気管に出現する激しい滲出性病変は、ウイルスの上皮細胞内増殖により一次性に惹起された上皮細胞の病変を根底として成立することが証明された。本章では透過型電子顕微鏡を用いて、上皮細胞内における核内封入体形成とウイルス増殖の関係、あるいはウイルス粒子形成の過程など、感染細胞内の様相を経時的に詳細に検討した。

第1節 材料および方法

1. ウイルスとニワトリ

ILTウイルス352株鶏胚漿尿膜継代ウイルスを使用した。ニワトリは孵化直後から隔離飼育した健康な白色レグホン種雄ヒナを用いた。

2. 実験方法

55日齢ヒナ21羽の喉頭粘膜上に、 $10^{4.8}$ EID₅₀/mlの352株を0.01mlずつ滴下した。症状を観察しながら接種後3時間、ついで6、9、12、16、19、21、24、28、32、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90および96時間後に各1羽ずつ殺処分した。肉眼的観察を行なったのち、接種部に近い気管粘膜の一部を2%グルタルアルデヒド液と1%オスミウム酸液で二重固定した。法に従ってアルコールで脱水し、エポキシ包埋した。1μの厚切りトルイジン青染色標本で病変の観察を行なったのち、その部位の超薄切片を作製し、酢酸ウラニルおよび酢酸鉛による二重染色を施し、日本電子製100u型電子顕微鏡で観察した。なお残余の喉頭、気管は、2%グルタルアルデヒド液で固定したのちパラフィン包埋し、H・E染

色による組織学的観察を行なった。

第2節 成績

1. 症状および肉眼所見

ウイルス液を直接喉頭粘膜上に滴下した本実験では、異常呼吸は36時間から観察され、気嚢内に接種した場合よりも早期に出現した。肉眼的には、喉頭・気管粘膜は24時間から充血し、36時間では水腫性肥厚を示した。また36時間から管腔内に粘液が増量し、60時間以後の例では黄白色クリーム様の滲出物が粘膜面に附着した。また粘膜面に針頭大の出血巣が散在性に認められる例があった。これらの変化は、ウイルス液を滴下した喉頭とこれに続く気管の比較的上部に限られ、気管下部にまで波及することはなかった。また気管支、肺および気嚢には異常を認めなかった。

2. 電子顕微鏡的所見

接種後21時間までは気管上皮に特に異常を認めなかった。上皮細胞における集団的な核内封入体の出現、合胞体の形成などILT特有の組織学的所見は、接種後24時間の例から観察された。電子顕微鏡下の観察では、これらの特徴的上皮細胞所見に一致してILTウイルスの増殖を認めた。しかし全経過を通

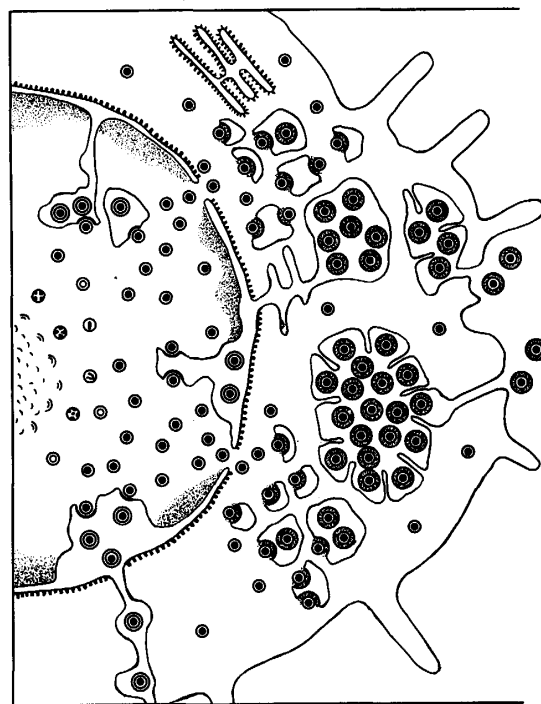


Fig. 2 Hypothetical scheme of the maturation of ILT virus in tracheal epithelial cell of the chicken

じて、上皮層および固有層内に多数出現する偽好酸球、リンパ球、大食細胞、プラズマ細胞および赤血球内には、ウイルス粒子は認められなかった。多数の標本の所見を総合した結果、上皮細胞内における I L T ウイルスの発育過程は、Fig. 2 の模式図のように想定された。

感染早期に出現する H・E 両染色性の核内封入体を含む細胞は、電顕像では核の腫脹とクロマチン顆粒の内側核膜への接近を示し、核内全域を占拠する電子密度の高い微細な無定顆粒の集団が観察された。このような核の所見を示す上皮細胞群は、細胞癒合に基づく合胞体の像を示した。すなわち、数個よりなる核集団が、あぜ道状の幅狭い細胞質を挟んで極めて接近した位置に並び、その間の細胞膜は完全に消失し、細胞質は連続して観察された。多数の合胞体の中には、密接した核間に細胞膜の一部がなお残存する像がまれに認められて、細胞癒合の過程にあるものと判定された。合胞体は粘液腺上皮細胞間あるいは粘膜上皮細胞間の癒合ばかりでなく、互いに隣接する両種の細胞が融合して形成されるものもあった。また合胞体と非感染上皮細胞間には明瞭な間隙が認められた。

核内全域を充満する微細な無定型顆粒の中に、電子密度の更に高いやや粗大な顆粒の集団が限局性に出現した。これらの顆粒集団中に多数のコアが出現することから、この部位は未熟ウイルスの合成部位と判定された。同部位に観察されるコアは、中空のリング状を示し、直径45~80nm、平均60nmの大きさであった。接種後28~32時間では、粗大な顆粒集団は増加し、カプシッドを有する未熟粒子が多数出現した。カプシッドの大きさは直径90~110nm、平均100nmで球状を示し、内部のコアの形態は中空のリング状、馬蹄形、桿菌状を呈するもの、あるいは1~5個、通常4個の小型粒子よりなりそれらの間隙が十文字様にぬけて見られるもの、更に電子密度の高いボール状のものなどさまざまであった。またコアの突起がカプシッド外に飛び出しておたまじゃくし様を呈するもの、あるいはコアを欠くものも散見された。36時間では電子密度の高いボール状のコアを含有する未熟粒子が目立ち、他の型のコアを有する未熟粒子は急激に減少した。未熟粒子は内側核膜近辺に多数見られた。またこの時期から核膜裂孔の拡張が起こり、36~48時間の例では多数の未熟粒子がそれら

の核膜裂孔を通過して細胞質内に移動しつつあるものと判定された。36~48時間の例では、未熟ウイルス粒子がエンベロープを獲得して成熟となる過程が観察された。

未熟粒子のエンベロープ獲得様式には、異なった2種の過程が認められた。第1は内側核膜を通過する際に獲得するもので、この型の成熟粒子は直径110~160nm、平均135nmの大きさの定型的二重膜粒子であった。第2は未熟粒子が細胞質内に移動した後、ゴルジ装置、小胞体など細胞質の膜を利用してエンベロープを獲得するもので、直径180~310nm、平均245nmの超大型粒子でエンベロープとカプシッドの間に電子密度の高い物質を満たし、また最外周にはスパイクが認められた。このように I L T ウイルスでは、ウイルスの成熟に2つの様式が認められ、その結果、大きさ、形態の著しく異なる2種類の成熟粒子が形成された。

上皮細胞の変性は48時間後から進行し、核内では微細な無定顆粒状物質が核中心部に集積し、核周辺部には明庭が出現した。この像は光学的顕微鏡所見の典型的な好酸性核内封入体に合致するものである。また細胞質領域には小器管の膨化、変性、崩壊に起因する小空胞が多数観察された。この時期には核内の未熟粒子は著しく減少し、他方多数の成熟粒子が細胞質の空胞内に観察された。杯細胞と判定される上皮細胞では、拡張した分泌顆粒の膜に多数の微絨毛が形成されて内腔に突出し、また内腔には成熟粒子が認められた。このように細胞質内には、成熟粒子を容れた多数の小空胞と、これらの小空胞が癒合したと考えられる大型の空胞が出現し、粘液腺上皮では核の大きさの数倍に達する大空胞がしばしば観察された。60時間以降では、上皮細胞の線毛脱落と上皮細胞の合胞体化が更に高度となった。上皮層から突出し、剝離寸前の状態にある合胞体では、細胞質内小器管の著しい変性、崩壊が観察されたが、このような変性上皮細胞の細胞質内にはなお多数の成熟粒子が認められた。96時間では合胞体の細胞膜の消失と細胞質の崩壊のため、空胞内のウイルス粒子は細胞外に放出され、また細胞質が全く空虚となり、核だけが残存する上皮細胞合胞体も観察された。

第3節 考察

I L T 感染細胞の電子顕微鏡による研究報告は、

あまり豊富ではない。**WATRACH**ら¹⁰⁷⁾は感染5日後の鶏胚漿尿膜病変部の変性上皮細胞内に、好塩基性を示して核内全域を占めるものと、好酸性で周囲に明庭を有するものの2型の封入体を認め、更にこれらの核内封入体を含む細胞に直径1~20 μ のエオシンに好染する細胞質内封入体を観察した。そして電子顕微鏡による観察では、核内に直径がそれぞれ40nmと80~100nmの2型の球状粒子を少数に、また細胞質内封入体内に直径150~240nmの大型粒子を多数認めた。彼らは詳細な経時的観察を行っていないが、粒子の形態を同一ウイルス群に属する単純疱疹ウイルスと比較して、核内のより大型の粒子はILTウイルスの成熟前期を物語り、更に成熟して細胞質内の粒子に移行するものと考えた。**DANNER**²⁸⁾も同様に漿尿膜病変を観察しているが、組織学的所見の推移を観察することが主要な目的であったため、ウイルスについては核内の種々の形態の未熟粒子と、細胞質内の大型の成熟粒子を認めるに止まっている。その後**PURCELL**⁸⁹⁾は、ILT本来の病変好発部位である気管粘膜を経日的に観察した結果、核内封入体含有細胞の合胞体化は癒合性変化に起因するとし、また光学的所見の推移を電顕的にも詳細に記載している。ウイルス粒子については、接種後3~5日の例の核内に**WATRACH**ら¹⁰⁸⁾が示す種々の形態の未熟粒子を、また内側核膜位と細胞質の空胞内にそれぞれ形態の異なる成熟粒子を観察した。そして内側核膜位に見られる成熟粒子は、核内の未熟粒子が同膜を通過することにより成熟したものと述べているが、細胞質内の大型成熟粒子についてはその由来を論じていない。これに対して**DAVIS**ら³⁰⁾は、ニワトリ腎培養細胞を用いてマレック氏病ウイルスとILTウイルスの発育状況を比較観察している。その結果、粒子の成熟は前者のマレック氏病ウイルスでは内側核膜を通過してなされるのに対し、ILTウイルスではそのほとんどのものが細胞質内の膜成分を利用してなされるという従来になかった前進した知見を明らかにした。

本実験では気管上皮細胞の経時的観察を実施することにより、集団的核内封入体出現、合胞体形成などILT特有の光学的所見に一致して、ILTウイルス粒子の発育の全過程を観察することが出来た。上皮細胞核内が未熟粒子の形成部位であることは、従来の諸家の報告に完全に一致し全く異論のないと

ころで、H・E両染色核内封入体の核内にウイルスの合成より未熟粒子形成に至る像を観察した。ウイルス粒子の成熟については、一部のものは**PURCELL**⁸⁹⁾の記載するように内側核膜を通過することによりなされた。しかしながら多数の未熟粒子は、**DAVIS**ら³⁰⁾の記載するように核膜裂孔を通過して細胞質内に移動し、ゴルジ装置や小胞体などの膜を利用して成熟した。このように本実験の成績から、ILTウイルスは2つの様式により成熟することが明らかとなった。感染末期の細胞質内には、エンベロープとカプシッドの間に電子密度の高い物質を充満した大型の成熟粒子が圧倒的に多数を占めるから、このように細胞質内でエンベロープを獲得し成熟した粒子が細胞傷害の主役を果たすものと思われる。一方、内側核膜通過によって成熟した粒子がどのような役割を有するかは全く不明で、更に検討を必要とする課題の一つである。

次に光顕的に好酸性を呈する核内封入体では、核内中心部に微細な無定型顆粒状物質が集積したが、核内の未熟粒子は著しく減少し、新たな未熟粒子の形成は極端に減退しているものと判定された。このように核内封入体の光顕所見の差異が電顕所見においても明瞭に証明され、2種の核内封入体所見は核内におけるウイルスの発育段階を如実に反映するものであることが証明された。なお**WATRACH**ら¹⁰⁷⁾は漿尿膜病変の観察により、核内封入体含有細胞内にエオシンに好染し、**FEULGEN**反応に弱陽性の細胞質内封入体出現を認めているが、筆者の気管上皮細胞の観察では光顕的にも、また電顕的にもそのような封入体を検出することはできなかった。

第4節 小括

気管上皮細胞内におけるILTウイルス粒子の発育過程を明らかにするため、55日齢ニワトリヒナ21羽の喉頭粘膜上にILTウイルスを接種し、接種後3時間より96時間まで経時的に殺処分した。肉眼的観察を行なったのち気管上皮細胞を電顕的に観察し、光顕所見と比較検討して以下の成績を得た。

1. 感染早期に出現する核内封入体は、光顕的観察ではヘマトキシリン・エオキシソール両染色性を示し、**FEULGEN**反応に弱陽性であるが、電顕下では腫脹した核内全域に充満する電子密度の高い微細な無定型顆粒状物質の集団として観察された。封入体内部

には多数の I L T ウイルスの未熟粒子を認めた。未熟粒子の直径は90~110nm、平均100nmで球状を示し、内部には馬蹄形、桿菌状、中空のリング状を呈するもの、あるいは4個の小型粒子よりなりそれらの間隙が十文字様にぬけて見えるもの、更に電子密度の高い球状物など、さまざまな形態のコアを含有していた。ウイルス接種後36時間では、電子密度の高い球状のコアを含有する未熟粒子が目立ち、その一部は拡張した核膜裂孔を通過して細胞質内へ移動するものと判定された。

2. 未熟粒子のエンベロープ獲得様式には、異なった2種の過程が認められた。第1は内側核膜を通過する際に獲得するもので、この型の成熟粒子は直径110~160nm、平均135nmの大きさの定型的二重膜粒子であった。第2は未熟粒子が細胞質内に移動した後、ゴルジー装置、小胞体など細胞質内の膜を利用してエンベロープを獲得するもので、この型の成熟粒子は直径180~310nm、平均245nmの超大型粒子で、エンベロープとカプシッドの間に電子密度の高い物質を満たし、また最外周にはスパイクが認められた。

3. 両染色核内封入体に遅れて出現するエオシン好性核内封入体が形成される段階では、未熟粒子は核内からほとんど消失したが、細胞質空内には多数の成熟粒子が観察された。

第3章 迅速診断法の検討

I L T は、現在では国内の至るところで常在化し、養鶏産業に多大の損害を与えている。本病は一度養鶏場内に侵入すると頑強に定着し、防疫に努めても根絶が容易でない疾患である。従って流行の早期に的確な診断を下して罹患鶏を淘汰し、遅滞なく厳重な対策を講じることが緊要である。

ところで伝染病診断には、1)臨床検査、2)病理検査、3)血清学的検査、4)病原学的検査など各種の方法を目的にかなった方向に組み合わせ、迅速に実施しなければならない。ニワトリの呼吸器病にはニューカッスル病、伝染性気管支炎、呼吸器型鶏痘、マイコプラズマ病、伝染性コリーザなど I L T 以外にも重要な伝染病が目白押しに並び、互いに極めて類似する症状を呈するため、鶏病技術者は日常の類症鑑別に頭を悩ますのである。従って I L T の診断を下すためにも、また I L T を否定するためにも、その迅速簡便な診断法が切望される。

筆者は第1章および第2章の成績を通じて、I L T の呼吸器粘膜上皮細胞に集団的に出現する核内封入体および同細胞の合胞体形成は、I L T ウイルスの体内増殖を如実に物語る特異な病変であることを確認した。そこで本章では、これらの特異的所見を迅速、確実に検出する方法として、病変部粘膜のスライド塗抹による診断法を検討した。

第1節 材料および方法

1. 喉頭・気管材料

I L T ウイルス352株を左側後胸気嚢内に接種した31日齢のニワトリ20羽と、野外から入手した自然感染鶏28羽、合計48羽の喉頭・気管を用いた。

2. 検査材料の塗抹法

喉頭・気管を正中線に沿って鋏で縦に二等分し、その一側を平板上に伸展し、粘膜面に附着する凝固血液や滲出物をピンセットで注意深く取り除いたのち、清潔な外科円刀により粘膜をかき取る。採取した粘膜をスライドガラス上に載せた上に、更にもう一枚のスライドガラスを重ね、指圧を加えて検査材料を十分にスライドガラス上に伸展し、そのままスライドガラスを左右にすべらせながら引き分けて塗抹を完了する。塗抹した標本は、生乾きの内に固定液に浸漬して固定し、次いで染色を行なう。

3. 実験の種類

実験1：固定液と染色液の選定

核内封入体検出に最も適した塗抹標本の固定法と染色法を選び出すため、病変最盛期である接種後4日の例12羽から前述の方法で塗抹標本を作り、Table 1 に示した10種類の固定法と7種類の染色法を組み合わせて検討した。

Table 1 Fixation and Staining, tested

Fixation	Staining
10% formalin	Hematoxylin·eosin
Alcoholic formalin	Hematoxylin·SHORR S ₃
Aceton	Orange G·eosin·toluidin blue
Ethanol	GIEMSA's solution
Methanol	Acridin orange
BOUIN's solution	FEULGEN's reaction
(Alcoholic BOUIN)	Pyronin·methylgreen
CARNOY's solution	
ZENKER's solution	
SCHAUDINN's solution	

実験2：塗抹標本による診断法の実用性の検討

人工感染例8羽（接種後2日、3日、4日、および6日経過例）と自然感染例9群28羽より塗抹標本を作り、実験1の成績から選び出された固定法と染色法を施した。また塗抹標本作製に用いなかった他側の喉頭・気管は、BOUIN固定、パラフィン包埋、薄切後H・E染色を施した。同一材料の塗抹、切片両標本を比較検討することにより、塗抹法の実用性を評価した。

第2節 成績

1. 固定液と染色液の選定

病的組織の塗抹標本では、組織を構成する多種類の細胞と病的に出現した各種の細胞や物質が一律に塗抹されるから、それらの細胞や物質が正確に識別されなければ検査は無意味になる。塗抹標本では切片標本と異なり、包埋、薄切など煩雑で時間のかかる操作はすべて省略されるが、反面固定や脱水、脱脂が不充分になり、染色不良を招きがちである。鮮明な細胞像を得るためには、染色液の吟味とともに優れた固定法の選定が重要である。これらの点に注意しながら検討した結果、Table 2に示す通りの成績を得た。

Table 2 Grades of utility of fixatives and staining methods tested

Most useful;	
Fixation	Staining
GENDRE's solution	Hematoxylin·eosin
More useful;	
Fixation	Staining
BOUIN's solution SCHAUDINN's solution ZENKER's solution Alcoholic formalin	Hematoxylin·eosin
Not so useful;	
Fixation	Staining
GENDRE's solution SCHAUDINN's solution BOUIN's solution ZENKER's solution Alcoholic formalin	Hematoxylin·SHORR S ₃ Orange G·eosin·toluidin blue
Useless;	
Fixation	Staining
CARNOY's solution 10% formalin Aceton Ethanol Methanol	Hematoxylin·eosin GIEMSA's solution FEULGEN's reaction Acridin orange Pyronin·methylgreen

昇汞を含有するSCHAUDINN液とZENKER液では、固定は良好で、いずれの染色液を用いても美しく染色された。殊に前者では固定中、アルコールによる脱脂がすみやかに進行するためか、鮮明な染色標本が得られた。しかし両固定液は昇汞を含有するため、固定終了後脱昇汞、脱ヨードなどの操作に手間をとる難点があった。ピクリン酸を成分とするGENDRE液とBOUIN液では、標本の染色性がやや好酸性に傾くが、細胞像は鮮明で上皮細胞の核内封入体は酸性色調に強く染み、封入体検出の点ではSCHAUDINN液、ZENKER液を使用した場合よりも一段と優れた成績が得られた。殊にGENDRE液では、封入体周囲に出現する明帯が極めて明瞭であった。他方、組織固定液として常用される10%ホルマリン水、血液塗抹標本や培養単層細胞標本などの固定に広く使用されるメタノール、アセトンでは、いずれの染色法を用いても細胞の染色性が不良となり、封入体の識別が困難であった。

染色法では、組織切片標本の基準であるH・E染色法が塗抹標本においても組織切片標本同様、優れた染色性を示し、極めて良好な成績を収めた。ヘマトキシリン・SHORR-S₃染色液は塗抹による犬ジステンパーの封入体検出に推奨されており、またオレンジG・エオシン・トルイジン青染色液は染色性が鮮やかなことから、切片標本の染色に賞用されている。本実験においてもこれらの2液を試みたところ、いずれの標本も美しく染色され、核内封入体の検出は可能であったが、H・E染色標本を凌駕する程ではなく、また簡便さではH・E染色法よりやや劣った。一方、従来各種の塗抹標本の染色に賞用されているGIEMSA染色液は、本実験では細胞変性に起因する上皮細胞のメチレン青過染が著明で、核内の観察を困難にし、核内封入体の検出には不適當であった。アクリジン橙染色、FEULGEN反応、ピロニン・メチル緑染色など核酸検出用の染色法では、細胞の一般形態の観察に難点があり、また標本中に混在するプラズマ細胞などに含まれる核酸が染色されるため、核内封入体の確認は著しく困難であった。

以上の通り、ILTの核内封入体の検出にはGENDRE液、BOUIN液、SCHAUDINN液、ZENKER液、のいずれかを用いた固定とH・E染色の組み合わせが優れるが、迅速、确实、簡便の三拍子そろった方法は、「GENDRE液固定、H・E染色」である。本法

によれば、塗抹から標本作製完了までの所要時間は90分以内である。

2. 塗抹標本の実用性

人工感染例8羽、自然感染例9群28羽、計36羽の喉頭・気管を用いて、前項で選定したGENDRE液固定、H・E染色による塗抹標本の実用性を同一材料の切片標本と対比しながら検討した結果、Table 3および4に示す通りの成績を得た。

Table 3 Detection of inclusion bodies on 8 experimental cases

Chicken No.	Days after inoculation	Inclusion bodies	
		Smear	Section
1	2	+	+
2	2	++	++
3	3	+++	+++
4	3	+++	+++
5	4	+++	+++
6	4	+++	+++
7	6	+	-
8	6	-	-

Remarks:

+++: Severe, ++: Moderate, +: Mild, -: Negative.

Table 4 Detection of inclusion bodies on 28 field cases

	Detection by section	Detection by smear		Total
		+	-	
	+	22 cases	1 case	23 cases
	-	3 cases	2 cases	5 cases
	Total	25 cases	3 cases	28 cases

人工感染例中、接種後2日、3日および4日経過の6例では、核内封入体は塗抹標本と切片標本の両者にほとんど同程度に検出された。6日例では、切片標本の観察が2羽とも陰性であったのに対し、塗抹標本では1羽が陽性を示し、後者の精度が勝るものと判定された。

自然感染例28羽はいずれも発咳、開口呼吸、喘鳴などの異常呼吸を呈し、また喉頭・気管粘膜には充・出血、水腫、滲出物の附着など高度の変化が観察され、最盛期の病徴を示した。これら28例中、核内封入体の検出が塗抹、切片両標本とも陽性であるも

の22例、ともに陰性であるもの2例、塗抹標本だけが陽性であるもの3例、切片標本だけが陽性であるもの1例であった。病徴から考えて全例に封入体が存在したものと仮定すれば、その検出率は塗抹標本で89.3% (28例中25例)、切片標本で82.1% (28例中23例) で、人工感染例の実験と同様、塗抹法が僅かに優れた成績を示した。

第3節 考察

ILTの特徴的病理学的所見を利用した迅速診断法は過去にいくつか報告されている。PIROZOK⁸⁶⁾は病変部組織のカーボワックスによる急速包埋法を、またSEVOIAN⁹³⁾はパラフィンによる急速包埋法をそれぞれ検討した。これらは組織の固定に始まり、脱水を経て包埋に至る一連の過程をできる限り短縮する試みで、マイクロームを使用することには変りない。一方、ARMSTRONG²⁾は塗抹法による核内封入体の検出に着眼し、病変部粘膜の塗抹標本をメタノールで固定し、GIEMSA染色を施して検討したが、満足な結果は得られず、報告の末尾に更に優れた固定法および染色法を期待すると述べている。

塗抹法によるILTの診断が可能であれば、パラフィン溶融器やマイクロームを使用する必要もなく、鶏病発生の現場で確実な診断を下すことができるから、筆者は塗抹法に当初から強く引かれた。しかしGIEMSA染色の追試は著しく不満足な結果に終り、またメタノール固定にH・E染色を組み合わせても封入体の検出は困難であった。このように各種の塗抹法や培養細胞の観察に常用されるメタノール固定後の染色では、ILTの核内封入体検出に使用できる標本は得られなかった。そこで筆者は、従来組織標本の観察に広く使用されている多種類の固定液と染色液を用いて、塗抹標本による核内封入体検出を再検討した。その結果、GENDRE液とH・E染色法の組み合わせにより、申し分のない結果が得られた。実験結果が示すように、本法によって組織切片標本の観察結果をむしろ凌駕する診断成績が得られた。その理由は次のように考えられる。

ILTの核内封入体は被検鶏の病期さえ適切であれば、喉頭・気管を中心として呼吸器粘膜に多数に、しかも集団をなして出現する。この時期には呼吸器粘膜は通常激しい炎性変化を呈するから、塗抹の際診断に有効な部位を選ぶことができる。この点ではIL

Tの診断は、スタンプ法による狂犬病NEGRI小体の検出、あるいは塗抹法による犬の伝染性肝炎の診断の場合に比較してはるかに好条件下にある。また巧みに塗抹すれば、1枚の塗抹標本中の観察可能な上皮細胞の数は、1枚の切片標本に比べてはるかに多い。喉頭・気管の切片標本では、壁の各層が観察できるように通常粘膜に直角な断面が作られるが、塗抹では粘膜面に平行な方向に多数の上皮細胞をかき取ることができるからである。ILTでは炎症最盛期に上皮の剝脱が激しいから、塗抹の利点は更に大きくように思われる。

以上のように本研究によって、确实、迅速、簡便で実用性の高いILTの診断法が選定された。

第4節 小括

ILTの迅速、簡便な診断法を確立するため、実験感染鶏20羽と自然感鶏28羽、計48羽の喉頭・気管粘膜をスライドグラス上に塗抹し、各種の固定法と染色法を用いて作製した標本について、本病の特徴的所見である核内封入体の検出成績を比較検討し、以下の結果を得た。

1. GENDRE、BOUIN、SCHAUDINN、およびZENKERの各固定法に、H・E染色を施した標本はいずれも鮮明な封入体像を示し、優れた方法であることが確認された。操作の点ではこれら4法中、GENDRE固定が最も簡便迅速で、これによれば塗抹から標本作製完了までの所要時間は90分以内である。

2. GENDRE液固定、H・E染色による塗抹標本の観察では、核内封入体の検出は切片標本の鏡検と比較して、封入体像の鮮明さでは遜色なく、検出率ではむしろ凌駕した。

3. 血液塗抹を始め、塗抹標本に常用されるメタノール固定とGIEMSA染色法では、試験したいずれの方法によっても鮮明な封入体像は得られず、ILTの診断には不適當であることが判明した。

4. 以上の成績から、ILTの塗抹標本による迅速診断に最適な方法として、GENDRE液（アルコール性BOUIN液）固定、H・E染色を選定した。最盛期の病徴を示す病鶏3羽以上に本法を応用すれば、ほぼ確実に診断を下すことができよう。

第4章 非経気道的接種法による 実験感染鶏の病理学的所見

ILTと同一のヘルペスウイルス群に属するウイルスを原因とする疾病のなかには、特徴的病変が感染部位ばかりでなく遠隔部位（例えば脳脊髄）に波及するものが多数知られ、またウイルスが親から胎仔へ伝達される垂直感染が証明されているものも少なくない^{21,83,117)}。

ILTの自然感染およびこれに近い状態と考えられる経気道実験感染では、特徴的病変は呼吸器粘膜と結膜に限定して発現し、遠隔組織への波及を確証した報告は極めて乏しい。このようにILTは一般に表面感染型のウイルス病と考えられている。この病態が絶対的であるかどうかを確かめるため、従来ILTの実験ではほとんど用いられていない4種の接種法によって感染実験を行ない、病変の分布状況を詳細に検討した。

第1節 材料および方法

1. ウイルスとニワトリ

ILTウイルス352株鶏胚漿尿膜継代ウイルス($10^{4.5}$ EID₅₀/ml)を、孵化直後より使用時まで隔離飼育した白色レグホン種雄ヒナに接種した。

2. 実験方法

4接種群を設定し、それぞれ1)翼下静脈内注射、2)大脳実質内注射、3)クロアカ肛門洞粘膜上塗抹および4)皮膚羽包内塗抹(大腿部の皮膚より羽毛を抜き取り、同部位にブラッシでウイルス液を塗抹)の4方法を用いて、上記ウイルス液を接種した。各群の個体数などの実験条件は、Table 5に示す通りである。

ウイルス接種後、症状を観察しながら経日的に殺処分した。肉眼的観察を行なったのち、全身臓器を10%ホルマリン水またはBOUIN液に固定した。法に従ってパラフィン薄切標本とし、主としてH・E染色、必要に応じてFEULGEN反応、PAS染色およびWILDERの鍍銀染色を施し、組織学的観察に供した。また肉眼的に病変が明らかであった部位の一部を、ドライアイス・アセトンにより冷却したN-ヘキサン中で凍結した。冷凍マイクロームを使用して4μの厚さに薄切し、直接蛍光抗体法による観察を行なった。更に一部の臓器についてウイルスの再分

Table 5 Experimental schedule

Experiment	No. of chickens	Age of chickens at inoculation	Exposure method	Dose ($10^{4.5}$ EID ₅₀ /ml)	Period of observation
1	23	64 days	Intravenous inoculation	0.1 ml	14 days
2	30	4 days	Intracerebral inoculation	0.1 ml	14 days
3	20	45 days	Cloacal brushing	0.4 ml	14 days
4	20	45 days	Feather follicle brushing	0.5 ml	16 days

Table 6 Summary of microscopic findings of the chickens inoculated with ILT virus via different routes

Experiment	Exposure method	Location of giant cell syncytia containing intranuclear inclusion bodies
1	Intravenous inoculation	Hepatic cells and epithelial cells of interlobular bile duct, Epithelial cells of thymic medulla
2	Intracerebral inoculation	Epithelial cells of choroid plexus and arachnoidal mesothelia, Hepatic cells and epithelial cells of interlobular bile duct
3	Cloacal brushing	Epithelial cells of cloacal proctodeum and bursal mucosa, Epithelial reticular cells of medulla of bursal follicle
4	Feather follicle brushing	Epithelial cells of feather follicle and feather root, Adjacent epidermal epithelial cells

離を試みた。

第2節 成績

4接種法による感染実験の結果、Table 6に示すように種々の部位に病変出現を認めた。しかしいずれの実験群においても、本来の病変好発部位である呼吸器粘膜および結膜には異常を認めなかった。表で明らかな通り、病変の出現部位は接種経路によって異なるため、成績の詳細は接種群別に分けて記述する。

1. 静脈内接種群

接種後1日では、ヒナは軽度の沈うつを呈したが、2日より回復した。その他には異常を示さなかった。肉眼的には3～6日の例の肝に、ケシの実大～粟粒

大の灰白色壊死巣が多発するのを認めた。

組織学的検査の結果、「ILT病変」は肝と胸線に出現した。肝の病変はFig. 3の模式図のように推移した。すなわち、2日例から核の腫脹と細胞質のエオシン濃染を呈する肝細胞の小集団が出現し、それらの核内に封入体を観察した。封入体には、(1)H・E両染色、FEULGEN反応に弱陽性を示し、腫脹した核内全域を占めるものと、(2)エオシン好性で周囲に明庭を有するもの、の2型があった。核内封入体は、3、4日の例をピークとして多数の肝細胞に出現し、周囲には充血および偽好酸球浸潤を認めた。

核内封入体を含有する細胞は単独に観察されることは極めてまれであり、数個以上が隣接して集合し、

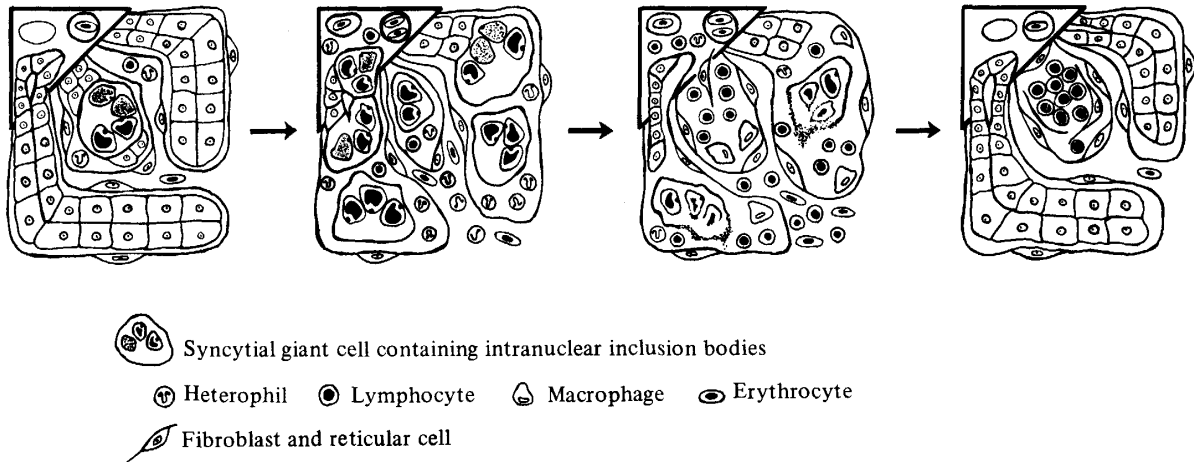


Fig. 3 Schematic presentation of hepatic lesion caused by intravenous inoculation

間もなく融合して合胞体を形成した。合胞体はやがて壊死に陥るため、5日例から肝には多発性の巣状壊死を認めた。小葉間胆管においても、一部の胆管上皮細胞に核内封入体が集団的に出現し、合胞体形成、管腔内への剝離脱落と推移した。KUPFFER細胞は腫大し、活性化像を呈したが、封入体は見られなかった。

肝細胞の崩壊、消失のため粗鬆化した巢内には、偽好酸球、リンパ球の浸潤が認められた。6日例では核内封入体は消失し、壊死巢内のリンパ球浸潤が高度となった。8日例からこれらの部位に大型の円形核細胞と細網細胞の増殖が起こり、12、14日の例ではリンパ母胞様の構造を示した。また病巣周辺部では、肝細胞索は腺胞様または偽胆管様形態を示し、肝細胞の不完全再生像と判定されたが、その発現は比較的軽度に止まった。

一方胸腺では、肉眼的には病変を認めることが困難であったが、組織学的病変は明瞭で Fig. 4 のように推移した。すなわち、2日例から髓質の HASSALL 小体に一致する上皮性細胞群は腫脹し、周囲に偽好酸球が浸潤した。3、4日ではこれらの腫脹した細胞内に核内封入体が集団的に出現した。上皮性細胞間の内腔は遊離した合胞体と多数の偽好酸球、リンパ球で満たされ、腔所は高度に拡張した。これらの変化と平行して髓質内のリンパ球は消失した。核内封入体は6日例以降は消失したが、上皮性細胞の崩壊、消失のため粗鬆化した髓質内には細網細胞の軽度の増殖を観察した。8、10日では髓質内の HASSALL 小体は扁平な再生細胞により構成され、内腔にはエオシン好性の細胞崩壊物を多量に満たした。12、14日の両例では、髓質内のリンパ球は回復し、また筋様細胞(myoide zellen) の軽度増数が見

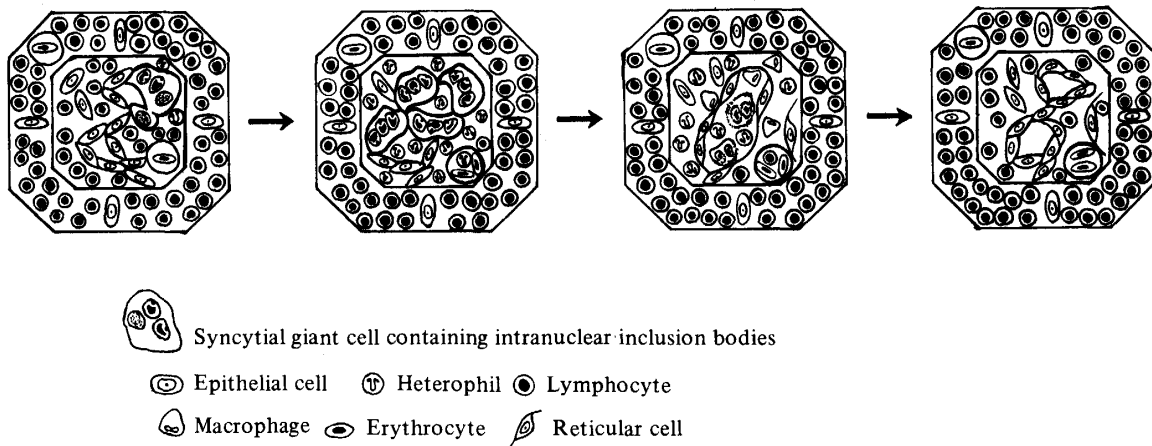


Fig. 4 Schematic presentation of thymic lesion caused by intravenous inoculation

られたが、その他には異常に乏しくほぼ正常に復帰した。このように胸腺では病変は髄質内に限って出現し、14日間の観察を通じて皮質領域にはほとんど異常を認めなかった。

3、4日の例の肝について実施した直接蛍光抗体法による観察では、核内封入体を含有する肝細胞および肝管上皮細胞に一致して、核内および細胞質内の両者に蛍光抗原が出現した。その他の細胞には蛍光抗原は観察されなかった。

4、5日両例の肝の一部を、滅菌した磷酸緩衝食塩水(PBS)で5倍乳剤とし、凍結融解処理後遠心分離し、得られた上清液を45日齢ヒナ4羽の左側後胸気嚢内に0.1mlずつ接種した。接種後2日よりヒナは激しい呼吸器症状を表わし、3日および4日後の病理学的検査では、全例の喉頭・気管粘膜は典型的な「ILT病変」を呈した。このように本群の4、5日例の肝には、ヒナを発病させるに十分な量のウイルスが存在することを証明した。

2. 脳内接種群

接種後1日では、ヒナは軽度～中等度の沈うつと採食不良を示したが、2日以降は回復した。肉眼的には全例の大脳実質に接種に起因する小出血巣を認めた。また5日以後の例の肝に、静脈内接種群と同様に針頭大壊死巣の多発を観察した。

組織学的検査の結果、「ILT病変」は脳では脈絡叢上皮細胞と大脳領域のクモ膜中皮細胞に出現した。肝では静脈内接種群と同一の所見を5、6日の例に認めた。また胸腺では5、6日の例の髄質に、上皮性細胞の腫脹と偽好酸球の多数浸潤を観察したが、核内封入体は確認されなかった。

大脳の接種部位には、注射針による組織の限局性破壊とその清掃機転を認めたが、神経細胞や膠細胞に核内封入体は観察されず、脳実質内には「ILT病変」は出現しなかった。脈絡叢の病変は、Fig. 5の模式図のように推移した。すなわち、脈絡叢上皮細胞には接種後1日目に早くも限局性ながら、腫脹と特徴的な核内封入体が所見され、2日例ではその数を増した。3日および4日例では、数個の核内封入体を含有する合胞体が最も多数観察された。この時期には脈絡叢毛細血管は充血し、結合織層は水腫と高度の偽好酸球、リンパ球の浸潤のため著しく増幅した。上皮細胞が合胞体化して集団的に剝離した部位では、上皮の基底膜は脳室面に露出し、偽好酸球、リンパ球、大食細胞および漿液の腔内滲出のため、脳室腔は軽度に拡張した。5日例では核内封入体は、脳室内に剝離、脱落した合胞体内に限って観察され、それらの細胞が崩壊した6日例では封入体は消失した。8日例では扁平な上皮細胞による再生が始まり、14日では立方上皮による上皮の再生が完了した。この時期には脳室内の滲出物は消失し、また結合織層では偽好酸球、リンパ球の浸潤は軽減し、これと入れ替って大型の円形核細胞が限局性に増殖した。12日および14日例では、これらの細胞増殖巣はリンパ汔胞様構造を示した。このように脈絡叢上皮細胞にはILT特有の病変が出現したが、発生学上近縁である上皮細胞には異常を認めなかった。

一方、クモ膜と軟膜の「ILT病変」は、脈絡叢の病変に比べてかなり軽度であった。核内封入体は1～5日の例のクモ膜中皮細胞に観察された。大多数はH・E両染色性を示し、周囲に明庭を伴う好酸性

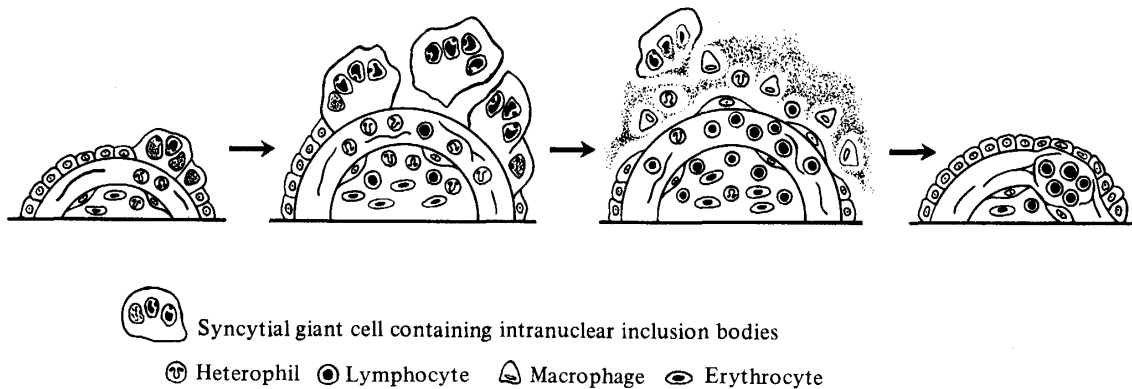


Fig. 5 Schematic presentation of the lesion of choroidal plexus caused by intracerebral inoculation

封入体はごく少数であった。核内封入体を含む細胞の合胞体化は3～5日の例に認められ、周囲には少数の偽好酸球およびリンパ球が浸潤した。核内封入体が消失した6日以降は、軟膜の血管周囲に少数のリンパ球が浸潤するに止まり、リンパ滲胞形成や結合繊維増生などの変化は認められなかった。

5、6日の例の肝に出現した「ILT病変」は、静脈内接種群より約2日遅れて出現したが、質的に良く一致する所見を示し、その程度は更に高度であった。核内封入体が消失した8日以降の反応性変化も、静脈内接種群と全く同様であった。

3. クロアカ内接種群

接種後ヒナは臨床的には異常を示さなかったが、肉眼的には接種部位のクロアカ肛門洞粘膜は2日例より充血し、3～5日では高度のカタルを呈した。またファブリシウス嚢(BF)は、3～5日で軽度で腫大し、粘膜は充血とカタルを呈し、嚢腔内には白色の粘液が貯溜した。しかし8日例からBFは萎縮性に傾き、実験最終日の14日では対照例が母指頭大であるのに対して小指頭大に縮小した。

組織学的検査の結果、「ILT病変」はクロアカ肛門洞粘膜とBFに限局して認められ、隣接するクロアカ尿管および糞洞粘膜、クロアカリップに波及することはなかった。接種後1日では、クロアカ肛門洞粘膜はブラッシによる刺激のため、粘膜表層部の剝離と漿液の滲出を示したが、早くもその部位に残存する上皮細胞に多数のH・E両染色性核内封入体が出現した。2日および3日例では、多数のエオシ

ン好性核内封入体が粘膜の広範囲にわたって認められ、合胞体の形成を伴った。固有層は高度に充血し、多数の偽好酸球およびリンパ球浸潤を認めた。上皮細胞の合胞体化とその剝離は4日例でピークを示したが、核内封入体は5日例で陰性となり、上皮細胞が剝離、欠損した粘膜面には偽好酸球、リンパ球、大食細胞および漿液の著しい滲出が観察された。6日例では扁平な再生上皮細胞が粘膜面を被覆し始め、8日例から上皮の再生は更に旺盛になった。

一方、BFにおけるILT病変は、Fig. 6に示すように推移した。接種後1日例から核内封入体は、リンパ滲胞接合部の上皮網に集団をなして出現した。また2日例ではすみやかに周囲の粘膜上皮細胞に波及するとともに、リンパ滲胞の皮質・髓質境界層に位置する上皮性細胞にも出現した。粘膜固有層およびリンパ滲胞髓質内には、著しい水腫と偽好酸球を主とする細胞浸潤を認めた。しかしこのような「ILT病変」は粘膜の表層に近接したリンパ滲胞に限って出現し、深部の滲胞は全く異常を示さなかった。核内封入体の出現は3～5日をピークとし、粘膜面では上皮細胞合胞体の剝離が高度で、偽好酸球、大食細胞および漿液の著しい滲出を伴った。リンパ滲胞髓質内では、「ILT病変」の進行に伴って固有のリンパ球は崩壊、消失した。6日例からリンパ滲胞接合部が広く開口し、髓質内の壊死に陥った細胞、偽好酸球および漿液からなる滲出物はこの開口を経てBF腔内に排出された。髓質内の壊死性変化が高度に進行したリンパ滲胞では、皮質内のリン

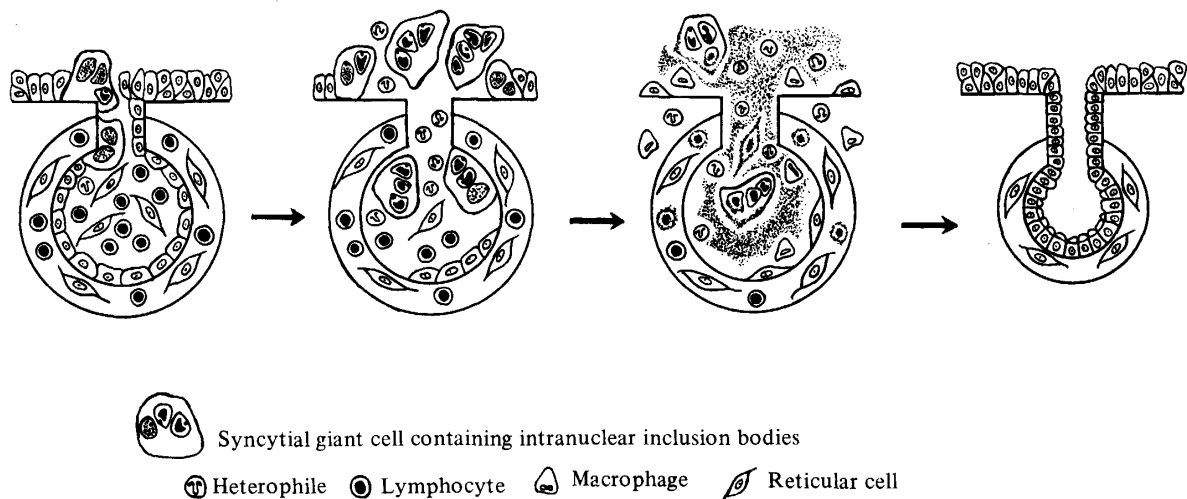


Fig. 6 Schematic presentation of bursal lesion caused by cloacal brushing

バ球も崩壊したが、皮質領域には「ILT病変」が出現することはなかった。8日以降では封入体は、粘膜およびリンパ滲胞内の双方から消失し、リンパ滲胞髄質では上皮の再生による嚢胞化が進行した。リンパ球が消失した皮質では、細網細胞だけが残存し、スポンジ様の構造を示した。14日例では粘膜表層に比較的近接した領域に、単層の立方または円柱上皮からなる嚢胞が散在した。このようにILTウイルスの侵襲を受けたリンパ滲胞の髄質は嚢胞に、皮質はこれを取り囲む薄い結合織性被膜に変貌した。これらの所見は、生理的に萎縮退行したBFの様相と類似した。

2～4日の例のBFについて直接蛍光抗体法による検査を実施した結果、ILT病巣に一致して多量の蛍光抗原を認めた。その他の細胞には蛍光抗原は観察されなかった。

4. 羽包内接種群

接種後1日では、ヒナは軽い沈うつを示したが、2日以降は回復した。1日および2日例では接種部の羽包に出血を認めたが、PBSを塗抹した対照例にも同様に出現し、羽毛を除く際に生じたものと判定された。ウイルス接種部の羽包は3～10日の間腫脹し、特に4～6日の例では粟粒大～米粒大の隆起として観察された。

組織学的検査の結果、ILT特有の病変は接種部の羽包を中心として出現し、Fig. 7に示すように推

移した。「ILT病変」は、接種後1日で早くも羽包表層部の上皮細胞に認められ、周囲に少数の偽好酸球浸潤を伴った。この所見は4、5日をピークとして羽包表層部はもとより、深部の基底細胞にまで波及して広範囲に出現した。更に病変は羽毛除去の際に途中で切断し、羽包内に残された羽毛根にも出現した。核内封入体は羽毛根の角化した上皮を除いて、外羽鞘から羽髓に接する円柱上皮層に至る上皮の各層に観察された。また経過とともに羽包に接する表皮胚芽層上皮細胞にも波及した。周囲結合織層には充血と偽好酸球、リンパ球の著しい浸潤を認めた。核内封入体を含有する上皮細胞の合胞体化は、5日例が最も高度であったが、これらの変性上皮細胞集団は短時間内に壊死に陥り崩壊するため、6日例では封入体は著しく減少した。羽包腔には上皮細胞合胞体およびその崩壊物、偽好酸球、大食細胞および漿液からなる滲出物が貯溜し、内腔は高度に拡張した。また表皮胚芽層内に上皮細胞の変性、壊死による小空隙が出現し、空隙内に封入体含有細胞集団の脱落と偽好酸球、リンパ球および大食細胞の侵入を認めた。核内封入体は羽包内では8日例から、また表皮胚芽層内では10日例から認められなくなった。8日例の羽包腔内には、なお多量の滲出物が貯溜し、これを取りまいて多数の異物巨細胞が出現したが、これらの巨細胞には核内封入体は出現しなかった。羽包周囲結合織層にはリンパ球、プラズマ細胞の著

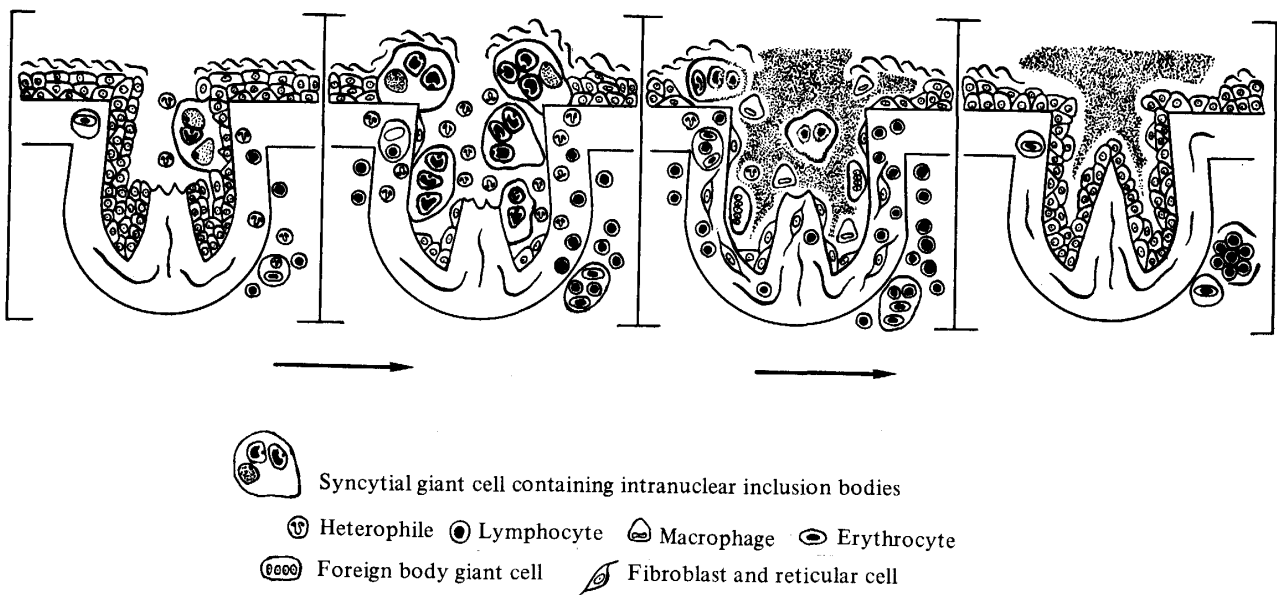


Fig. 7 Schematic presentation of feather follicle lesion caused by feather follicle brushing

しい浸潤と細網細胞、線維芽細胞の旺盛な増殖が認められた。10日以降では羽包上皮細胞の再生を観察した。14、16日の例では上皮細胞は完全に再生し、周囲結合織層の偽好酸球、リンパ球浸潤は軽減し、これと入れ替ってリンパ滲胞の形成と結合織線維の軽度増殖を認めた。以上の通り、接種部の羽包には激しい病変が観察されたが、接種部位に限局し、周囲あるいは更に離れた部位の羽包や表皮に病変が波及することはなかった。

3～5日の例の接種部皮膚に実施した蛍光抗体法による観察では、「ILT病変」を呈する羽包および表皮の上皮細胞に一致して、黄緑色に輝く強い蛍光抗原の出現を認めた。

3、4日両例の接種部皮膚の一部を、水性ペニシリン500 IU/ml、硫酸ジヒドロストレプトマイシン200 γ /mlを含有するPBSで5倍乳剤にし、凍結融解処理後遠心して得た上清液を、11日卵齡の鶏胚漿尿膜上に0.1mlずつ接種した。その結果、接種後4日には漿尿膜外胚葉に大型の白色ポックが出現し、ILT特有の組織学的所見が証明された。

ILTウイルス羽包内接種後14日の2例の免疫性を確かめるため、その左側後胸気嚢内にILTウイルス352株を再接種したが、2例とも全く異常を示さなかった。PBSを羽包内に塗抹し14日経過後、同一ウイルスを接種した対照2例は、3日から典型的な呼吸器症状を示して発病した。このようにウイルスを皮膚羽包内に塗抹することにより、ニワトリは免疫を獲得し、再感染を防禦することが証明された。

第3節 考察

ヘルペスウイルス群に属するウイルスに起因する疾患は少なくない。国内に発生する身近なものとしては、ILTのほかマレック氏病^{34,35,46,112}、馬鼻肺炎^{59,60,61,96}、牛伝染性鼻気管炎^{84,97}、犬ヘルペスウイルス感染症^{43,70,80}、猫ウイルス性鼻気管炎^{32,54,90}、および人の単純性疱疹^{1,117}などがある。また国外では、ウシ・ブタ・ヤギ・ネコ・ラットなど広範囲の動物が罹患する仮性狂犬病^{21,83}、ウシの潰瘍性乳頭炎⁷³、アヒルペスト (duck virus enteritis)⁷²、ハトのヘルペスウイルス感染症^{23,24,25}などが同一ウイルス群のウイルスに起因する疾患として知られている。いずれの疾患においてもヘルペスウイルス感染症に特有の核内封入体が出現し、ウシの潰瘍性乳頭

炎など一部の疾患では、細胞癒合による巨大な合胞体が形成される。

単純性疱疹はヒトの皮膚、口唇部および陰部粘膜などに水疱やびらんを形成する疾患で、通常はこれらの病変部の上皮細胞に特異的核内封入体が観察される^{82,83,119}。しかしまれには封入体は神経細胞、膠細胞、血管内皮細胞、肝細胞、KUPFFER細胞、脾の洞内皮細胞、副腎皮質細胞に出現し、致死的経過を取ることが知られている^{1,109,116,119}。牛伝染性鼻気管炎では、通常呼吸器粘膜または生殖器粘膜に渗出性炎が発現するが^{64,65,85,99}、ウイルスはこれらの部位から白血球や神経を介して中枢神経など種々の部位に病変を形成することが可能である^{3,29,41,48,75,76,94}。また妊娠期の感染では流産が惹起され、胎仔の種々の部位に特徴的病変が出現し、ウイルスの垂直感染が証明されている^{63,65}。馬鼻肺炎はウマヘルペスウイルス1型のウイルスに起因する若ウマの急性呼吸器病で、気道に一過性の炎症を起こすが³³、本病においてもウイルスは血流に乗り^{14,75,87}、妊娠後期の感染では流産を起こし、流産胎仔の肺・肝・脾およびリンパ節には核内封入体を伴った病変が出現する^{60,61,108}。犬ヘルペスウイルス感染症およびハトヘルペスウイルス感染症では、特徴的病変は呼吸器粘膜、脾および肝など各種の部位に観察される^{24,25,43,70,71}。マレック氏病では病理発生はやや異なるが、やはり全身諸臓器に病変が観察されている²²。このようにヘルペスウイルス群のウイルスによる疾患の大多数が、定型的あるいは非定型的に全身的感染を起こすことが知られている。

一方ILTでは、自然感染は呼吸器粘膜または結膜より起こり、ウイルスと接触した局所粘膜の上皮細胞には核内封入体が出現し、激しいカタル性炎あるいは出血性炎を呈する^{4,47,55,88,92,101,116}。この結果、呼吸道は著しく狭窄され、罹患鶏は呼吸困難の症状を示し、多数が窒息死に至る。JORDAN⁵⁶の調査では罹患鶏の8～21%が死亡し、またTRIPATHYら¹⁰³は死亡率は通常10～20%、重度な感染では70%にも達すると記載している。このように本病は激しい急性呼吸器病であるが、呼吸器および結膜以外の部位への波及はほとんど証明されていない^{16,58,66,69,91}。また哺乳動物の胎仔感染に相当する介卵性伝染も認められていない¹²。

筆者は自然感染の状態には程遠い方法であるが、

静脈内、大脳実質内、クロアカ肛門洞粘膜上および皮膚羽包内の4接種法によりニワトリの感染実験を行なった。その結果、脳、胸腺、肝、BF、クロアカ肛門洞粘膜および羽包など従来報告されていない多数の部位に「ILT病変」が出現するのを観察した。すでに古く HUDSON⁴⁹⁾、BEAUDETTE⁷⁾、B-EACH⁶⁾はクロアカ粘膜を、また MOLGARD⁷⁹⁾は皮膚をそれぞれILTの生ワクチン接種部位として検討している。その際、いわゆる“Vaccine take (善感)”の判定指標としてクロアカおよびBFでは粘膜の充血とカタル性変化が、また皮膚では羽包の腫脹がそれぞれ記載されている。筆者の観察により、それらの部位がILTウイルスに感受性を有し、「ILT病変」を呈することが明らかにされ、過去の報告に病理組織学的根拠を与えた。

本実験の各群の成績を比較すると、「ILT病変」の出現部位は接種方法に明らかに支配され、それぞれ異なった成績を示した。唯一の例外は、静脈内接種と脳内接種の両群に共通して、肝細胞と胆管上皮細胞にウイルス侵襲を裏付ける所見が得られたことである。脳内接種群における肝の特異病変は、静脈内接種群に比べて約2日遅れて発現したから、脳内接種群では接種後やや時間をおいて、肝病変を惹起するほどのウイルスが血中に移行したものと推定される。また脳内接種群の5、6日例の胸腺髄質では、核内封入体は確認されなかったが、上皮性細胞の腫脹と偽好酸球浸潤を認め、静脈内接種群の胸腺髄質のように明瞭ではないがウイルス侵襲の可能性を残した。これ以外ではクロアカ内接種群におけるクロアカ肛門洞粘膜とBF、羽包内接種群における羽包上皮・羽毛上皮と隣接表皮、脳内接種群における脈絡叢上皮とクモ膜中皮というように接種部近傍の組織内の特定細胞がILT感染を示した。クロアカ肛門洞粘膜が陽性であるのに尿洞および糞洞粘膜は陰性であり、また脈絡叢上皮が陽性であるのに神経細胞、膠細胞はよとより上皮細胞は陰性であるというように、近接または類似する細胞でも微妙な感受性の差異を示した。

本病の自然感染または実験的呼吸器感染では、「ILT病変」は呼吸器粘膜に局限し、肝、胸腺、脈絡叢など内部組織に波及することはなく、また逆に静脈内接種・脳内接種・クロアカ内接種および羽包内接種では、自然感染における病変好発部位である呼吸

器と結膜には全く異常がないことが判明した。この所見はILTウイルスの体内拡散に循環系および神経系の関与が乏しいことを示唆し、ウイルス側、生体側双方の各種の要因を検討することの必要性を示す。第1章と本章とに記述した蛍光抗体法所見は、病巣の上皮性細胞にはウイルス抗原を豊富に認めたにもかかわらず、上皮以外の構成細胞や遊走細胞は全く陰性であったことを示している。従ってILTにおいて、感染部位から遠隔部位への非連続的な病巣の拡散が実験感染においてもかなり起こりにくい一因として、ILTウイルスが白血球・細網細胞・血管内皮細胞などの間葉系細胞では容易には増殖し得ないものと考えられる。その結果、ウイルスは感染部位近傍の上皮内で増殖するに止まり、感受性を秘めた遠隔部の細胞には容易には到達できないのではなかろうか。

前記^{43,70,71)}の犬ヘルペスウイルス感染症では、核内封入体が上皮細胞ばかりでなく、血管内皮細胞を始め各種の間葉系細胞や神経細胞、膠細胞にも出現し、この事実は本病の特徴である全身感染の病理発生と密接に関連するものであろう。表面感染型のウイルス病であるILTと、全身感染型の犬ヘルペスウイルス感染症とは、この意味で互いに対極に位置する2疾患と考えられる。

ILTはこのように一般的には表面感染の様式を取り、局所粘膜の急性炎性病変に終始する疾患である。従って自然感染下では、本実験で見られたような現象が起こる可能性は極めて乏しいものと考えられる。しかしながら本研究によってILTウイルスが、接種法に応じて各種の組織、細胞に侵襲性を示すことを証明し、本ウイルスが保有している潜在能力の一端を明らかにすることができた。

第4節 小括

ニワトリの呼吸器および結膜以外の臓器・組織のILTウイルスに対する感受性を明らかにするため、総計93羽のニワトリにILTウイルスを静脈内、大脳実質内、クロアカ肛門洞粘膜上および皮膚羽包内の4方法を用いて接種し、経日的に病理学的観察を行ない以下の成績を得た。

1. 静脈内、大脳実質内および皮膚羽包内接種の各群は、接種後1日では軽度の沈うつを示したが、2日以降回復した。自然感染の際に好発する発咳、

喘鳴、喀血などの激しい呼吸器症状並びに結膜症状は、いずれの接種群においても観察されなかった。

2. 静脈内接種群では、肝細胞、胆管上皮細胞および胸腺髄質の上皮性細胞に「ILT病変」を認め、肝では肉眼的にもこれに基づく小壊死巣が多発した。

3. 脳内接種群では、クモ膜中皮細胞、脈絡叢上皮細胞、肝細胞および胆管上皮細胞に「ILT病変」を認め、肝の所見は静脈内接種群のそれと一致した。

4. クロアカ内接種群では、クロアカ肛門洞粘膜上皮細胞、BFの粘膜上皮細胞およびBFリンパ滲胞髄質の上皮性細胞に「ILT病変」が出現したが、激しい滲出炎を伴ない、BFリンパ滲胞髄質のリンパ球は崩壊消失した。この結果、実験末期にはBFは萎縮性となり、リンパ滲胞の嚢胞化が進行した。

5. 羽包内接種群では、羽包上皮細胞、羽毛根の上皮細胞および羽包に接する表皮胚芽層細胞に「ILT病変」が出現し、羽包腔内に滲出物が貯溜するため、接種後3~10日の間、接種部の羽包は著明に腫大隆起した。

6. 以上のようにそれぞれの接種法に応じて、各種の細胞に「ILT病変」が出現するという新知見を得たが、全群を通じて自然感染の際の病変好発部位である呼吸器粘膜と結膜には、全く異常を認めなかった。

第5章 発育鶏卵内接種による胚子病変

発育鶏卵は、最初WOODRUFFとGOODPASTURE⁽¹¹⁾により鶏痘ウイルスの培養に用いられ、次いで同じ著者ら⁽⁹⁾によってワクチニアウイルスと単純性疱疹ウイルスの培養に応用された。その後、おびただしい研究者により各種のウイルスについて鶏胚培養が検討され^(8,13,17,18,27,38,39,45,76)、現在ではウイルスの分離、同定、定量、抗原作製、ワクチン製造など、ウイルス学の基礎、応用両面に重要な役割りを果たしている。

ところで発育鶏卵の漿尿膜は、ILTウイルスに対して高い感受性を示し、肉眼的にも明瞭なポックを形成するので、ILTの研究に広く用いられている^(10,11,15,36,40,57,95)。しかし漿尿膜以外の部位については報告に乏しく、わずかに羊膜腔内接種により胚子呼吸器に病変を観察したBURNETら⁽⁹⁾の簡単な記載を見るに過ぎない。

第4章で述べたように、ILTウイルスを各種の

方法によって接種したニワトリでは、従来記載のない多数の部位に「ILT病変」が出現するという成績が得られた。本章ではILTウイルスが発育中の鶏胚子に、どのような病変を惹起するかを明らかにするため、各種接種法による感染実験を行なった。

第1節 材料および方法

1. ウイルスと発育鶏卵

ILTウイルス352株鶏漿尿膜継代ウイルス(10^{4.5} EID₅₀ / ml)を使用した。ILTの汚染経験がない一種鶏場より、白色レグホン種有精卵を入手し、これを37°Cで孵卵した。

2. 実験方法

発育鶏卵20個を一群として、上記ウイルス液を(1)漿尿膜上(接種時の卵齢、10日)、(2)羊膜腔内(同、11日)および(3)卵黄包内(同、4日)の3群にそれぞれ0.1mlずつ接種した。胚子の活力、生・死を観察しながら、接種後1日より経日的に割卵した。肉眼的観察を行なった後、10%ホルマリン水で固定した。15日齢以後の胚子は、すべて5%蟻酸加10%ホルマリン水により脱灰した。法に従ってパラフィン薄切標本作製し、H・E染色を主とする組織学的観察を行なった。また肉眼的観察で病変出現が明らかであった臓器の一部を、凍結切片による直接蛍光抗体法検査に供し、蛍光抗原の所在を観察した。

第2節 成績

実験成績の概要はTable 7に示す通りである。漿尿膜上および羊膜腔内接種群では、多種類の組織にILT特有の病変が出現した。得られた成績を以下に、群別に記述する。

1. 漿尿膜上接種群(以下CAM群)

接種後2日から漿尿膜は充血し、3日では水腫性に肥厚した。また外胚葉側に直径2~4mmの円形の白色巣が多数出現した。4日例から白色巣は、中心部の表面が壊死性となり、周囲に充血と肥厚を伴う限界明瞭な環状の大型ポックに発育した。漿尿膜に白色巣が出現した3日から、胚子の運動性が弱まり、以後の日齢では発育不良を示した。6日以後の例では、肝に針頭大の壊死巣が多数観察された。

組織学的検査の結果、集団的核内封入体出現、合体形成などの「ILT病変」は、漿尿膜では2日例から外胚葉上皮細胞に出現し、3、4日では著しく

Table 7 Summary of microscopic finding of the developing chicken embryo

Experiment	Route of inoculation	Location of giant cell syncytia containing intranuclear inclusion bodies
1	Onto chorioallantoic membrane	Ectodermal epithelial cells of chorioallantoic membrane, Hepatic cells and epithelial cells of interlobular bile duct, Epithelial cells of oral mucosa, pharyngeal mucosa, esophageal mucosa, gland of proventriculus, proctodeum mucosa, bursal mucosa, uriniferous tubules and thymic medulla
2	Into amniotic cavity	Hepatic cells and epithelial cells of interlobular bile duct, Epithelial cells of feather follicle and feather root, Epithelial cells of conjunctival mucosa, nasal mucosa, infraorbital sinus mucosa, oral mucosa, pharyngeal mucosa, laryngotracheal mucosa, bronchial mucosa, tertial bronchial mucosa, air sac mucosa, esophageal mucosa, gland of proventriculus, pancreatic acini, pancreatic ducts, bursal mucosa and proctodeum mucosa, Adrenal medullary cells
3	Into yolk sac	None

増数した。しかし4日例からこれらの封入体を含有する上皮細胞集団は、剥離しないままの状態に陥り、相次いで崩壊した。周囲の結合織層には著しい充血、円形細胞、大食細胞の多数出現および線維芽細胞の増殖があり、明らかな炎性反応を認めた。5日以後の例では線維芽細胞の増殖が旺盛となり、残存する核内封入体含有上皮細胞集団は、新生肉芽組織内に埋没して観察された。

一方胚子領域では、「ILT病変」は4日例から肝に明瞭に出現し、経過の観察が容易であった。すなわち4日例の肝では、核の種脹、核のヘマトキシリン過染と細胞質のエオシン過染を呈する肝細胞小集団が小葉内に散在し、それらの核内にはH・E両染色性の封入体が出現した。封入体を含有した肝細胞小集団は5日例で著しく増数し、周囲に充血と少数の偽好酸球浸潤、類洞内皮およびKUPFFER細胞の腫脹を認めた。類洞内皮細胞やKUPFFER細胞には核内封入体は出現しなかった。5日例では肝細胞核内の封入体は、H・E両染色性の型とエオシン好性で周囲に明庭を有する型の2型が観察された。これらの変性肝細胞小集団は、小葉周辺部、殊にGLISSON鞘に接して好発する傾向があり、やがて合胞体化し、ついには崩壊して消失した。この結果、6日以後の例では肉眼的にも明瞭な小葉状壊死が出現した。こ

の時期には核内封入体は、一部の小葉間胆管上皮にも集団的に出現した。小葉間胆管の内腔は、封入体を含有する合胞体の脱落と偽好酸球の滲出のため、やや拡張性になった。また周囲結合織層に多数の好酸性顆粒球と偽好酸球浸潤を観察した。実験最終日である10日例では、肝細胞の崩壊、消失のため粗鬆化した病巣内に偽好酸球、円形細胞の多数浸潤と細網細胞増殖を認めた。以上の肝病変に加えて、経過を追った観察はできなかったが、7～10日例では口・咽頭・食道・クロアカ肛門洞・BFの粘膜上皮細胞、腺胃の固有胃腺上皮細胞、胸腺の上皮性細胞および腎の尿細管上皮細胞に「ILT病変」の出現を認めた。

肉眼的に壊死巣の多発を認めた6、7日両例の肝と7日例のBFの一部を凍結薄切標本にして、蛍光抗体法検査に供した結果、各臓器内の核内封入体含有細胞集団に一致して、黄緑色の強い蛍光抗原が確認された。その他の細胞には蛍光抗原は観察されなかった。

2. 羊膜腔内接種群 (以下Am群)

接種後3日から胚子の運動性が急激に弱まり、5から死亡する例が出現した。肉眼的には胚子は、著しい發育不良を示した。また皮膚の充血、水腫と羽毛の發育不良を認めた。6日以後の例の肝には、漿

尿膜上接種例と同様に針頭大の灰白色壊死巣が多発した。

組織学的検査の結果、羊膜と漿尿膜にはともに異常を認めなかった。ILT特有の病変は胚子の羽毛、羽包および表皮などの外皮と肝に好発し、外皮では3日例から、また肝では5日例から明瞭に観察された。すなわち3日例の外皮では、羽毛の外鞘および円柱上皮細胞、羽包上皮およびそれに隣接する表皮胚芽層の各細胞は高度に腫脹し、核内にH・E両染性を呈する封入体が集団をなして出現した。4日例から核内封入体はエオシン好性のものが増数した。またこれらの核内封入体を含有する上皮細胞集団は、外皮に広範囲にわたって認められた。周囲結合織層には著しい充血、水腫と少数の偽好酸球浸潤を観察した。核内封入体を含有する上皮細胞の合体化と剝離は5日例に高度であった。この結果、5日例から羽毛の崩壊と表皮の剝離、欠損が起こり、高度な例では出血も認められた。

5～10日の例の肝には、前述の漿尿膜上接種群の所見に全く一致する「ILT病変」が出現した。以上の外皮および肝の病変に加えて5～10日例では、病変推移の観察はできなかったが、結膜上皮細胞、鼻腔・副鼻腔・喉頭・気管・幹気管支・第3次気管支・第3次気管支憩室・気囊・口・食道・クロアカ肛門洞・BFの粘膜上皮細胞、腺胃の固有胃腺上皮細胞、脾の腺胞上皮細胞、脾管上皮細胞および副腎髓質細胞の各細胞にILT特有の病変が出現した。

接種後5～7日の例の皮膚および肝の一部に実施した蛍光抗体法検査では、ILT特有の組織学的所見を示す細胞集団に一致して、核および細胞質の双方に蛍光抗原の出現を観察した。

3. 卵黄包内接種群 (以下YS群)

本実験では4日卵齡の卵黄包内にウイルス液を接種したが、接種後の胚子の運動性や発育には異常を認めなかった。接種後1～14日までの18例を組織学的に検査した結果、漿尿膜、羊膜、卵黄包および胚子のいずれの部位にも異常を認めなかった。また割卵せずに孵卵を続けた2例は、接種後18日(孵卵22日)で正常に孵化し、以後は順調に発育した。このように卵黄包内接種群では、胚子は正常な発育過程を示した。

第3節 考察

BURNET¹⁵⁾はILTウイルスを発育鶏卵の漿尿膜上に接種した結果、漿尿膜の外胚葉上皮細胞にILT特有の病変が出現することを発見した。更に彼とFOLEY¹⁶⁾はILTウイルスの羊膜腔内接種により、胚子の気管、肺および気囊に特徴的病変が出現することを報告した。しかし彼らの研究では、ILTウイルス、オウム病病原体とインフルエンザウイルスの鶏胚呼吸器に対する侵襲性を比較検討することが目的であったため、それ以外の病変の観察は行っていない。

本章では先の第4章のニワトリにおける成績を基礎にして、発生中の鶏胚子の未成熟な組織ではどのような変化が現われるかを明らかにするため、従来各種ウイルスの接種に常用されている漿尿膜上(CAM群)、羊膜腔内(Am群)、および卵黄包内(YS群)の3接種法を使用して発育卵内接種実験を実施した。その結果、CAM群とAm群では肉眼的にも肝には明瞭な病変が出現し、また組織学的には両群の胚子の各種の組織細胞にILT特有の病変が観察された。しかしYS群では胚子、胚子被膜および胚子器管のいかなる部位にも病変は認められなかった。

胚子被膜については、CAM群の接種部位である漿尿膜外胚葉上皮に、接種後2日から早くも「ILT病変」が出現し、以後肉眼的にも明瞭なポックに発達し、従来の報告通りの変化を示した。これに反してAm群の接種部位である羊膜外胚葉上皮およびYS群の卵黄包内胚葉上皮は病変を欠き、また3群を通じて尿膜内胚葉上皮など接種部以外の胚子被膜には全く病変を認めなかった。このようにILTウイルスに対して、漿尿膜外胚葉上皮が他の被膜とは異なって著しい親和性を持つことが確認された。

次に胚子では、Am群において接種により直接ウイルスに暴露された羽毛、羽包および表皮には接種後3日から「ILT病変」が出現し、その進行とともに5日では肉眼的にも羽毛の崩壊と表皮の剝離欠損、出血が認められた。第4章に記述したようにILTウイルスをニワトリの皮膚羽包内に塗抹すれば、羽包と羽毛根の上皮には典型的な「ILT病変」が出現し、羽包に接した表皮胚芽層に波及したが、この場合角化した表皮組織は羽包組織に比べて傷害の範囲が狭く、またその程度が軽かった。胚子では表

皮と羽包、羽毛の傷害の度合いはより近似した。この差異は一つには羊膜腔内に接種されたウイルスに対して胚子の全体表が暴露されるという胚子の環境条件にもよるであろうが、分化の進んでいない外皮とその附属器官がILTウイルスに対して、ほぼ類似した感受性を示すことにもよるであろう。CAM群の胚子が外皮に病変を示さなかったことから、この群では羊膜液へのウイルスの移行は早期には起きていなかったものと考えられる。

胚子の肝においてはCAM群では接種後4日から、Am群では5日から明瞭な「ILT病変」が出現し、6日以降では肉眼的にも明視される微細な壊死巣が多発した。病巣の分布状態から考えてウイルスが血行性に肝に到達したことは明らかで、CAM群では漿尿膜外胚葉上皮のポックから、Am群では外皮などの一次病巣から波及したものと判定される。この両群において胚子の肝細胞および胆管上皮細胞が示した高度の感受性は、今後のILTウイルス鶏胚感染実験の際、大いに利用することのできる注目すべき所見であろう。

経日的に追跡することはできなかったが、上記以外の極めて多種類の胚子組織に「ILT病変」が出現した。これらの内、Am群の結膜・鼻・副鼻腔・口・食道・クロアカ肛門洞などの粘膜上皮の病変は、羊膜腔内のウイルスが直接到達した結果である可能性が高い。またCAM群の胸腺および腎の病変、Am群の脾および副腎の病変は肝病変と同様にウイルスの血行性侵入に起因するものであろう。その他の病変については直接波及と血行性侵入の両ルートが考えられ、これを明らかにするためには更に詳細な経時的観察にまたねばならない。ニワトリの成体の実験では「ILT病変」は、内胚葉および外胚葉から分化した上皮細胞の一部に出現するに止まったが、胚子ではCAM群における中胚葉性の腎の尿細管上皮細胞を含めて、極めて多種類の組織がILTウイルスに対して感受性を示すことが明らかとなった。また成体に比べて胚子では血行性の病巣拡散がよりたやすく成立するものと推定された。

卵黄包内接種法は、同一ウイルス群に属するマレック氏病ウイルスや七面鳥ヘルペスウイルスに応用され、漿尿膜や胚子の種々の部位に病変が出現することが記載されている^{37,105)}。本実験のYS群ではそのような成績は得られなかった。すでに古くBRAN

-DLY⁹⁾は、ILTウイルスを10日卵齡の卵黄包内に接種した結果、接種後5日以降ではウイルスは回収されず、また接種卵から正常なヒナが孵化することを認めている。本実験の成績からもILTでは、ウイルスが卵黄を経て胚子に伝達され、介卵感染をひき起こす可能性は極めて乏しいものと推定される。

第4節 小括

ILTウイルスに対する鶏胚子の感受性を明らかにするため、ILTウイルス352株を發育鶏卵の漿尿膜上(20個)、羊膜腔内(20個)および卵黄包内(20個)にそれぞれ接種し、経日的に観察して以下の成績を得た。

1. 漿尿膜上接種群では、接種後3日例から漿尿膜外胚葉側に白色の壊死性ポックが出現した。また6日以後の胚子の肝には針頭大の壊死巣の多発を認めた。組織学的にはILT特有の病変は、漿尿膜外胚葉の上皮細胞、肝細胞および胆管上皮細胞に好発し、また口・咽頭・食道・クロアカ肛門洞・BFの粘膜上皮細胞、腺胃の固有胃腺上皮細胞、胸腺の上皮性細胞および腎の尿細管上皮細胞にも出現した。

2. 羊膜腔内接種群では、5日より死亡するものがあつた。胚子は發育不良を示し、皮膚の充血、水腫と羽毛の發育不良を認めた。また6日以後の例の肝には、漿尿膜上接種群と同様に微細壊死巣が多発した。組織学的には、ILT特有の病変は羽毛の外鞘と円柱上皮細胞、羽包上皮細胞、肝細胞および胆管上皮細胞に好発し、また結膜・鼻腔・副鼻腔・喉頭・気管・幹気管支・第3次気管支・第3次気管支憩室・気囊・口・食道・クロアカ肛門洞・BFの粘膜上皮細胞、腺胃の固有腺上皮細胞、脾の腺管上皮細胞、脾管上皮細胞および副腎髓質細胞にも出現した。

3. 卵黄包内接種群では、胚子および胚子被膜に肉眼的にも組織学的にも全く異常を認めず、胚子は正常に發育した。

第6章 ILTウイルスに対する ウズラの感受性

養鶏産業上の被害が大きいニューカッスル病では、ニワトリのほか、ホロホロチョウ・シチメンチョウ・クジャク・キジ・ウズラ・ハト・アヒルなどキジ目、ハト目、ガンカモ目にわたる多種の鳥類が罹患

し、時にはヒトも感染する²⁰⁾。これに対し I L T では、ニワトリ以外にはキジ^{50,67)}、キジとニワトリの雑種⁵⁰⁾、クジャク⁴²⁾の自然感染とシチメンチョウの実験感染^{98,110)}が証明されているにすぎない。

ウズラはニワトリと同じくキジ目キジ科に属し、日本ではニワトリに次ぐ産業用家禽として飼育されている。近年、実験動物としての適性が注目され、研究に用いられる機会は増加の傾向にある。ウズラが I L T ウイルスに対してどのように反応するかは、学理、応用の両面で興味あるテーマである。これに関する報告は極めて乏しいので、筆者は各種の接種法により I L T ウイルスをウズラに接種し、ウズラの感受性を主として病理学的見地から検討した。

第1節 材料および方法

1. ウイルスとウズラ

ウイルスは I L T ウイルス 352 株鶏胚漿尿膜継代ウイルス ($10^{4.8}$ EID₅₀ / ml) を使用した。ウズラは孵化直後より隔離飼育した 27 日齢のニホンウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) 雄ヒナを用いた。

2. 実験方法

接種には 7 種の方法を試みた。Table 8 に示すように 7 実験群を設定し、(1) 結膜囊内滴下 12 羽、(2) 鼻腔内滴下 12 羽、(3) 喉頭粘膜上滴下 13 羽、(4) 左側後胸気嚢内注射 12 羽、(5) 大脳実質内注射 10 羽、(6) クロアカ肛門洞粘膜上塗抹 20 羽、(7) 皮膚羽包内塗抹 22 羽、総計 101 羽に上記ウイルス液をそれぞれ 0.05~0.2 ml ずつ接種した。

ウイルス接種後、症状を観察しながらクロアカ内および皮膚羽包内接種群では、接種後 1 日から 12 日まで経日的に殺処分した。その他の接種群では接種

後 1 日から 5 日まで殺処分した。肉眼的観察を行なったのち、全身諸臓器を 10% ホルマリン水に固定し、法に従ってパラフィン薄切標本を作製した。H・E 染色を主に、必要に応じて各種の染色を施し、組織学的観察を行なった。なお肉眼的観察により、病変が明らかであった気嚢内接種 3 日例の肺、脳内接種後 3~5 日の例の肝、皮膚羽包内接種後 4、5 日例の皮膚からそれぞれ凍結切片を作製し、直接蛍光抗体法による観察を行なった。

第2節 成績

気嚢内、脳内および皮膚羽包内接種の 3 群は、接種後 1、2 日では中等度の沈うつを示したが、3 日以降は回復した。鼻腔内、結膜囊内、喉頭粘膜上およびクロアカ内接種群の 4 群は異常を示さなかった。ニワトリの自然感染や気道内接種実験の例に必発する発咳、喘鳴、喀血などの呼吸器症状は、全群を通じて全く認められなかった。

Table 9 に病理学的所見を総括した。以下群別に所見を述べる。

1. 結膜囊内接種群 肉眼的には異常を認めなかった。組織学的には接種後 1 日および 2 日の例において、接種側の結膜上皮細胞の腫脹、周囲結合織層の充血と軽度の偽好酸球浸潤を観察したが、核内封入体は確認されなかった。

2. 鼻腔内接種群 肉眼的には、接種部はもとより、他の部位にも異常を認めなかった。組織学的には、接種後 2 日の 1 例において、鼻粘膜と鼻涙管の上皮細胞に核内封入体の集団的出現および合胞体形成を認め、周囲結合織に充血と偽好酸球、リンパ球の浸潤を観察した。しかし他の 11 例には、I L T の

Table 8 Experimental schedule

Experiment (Group)	No. of quail	Exposure method	Dose ($10^{4.8}$ EID ₅₀ /ml)	Period of observation
1	12	Intranasal instillation	0.05 ml	5 days
2	12	Instillation into conjunctival sac	0.05 ml	5 days
3	13	Instillation onto laryngeal mucosa	0.1 ml	5 days
4	12	Into air sac injection	0.1 ml	5 days
5	10	Intracerebral injection	0.05 ml	5 days
6	20	Cloacal brushing	0.1 ml	12 days
7	22	Feather follicle brushing	0.2 ml	12 days

Table 9 Summary of microscopic findings of the quail inoculated with ILT virus via different routes

Experiment (Group)	Exposure method	Location of giant cell syncytia containing intranuclear inclusion bodies
1	Intranasal instillation	Epithelial cells of nasal mucosa and lacrimal duct
2	Instillation into conjunctival sac	None
3	Instillation onto laryngeal mucosa	None
4	Into air sac injection	Epithelial cells of air sac mucosa, primary, secondary and tertiary bronchi and air capillaries
5	Intracerebral injection	Hepatic cells
6	Cloacal brushing	None
7	Feather follicle brushing	Epithelial cells of feather follicle and feather root Adjacent epidermal epithelial cells

特異病変を認めることはできなかった。

3. 喉頭粘膜上接種群 肉眼的にも組織学的にも全く異常を認めなかった。

4. 気嚢内接種群 肉眼的には、ウイルスを接種した左側の後胸気嚢、同側の前胸気嚢および腹気嚢は充血、肥厚を示し、粘膜面には少量の粘液と白色クリーム様滲出物が附着していた。また左肺は中等度から高度の充血、水腫を呈した。しかし非接種側の気嚢および肺には異常を認めなかった。

接種後2日例からウイルスを接種した左側の後胸気嚢および同側の前胸気嚢、腹気嚢において、一部の上皮細胞は腫脹し、それらの核内にH・E両染色およびエオシン好性の2型の核内封入体を観察した。核内封入体を含む上皮細胞は集団をなして認められ、3、4日の例ではこれらの変性上皮細胞集団は合胞体化し、粘膜面より剥離した。また菲薄な結合織層は充血、水腫および偽好酸球、リンパ球、大食細胞の多数出現のため、高度の肥厚を示した。5日例では核内封入体は消失し、上皮細胞の欠損した粘膜面を大食細胞、偽好酸球および漿液よりなる滲出物が被覆し、また結合織層にリンパ球の著しい浸潤と線維芽細胞の増殖を観察した。

一方左肺では「ILT病変」は、2日例より第3次気管支および憩室の上皮細胞に出現した。3日例では更に毛細気道上皮、第1次および2次気管支上

皮の各細胞にも観察された。また周囲に著しい充血、水腫と偽好酸球およびリンパ球の高度の浸潤を認めた。第3次気管支および憩室の内腔は、剥離した上皮細胞合胞体（核内封入体を含む）、偽好酸球および漿液よりなる多量の滲出物の貯溜のため、拡張を呈した。4、5日の例では炎性変化は引き続いて高度で、剥離性滲出性の気管支肺炎の像を呈したが、核内封入体は消失していた。

3日例の左肺の一部を蛍光抗体法により検査した結果、核内封入体を認める気管支上皮、憩室上皮および毛細気道上皮の各細胞に一致して、核および細胞質の双方に黄緑色の強い蛍光抗原の出現を観察した。

以上の通り、ウイルスを接種した左側の後胸気嚢、同側の前胸気嚢、腹気嚢および肺に激しい「ILT病変」を観察したが、上方の喉頭・気管に波及することはなく、また右側の肺および気嚢にも異常を認めなかった。ニワトリを用いた気嚢内接種実験では、「ILT病変」は接種部の気嚢からすみやかに肺、気管支、気管および喉頭に拡散するが、ウズラではそのような現象は認められなかった。

5. 脳内接種群 全例の脳実質に接種による小出血巣と、限局性の組織崩壊を観察した。ILTウイルスを脳内接種したニワトリに見られた特異病変、すなわち、脈絡叢上皮細胞およびクモ膜中皮細胞内

の核内封入体出現は、ウズラでは全く認められなかった。

接種後3～5日の例の肝に、肉眼的にも針頭大の白色壊死巣が散在するのを認めた。組織学的には、2日例から類壊死に陥った肝細胞小集団が散在性に出現し、それらの細胞核内に封入体を観察した。核内封入体が出現した肝細胞は、核の腫脹と核膜のヘマトキシリン濃染が著明で、細胞質はエオシンに濃染した。また周囲に充血と少数の偽好酸球浸潤を観察した。3、4日の例においても核内封入体を含む肝細胞を多数認めたが、これらの封入体含有肝細胞は細胞癒合により合胞体化し、ついには崩壊に陥った。このようにして肝には多発性小壊死巣が出現し、同部位には多数の偽好酸球、リンパ球浸潤を認めた。また KUPFFER 細胞は腫脹を呈したが、核内封入体は出現しなかった。ニワトリにおける実験成績とは異なり、ウズラでは胆管に「ILT病変」が出現することはなかった。5日例では肝細胞の核内封入体は消失し、肝細胞脱落のため粗鬆化した病巣内に、リンパ球の高度浸潤と細網細胞増殖を認めた。

3～5日の例の肝の一部に実施した蛍光抗体法による観察では、3、4日両例の核内封入体を含む肝細胞小集団に一致して蛍光抗原の出現を認めた。その他の細胞には蛍光抗原は観察されなかった。

6. クロアカ肛門洞粘膜上接種群 ウイルスを塗抹した肛門洞粘膜および隣接するBF粘膜、更にその深部にあるBFリンパ濾胞には、肉眼的にも組織学的にも全く異常を認めなかった。このような陰性所見は、ニワトリにおける場合と全く相反する結果であった。

7. 皮膚羽包内接種群 接種後3日から接種部の羽包は腫脹し、4、5日の例では散在する粟粒大の隆起として観察された。組織学的には接種後1日より12日までの経日的観察の結果、「ILT病変」はウイルスを塗抹した領域の羽包を中心として明瞭に発現し、ニワトリを用いた実験に極めて類似する成績を得た。核内封入体は、接種後1日例から早くも羽包底部の表層上皮細胞に集団的に出現し、周囲に少数の偽好酸球、リンパ球の浸潤を伴って観察された。2日例ではILT病巣は更に広がり、3日例では羽包内広範囲の上皮細胞に認められた。羽包上皮層深部の基底細胞および羽毛除去の際、羽包内に残され

た羽毛根の円柱上皮細胞にも明瞭に出現した。これらの細胞集団はすみやかに合胞体を形成した。4、5日の例では核内封入体は、羽包に接する表皮胚芽層にも多数出現した。この時期には羽包内の封入体を含む合胞体は、表層から相次いで剝離し崩壊に陥った。この結果、羽包腔には剝離した合胞体、偽好酸球、リンパ球、大食細胞および漿液からなる滲出物が多量に貯溜し、羽包内腔は高度の拡張を呈した。羽包周囲結合織層には高度のリンパ球浸潤と、細網細胞および線維芽細胞の増殖を認めた。核内封入体は羽包内で6日以降、また表皮胚芽層では8日以降それぞれ消失した。8日例の羽包腔内には引き続き多量の滲出物が見られたが、滲出物直下には単層の扁平な上皮細胞が再生を開始し、10日例では旺盛な上皮の再生を認めた。12日例では上皮層はほぼ正常な構造に復帰したが、周囲結合織層には大型円形核細胞からなるリンパ濾胞様の構造を観察した。

4、5日両例の接種部皮膚について実施した蛍光抗体法検査では、羽包並びに表皮胚芽層内の核内封入体を含む上皮細胞集団に一致して、蛍光抗原の出現が確認された。

第3節 考察

ニワトリ以外の動物に対するILTウイルスの感染実験は必ずしも豊富ではないが、シチメンチョウ、ウズラ、カラス、アヒル、ホロホロチョウ、ハト、ムクドリ、スズメなどの鳥類と、ウサギ、モルモット、ラット、マウスなどの哺乳動物について検討されている^{5,11,31,91}。

SEDDON⁹¹はシチメンチョウ、ウズラ、アヒル、ムクドリ、ハト、スズメの気管内に、またモルモット、ウサギ、ラット、マウスの咽頭内にそれぞれILTウイルスを接種したが、いずれの動物にも発病を認めなかった。また気管内接種後10日のウズラ、14日のムクドリの各気管乳剤を正常なニワトリに接種したが、ニワトリは発病しなかった。またシチメンチョウ胚子がILTウイルスに感受性を有するというBRANDLY¹¹¹の報告に示唆されて、WINTERFIELD¹¹⁰はシチメンチョウの結膜囊内または鼻腔内に接種して、結膜炎や鼻洞炎を起こすことに成功した。

筆者はウズラがニワトリに近縁な種属でありながら、従来の報告ではILTウイルスに対する感受性

が肯定されていないことに検討の余地があるものと考え、7種の接種法を用いてILTウイルスに対する感受性を検討した。その結果個体レベルでは、一部の接種群が不明瞭な病徴を示すに過ぎなかったが、組織レベルの観察においてはそれぞれの接種法に応じて気嚢、および第1・2・3次気管支の粘膜上皮細胞と毛細気道上皮細胞（気嚢内接種群）、肝細胞（脳内接種群）、羽包上皮・羽毛根上皮・表皮胚芽層の各細胞（羽包内接種群）は「ILT病変」を鮮明に表現した。このように各種の接種法を用いることによって、自然感染ではILTウイルスに接触する機会に乏しいと考えられる体内細胞に潜在する感受性を探知することができた。

一方、第1章および第4章に記載したように同一方法で接種されたニワトリにおいて、激しい「ILT病変」が見られた喉頭・気管粘膜、クロアカ肛門洞粘膜、BF、脈絡叢はウズラでは全く病変を欠き、またニワトリの自然感染の際、病変が好発する鼻腔および結膜の粘膜もごく軽微な病変を示すに止った。また気嚢内接種群において、病変は接種側の気嚢と第1・2・3次気管支と毛細気道の上皮細胞に止まり、他側の気嚢や肺に侵入することなく、また更に上方の気管・喉頭に波及することもなかった。このようにニワトリではILTウイルスの主要な侵入門戸である結膜・鼻腔・喉頭・気管の粘膜上皮細胞が、ウズラではILTウイルスに対して極端に低い感受性を示す結果になった。この成績から考えて、自然界ではウズラのILT感染はさほど容易には成立しないであろう。しかし実験的にせよ、ウズラ体内の各種の細胞に容易にILT特有の病変を惹起し得たことは有意義であろう。また本実験の成績は、まれであってもウズラがILTウイルスの保有者あるいは伝播者となり得なくもないことを示唆する。

ILTの宿主域に関する過去の研究は、本病ウイルスに対する各種動物の感受性を検討する際、ニワトリの病態だけを基準にして判定した傾向が強い。同一种の病原体による感染であっても、宿主が異なれば病態も大いに異なり得ることは病原微生物学の常識である。例えばヘルペス群ウイルスに属するBウイルスは、サルでは軽度の口内炎を起こすに過ぎないが、ヒトでは致死的な激しい脳炎を惹起する²¹⁾。ILTの宿主域についての今後の研究には、このような視点に留意して注意深く吟味することが必要で

あろう。

第4節 小括

ウズラはニワトリに近縁であるにもかかわらず、ILTウイルスに対する感受性が証明されていない。これを詳細に検討するため、27日齢の日本ウズラ総計101羽を7群に区分し、ILTウイルスを、(1)結膜嚢内滴下、(2)鼻腔内滴下、(3)喉頭粘膜上滴下、(4)左側後胸気嚢内注射、(5)脳実質内注射、(6)クロアカ肛門洞粘膜上塗抹、(7)皮膚羽包内塗抹、の7種類の方法によって接種し、経目的に殺処分して病理学的観察を行ない、以下の成績を得た。

1. 気嚢内、脳内および羽包内に接種した3群は、接種後1、2日で沈うつを示したが、3日以降は回復した。結膜嚢内、鼻腔内、喉頭粘膜上およびクロアカ内に接種した4群は病徴を示さなかった。

2. 喉頭粘膜上接種群とクロアカ内接種群は組織学的にも全く異常を示さず、また結膜嚢内接種群と鼻腔内接種群は極めて軽微な病変を呈するに過ぎず、同一方法で接種されたニワトリが、いずれの群においても激しい「ILT病変」を表わした事実ときわだった差異を示した。このようにニワトリではILTウイルスの重要な侵入門戸である結膜・鼻腔・喉頭・気管の粘膜上皮が、ウズラではILTウイルスに対して極端に低い感受性を示す結果になり、ILTの自然感染はウズラでは容易には成立しないであろうと推定された。

3. 気嚢内接種群では、肉眼的に明瞭な気嚢炎と肺の充血、水腫が認められ、組織学的には、気嚢および肺の第1次・第2次・第3次気管支の粘膜上皮および毛細気道上皮に「ILT病変」が明らかであった。

4. 脳内接種群では、肝に小壊死巣の多発を認め、組織学的にもその領域の肝細胞に「ILT病変」が明らかであったが、脳では陰性であった。

5. 羽包内接種群では、肉眼的に接種部の羽包の腫脹、隆起が著しく、羽包上皮・羽毛根上皮・表皮胚芽層の各細胞に「ILT病変」が出現し、同一方法で接種されたニワトリの羽包所見と一致した。

5. 気嚢内接種群の接種後3日例の左肺、脳内接種群の3～5日の例の肝、および羽包内接種群の4、5日例の皮膚について蛍光抗体法検査を実施した。その結果、いずれの検査材料においても「ILT病

変」に一致して特異抗原を確認した。

6. 以上のように、従来 I L T ウイルスに対する感受性が証明されていないウズラにおいて、ウイルス接種法を工夫することにより、多種類の細胞に「I L T 病変」を惹起することができた。

総 括

本研究は次の諸点を背景として計画された。

1. 長年にわたって日本は I L T 非汚染地域であったため、本病に対する一般の関心は薄く、国内では研究対象として取り上げられることがほとんどなかった。吉村と筆者の大阪地方における I L T の発生報告(1964年)¹¹³⁾ を契機として、本病に対する認識が急速に高まり、この分野の報告は国内においても著しく増加してきた。しかしその大半は簡単な発生報告か、あるいはワクチンの開発を含めた病原サイドの報告であった。SEIFRIED (1931年)⁹²⁾ によって築かれた I L T の古典的病理学を乗り越えた病理学的研究は、国外においても乏しかった。

2. 大規模化した現在の養鶏産業においては、伝染病の防除は事業の成否を左右する重要なポイントとなっている。鶏病のなかでも最も発生頻度が高く、被害の大きい伝染性呼吸器病には、多数の疾患が含まれ、その類症鑑別は極めて重要である。この意味で I L T に関しても、迅速確実な診断法の確立が要望された。

3. I L T ウイルスと同様に、ヘルペスウイルス群に属するウイルスを原因とする疾病の中には、特徴的病変が感染部位ばかりでなく、遠隔の部位(例えば脳脊髄)に波及するものが多数知られ、またウイルスが親から胎仔へ伝達される垂直感染が証明されているものも少なくない。一般に表面感染型のウイルス病と考えられている I L T に、このような現象が全く存在し得ないか否かを確かめることは学理的意義を有する。そのためには自然感染における病変好発部位(呼吸器と結膜)以外の臓器組織、並びに胚子の各組織の I L T ウイルスに対する感受性を検討することが必要であると考えた。

4. I L T ウイルスに対するニワトリ以外の動物の感受性に関する研究報告は極めて乏しい。この方向の研究の手始めとして、ニワトリに近縁であるウズラを取り上げることが適当であると考えた。

以上の諸理由に基づいて遂行された本研究の内容は以下のように要約される。

1. I L T 実験感染鶏の喉頭・気管粘膜を免疫組織学的並びに電子顕微鏡的に検討した結果、これらの粘膜の上皮細胞に出現する一連の病理学的所見は、その細胞内における I L T ウイルスの増殖の様相と密接に関連しながら進行することを明らかにした。(第1章および第2章)

2. I L T 病変の特徴的所見である核内封入体および合胞体の検出を指標として、本病の迅速診断法を検討した。その結果、被検鶏の喉頭・気管粘膜を材料とした各種の塗抹標本作製法のうち、GENDRE 液固定法とヘマトキシリン・エオシン染色法の組み合わせが、最も優れた方法として選定された。この方法に従えば、塗抹から90分以内に標本ができあがり、鶏病発生の現場で極めて簡便に実施し、確実な診断を下すことが可能となった。(第3章)

3. 各種の非経気道的接種法を用いてニワトリの感染実験を行なった結果、自然感染あるいは実験的経気道感染では従来病変が確認されていない多種類の組織に「I L T 病変」を惹起することができた。通常自然感染では、このような部位に「I L T 病変」が発現する可能性は極めて少ない。しかし実験的に本ウイルスに直接暴露されることによって、肝細胞あるいは脈絡叢上皮細胞など深部臓器の各種の細胞が高い感受性を示すことは、ヘルペスウイルス群の一員である I L T ウイルスの潜在的侵襲力を証明するものと考えられた。(第4章)

4. I L T ウイルスの漿尿膜上接種および羊膜腔内接種によって、ニワトリ胚子の各種の細胞に「I L T 病変」が出現するという新知見を得た。しかし卵黄包内接種では、胚子および胚子被膜には全く異常を認めなかった。(第5章)

5. I L T ウイルスに対する感受性が証明されていないウズラにおいて、本ウイルスの気嚢内接種では気嚢・気管支および毛細気道の上皮細胞に、脳内接種では肝細胞に、羽包内塗抹では羽毛上皮・羽毛根上皮および表皮の各細胞に明瞭な「I L T 病変」が形成されるという新知見を得た。(第6章)

謝 辞

稿を終るにのぞみ、本研究を遂行するに当たり、終始温かい御指導と御助言を賜った大阪府立大学

農学部家畜病理学講座・望月宏教授に深甚の謝意を表します。また有益な御助言を賜った大阪府立大学農学部家畜解剖学講座・橋本善之教授、同家畜微生物学講座・尾藤行雄教授に衷心より深謝します。

引用文献

- 1) 青山友三(1974). Herpes group virusesによる感染の病理. ウイルス, 24, 73-75.
- 2) ARMSTRONG, W.H. (1959). A slide smear technique for the diagnosis of laryngotracheitis. *Avian Dis.*, 3, 80-84.
- 3) BAGUST, T. J., and CLARK, L. (1972). Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Path.*, 82, 375-383.
- 4) BANG, G.G., and BANG, F.B. (1967). Laryngotracheitis virus in chicken. A model for study of acute nonfatal desquamating rhinitis. *J. Exp. Med.*, 125, 409-428.
- 5) BEACH, J.R. (1931). A bacteriological study of infectious laryngotracheitis of chickens. *J. Exp. Med.*, 54, 801-809.
- 6) BEACH, J.R., SCHALM, O.W., and LUBBEHUSEN, R.E. (1934). Immunization against infectious laryngotracheitis of chickens by "Intrabursal" injection of virus. *Poult. Sci.*, 13, 218-226.
- 7) BEAUDETTE, F.R., and HUDSON, C.B. (1933). Experiments on immunization against laryngotracheitis in fowl. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 82, 460-477.
- 8) BEAUDETTE, F.R., and HUDSON, C.B. (1937). Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 90, 51-60.
- 9) BRANDLY, C.A. (1934). Some studies of infectious laryngotracheitis. A preliminary report. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 84, 588-595.
- 10) BRANDLY, C.A. (1935). Some studies of infectious laryngotracheitis. The continued propagation of the virus upon the chorioallantoic membrane of the hen's egg. *J. Infect. Dis.*, 57, 201-206.
- 11) BRANDLY, C.A. (1937). Studies on the egg-propagated viruses of infectious laryngotracheitis and fowl pox. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 88, 587-599.
- 12) BRANDLY, C.A., and BUSHNELL, L.D. (1934). A report of some investigation of infectious laryngotracheitis. *Poult. Sci.*, 13, 212-217.
- 13) BRANDLY, C.A., MOSES, H.E., JUNGHERR, L.E., and JONES, E.E. (1946). The isolation and identification of Newcastle disease. *Am. J. Vet. Res.*, 7, 289-306.
- 14) BRYANS, J.T. (1969). On immunity to disease caused by equine herpesvirus 1. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 155, 294-300.
- 15) BURNET, F.M. (1934). The propagation of the virus of infectious laryngotracheitis on the chorio-allantoic membrane of the developing egg. *Brit. J. Exp. Path.*, 15, 52-55.
- 16) BURNET, F.M. (1936). Immunological studies with the virus of infectious laryngotracheitis of fowls using the developing egg technique. *J. Exp. Med.*, 63, 685-701.
- 17) BURNET, F.M. (1940). Influenza virus infection of the chick embryo by the amniotic route. 1. General character of the infection. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 18, 353-360.
- 18) BURNET, F.M., and FERRY, J.D. (1934). The differentiation of the viruses of fowl plague and Newcastle disease. Experiments using the technique of chorioallantoic membrane inoculation of the developing egg. *Brit. J. Exp. Path.*, 15, 56-64.
- 19) BURNET, F.M., and FOLEY, M. (1941). Infection of the respiratory tract of chick embryo by the viruses of Psittacosis and infectious laryngotracheitis. A comparison with Influenza virus infection. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 19, 235-240.
- 20) BUXTON, A., and FRASHER, G. (1977). Newcastle disease. In: *Animal microbiology*

- gy. *Volume 2, Rickettsias and viruses*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 522-527.
- 21) BUXTON, A., and FRASHER, G. (1977). Herpesviruses. In: *Animal microbiology. Volume 2, Rickettsias and viruses*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 727-773.
 - 22) CALNEK, B.W., and WITTER, R.L. (1978). Marek's disease. In: *Diseases of poultry*, ed. HOFSTAD, M.S., CALNEK, B.W., HELMBOLDT, C.F., REID, W.M., and YODER, H.W., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, 385-418.
 - 23) CORNWELL, H.J.C., and WEIR, A.R. (1970). Herpesvirus infection of pigeon. 3. Use of embryonated eggs for the growth and characterization of the virus. *J. Comp. Path.*, **80**, 509-515.
 - 24) CORNWELL, H.J.C., and WRIGHT, N.G. (1970). Herpesvirus infection of pigeons. 1. Pathology and virus isolation. *J. Comp. Path.*, **80**, 221-227.
 - 25) CORNWELL, H.J.C., WRIGHT, N.G., and MCCUSHER, H.B. (1970). Herpesvirus infection of pigeons. 2. Experimental infection of pigeons and chick. *J. Comp. Path.*, **80**, 229-232.
 - 26) COVER, M.S., and BENTON, W.J. (1957). The biological variation of the infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.*, **2**, 375-381.
 - 27) COX, H.R. (1938). Use of yolk sac of developing chick embryo as medium for growing rickettsiae of Rocky mountain spotted fever and typhus. *Public Health Rep.*, **53**, 2241-2247.
 - 28) DANNER, K.H. (1967). Untersuchungen über die lokale Vermehrung und Ausbreitung des Virus der infectiösen Laryngotracheitis des Geflügels auf der Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, **7**, 131-135.
 - 29) DAVIS, D.H., and CARMICHAEL, L.E. (1973). Role of cell-mediated immunity in the recovery of cattle from primary and recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Inf. Imm.*, **8**, 510-518.
 - 30) DAVIS, W.C., and SHARAMA, J.M. (1973). Ultrastructural comparison of morphogenesis and fate of Marek's disease and infectious laryngotracheitis viruses in chicken kidney cells. *Am. J. Vet. Res.*, **34**, 873-880.
 - 31) DOBSON, N. (1935). Infectious laryngotracheitis in poultry. *Vet. Rec.*, **15**, 1467-1471.
 - 32) 土井邦雄・小島明弘・稲見芳治・八十島昭・大川仁 (1975). 本邦におけるネコのウイルス性鼻気管炎. ヘルペスウイルスの分離と病理像. 日獣誌, **37**, 281-292.
 - 33) DOLL, E.R., WALLACE, M.E., and RICHARDS, M.G. (1954). Thermal, hematological and serological responses of weanling horses following inoculation with equine abortion virus: Its similarity to equine influenza. *Cornell Vet.*, **44**, 181-190.
 - 34) 藤本胖・中川勉夫 (1964). 鶏麻痺症に関する病理学的研究. 家禽白血病 (殊に内臓型リンパ腫症) との関係. 1. 病理組織学的所見. 日獣誌, **26** (学会号). 385-386.
 - 35) FUJIMOTO, Y., NAKAGAWA, M., OKADA, K., OKADA, M., and MATSUKAWA, K. (1971). Pathological studies of Marek's disease. 1. The histopathology on field cases in Japan. *Jap. J. Vet. Res.*, **19**, 7-26.
 - 36) GENTRY, R.F. (1963). Cultivation of infectious laryngotracheitis virus in embryonated chicken eggs by various routes of inoculation. *Avian Dis.*, **7**, 31-37.
 - 37) 合田光昭・吉村昌吾・小田切美晴 (1975). 七面鳥ヘルペスウイルスの発育鶏卵内接種による胚子病変について. 日獣会誌, **28**, 417-420.
 - 38) GOODPASTURE, E.W., and ANDERSON, K. (1944). Infection of human skin, grafted on the chorioallantios of chick embryo, with the virus of herpes zoster. *Am. J. Path.*, **20**, 447-455.

- 39) GOODPASTURE, E.W., WOODRUFF, A.M., and BUDDINGH, G.J. (1931). The cultivation of vaccine and other viruses in the chorioallantoic membrane of chick embryo. *Science*, **74**, 371-372.
- 40) GRHAM, J.R. (1957). A simple technique for the inoculation of the chorioallantoic membrane of chicken embryos. *Am. J. Vet. Res.*, **18**, 691-692.
- 41) HALL, W.T.K., SIMMONS, G.C., FRENCH, E.L., SNOWDON, W.A., and ASDELL, M. (1966). The pathogenesis of encephalitis caused by the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust. Vet. J.*, **42**, 229-237.
- 42) HANSON, L.E. (1972). Laryngotracheitis. In: *Diseases of poultry*, ed. HOFSTAD, M.S., CALNEK, B.W., HELMBOLDT, C.F., REID, W.M., and YODER, Jr.H.W., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, 607-618.
- 43) HASHIMOTO, T., HIRAI, K., MIYOSHI, A., SHIMAKURA, S., YAGAMI, K., KATO, N., KUNIHIRO, K., FUJIURA, A., OKADA, K., and FUJIMOTO, Y. (1978). Naturally occurring canine herpesvirus infection in Japan. *Jap. J. Vet. Sci.*, **40**, 157-169.
- 44) HITCHNER, S.B., FABRICANT, J., and BAGUST, T.J. (1977). A fluorescent-antibody study of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **21**, 185-194.
- 45) HITCHNER, S.B., and WHITE, P.G. (1958). A comparison of embryo and bird infectivity using five strains of laryngotracheitis virus. *Poult. Sci.*, **37**, 684-690.
- 46) 堀内貞治・秋山紳・勝屋茂美・石崎良太郎・日原宏 (1967). 若令における鶏内臓型リンパ腫症の発生. *日獣誌*, **29** (学会号), 93.
- 47) 堀内貞治・川村斉・邸泰山 (1966). 野外に発生した鶏伝染性喉頭気管炎の病理学的変化. *家畜衛生試研報告*, **53**, 18-31.
- 48) HUCK, R.A., MILLAR, P.G., and WOODS, D.G. (1973). Experimental infection of maiden heifer by the vagina with infectious bovine rhinotracheitis / infectious pustular vulvo-vaginitis virus. *J. Comp. Path.*, **83**, 271-279.
- 49) HUDSON, C.B., and BEAUDETTE, F.R. (1932). Infection of the cloaca with the virus of infectious bronchitis. *Science*, **76**, 34.
- 50) HUDSON, C.B., and BEAUDETTE, F.R. (1932). The susceptibility of pheasant and a pheasant bantam cross to the virus of infectious bronchitis. *Cornell Vet.*, **22**, 70-74.
- 51) HUNGERFORD, T.G. (1969). Infectious laryngotracheitis. In: *Diseases of poultry*. Angus and Roberston, Sydney, 119-141.
- 52) 池博敏・小谷鹿之助・三船亮介・中西義富・藤原勝美 (1979). 鶏伝染性喉頭気管炎の発生例. *鶏病研報*, **14**, 17-24.
- 53) 稲田寛一郎・平木友久・益田祚治・小山益夫 (1972). 温暖期における鶏伝染性喉頭気管炎の発生について. *鶏病研報*, **8**, 163-165.
- 54) 板倉智敏・五藤精知・橋本晃・管沼保治・岡田幸助・藤本胖 (1972). 猫に見られたヘルペス型ウイルス感染による呼吸器系疾病の病理像について. *日獣誌*, **34** (学会号), 112.
- 55) JORDAN, F.T.W. (1958). Some observations on infectious laryngotracheitis. *Am. J. Vet. Res.*, **70**, 606-610.
- 56) JORDAN, F.T.W. (1964). The control of infectious laryngotracheitis. *Zbl. Vet. Med., Reihe B*, **11**, 15-32.
- 57) JORDAN, F.T.W. (1964). Diagnosis of infectious laryngotracheitis by chick embryo inoculation. *J. Comp. Path.*, **74**, 119-128.
- 58) JORDAN, F.T.W. (1966). A review of the literature on infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **10**, 1-26.
- 59) KAWAKAMI, Y., KAJI, T., SUGIMURA, K., SHIMIZU, T., and MATSUMOTO, M. (1959). A preliminary survey for equine abortion virus infected by complement fixation test in Hokkaido, Japan. *Jap. J. Exp. Med.*, **29**, 203-211.
- 60) 川上善三・久米常雄・平棟孝志・村瀬信夫 (1965). 一軽種馬牧場に見られたウマ鼻腔肺炎ウイルスの伝播と異常分娩について. *家畜衛生試研報告*, **51**, 1-7.

- 61) 川上善三・徳井忠志・中野克重・久米常雄・平棟孝志・村瀬信夫 (1970). 北海道日高地方によおける馬鼻腔肺炎ウイルスによる流産. 1. 発生状況とウイルス分離. 家畜衛試研報告, **61**, 9~16.
- 62) 川村明義 (1966). 蛍光抗体法. 微生物検査心携, 柳沢謙他25名編, 日本公衆衛生協会, 東京, 695~771.
- 63) KENDRICK, J.W. (1973). Effect of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **163**, 852-854.
- 64) KENDRICK, J.W., GILLESPIE, J.H., and MCENTEE, K. (1958). Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. *Cornell Vet.*, **48**, 458-498.
- 65) KENDRICK, J.W., and STRAUB, O.C. (1967). Infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus infection in pregnant cows. *Am. J. Vet. Res.*, **28**, 1269-1282.
- 66) KERNOHAN, G. (1931). Infectious laryngotracheitis of fowls. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **78**, 196-202.
- 67) KERNOHAN, G. (1931). Infectious laryngotracheitis in pheasants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **78**, 553-555.
- 68) 北島千里・三木敏弘 (1977). 鶏伝染性喉頭気管炎の発生について. 鶏病研報, **13**, 150~154.
- 69) KOMAROV, A., and BEAUDETTE, F.R. (1931). Some observation on the distribution of virus in the body of birds affected with infectious bronchitis with special reference to the carrier state. *Poult. Sci.*, **10**, 391-393.
- 70) 小谷猛夫・野田周作・望月宏・牧野稔 (1977). 犬ヘルペスウイルス感染症の病理学的研究. 1. 新生小犬の自然感染例について. 第84回日獣学会講演要旨, 87.
- 71) 小谷猛夫・小田切美晴・望月宏 (1978). 犬ヘルペスウイルス感染症の病理学的研究. 2. 腹腔内及び皮下接種による子犬の病変. 第85回日獣学会講演要旨, 187.
- 72) LEIBOVITZ, L. (1971). Gross and histopathologic changes of duck plague (Duck virus enteritis). *Am. J. Vet. Res.*, **32**, 275-290.
- 73) MARTIN, W.B., JAMES, Z.H., LAUDER, I.M., MURRAY, M. and PIRIE, H.M. (1969). Pathogenesis of bovine mamillitis virus infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **30**, 2151-2166.
- 74) MAY, H.G., and TITSLER, R.P. (1925). Tracheo-laryngitis in poultry. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **67**, 229-231.
- 75) MCKERCHER, D.G., SAITO, J.K., and MATHIS, R.M. (1969). Comparative aspects of immunity against bovine and equine herpesviruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **155**, 300-306.
- 76) MCKERCHER, D.G., WADA, E.M., and STRAUB, O.C. (1963). Distribution and persistence of infectious bovine rhinotracheitis virus in experimentally infected cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **24**, 510-514.
- 77) 三木敏弘・北島千里 (1977). 香川県における鶏伝染性喉頭気管炎の発生について. 鶏病研報, **13** (増刊号), 35~41.
- 78) MILOVANOVIC, M.V., ENDERS, J.F., and MITUS, A. (1957). Cultivation of measles virus in human amnion cell and in developing chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **95**, 120-127.
- 79) MOLGARD, P.C., and CAVETE, J.W. (1947). The feather follicle method of vaccinating with fowl laryngotracheitis vaccine. *Poult. Sci.*, **26**, 563-567.
- 80) MOTOHASHI, T., and TAJIMA, M. (1966). Isolation of a herpes virus from a diseased adult dog in Japan. *Jap. J. Vet. Sci.*, **28**, 308-314.
- 81) 中村哲或・秋山定勝 (1937). 鶏の伝染性喉頭気管炎に対する緊急予防接種の実際的意義. 日畜誌, **10**, 329~335.
- 82) NASEMANN, T. (1977). Herpes simplex. In: *Viral diseases of the skin, mucous membranes and genitalis*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 103-129.
- 83) 新居志郎 (1972). ヘルペスウイルスグループ. ウイルス図鑑, 保坂康弘・川瀬茂美・松井千秋

- 編, 講談社, 東京, 50~90.
- 84) 西間庭正士・藤井博・岡本哲夫・海老洋一・三毛敏夫・稲葉雄二・田中義夫・大森常良 (1971). 輸入牛に集団発生した伝染性牛鼻腔気管炎. 1. 臨床症状とウイルス分離. 日獣誌, **33** (学会号) 11~12.
- 85) PETER, C.P., GRATZEK, J.B., and RAMSEY, F.K. (1966). Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus associated with enteritis in cattle. Pathogenesis studies by fluorescent antibody tracing. *Am. J. Vet. Res.*, **27**, 1583-1590.
- 86) PIROZOK, R.P., HELMBOLDT, C.F. and JUNGHER, E.L. (1957). A rapid histological technique for the diagnosis of infectious laryngotracheitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **130**, 406-408.
- 87) PLUMMER, G., and KERRY, J.B. (1962). Studies on an equine respiratory virus. *Vet. Rec.*, **74**, 967-970.
- 88) PURCELL, D.A. (1971). Histopathology of infectious laryngotracheitis in fowl infected by an aerosol. *J. Comp. Path.*, **81**, 421-431.
- 89) PURCELL, D.A. (1971). The ultrastructural changes produced by infectious laryngotracheitis virus in tracheal epithelium of the fowl. *Res. Vet. Sci.*, **12**, 455-458.
- 90) 佐々木文存・中井正久・岩本市蔵・上羽修・小北達・須磨一郎 (1968). ネコのウイルス性鼻気管炎と思われる発生例について. 日獣誌, **30** (学会号), 120.
- 91) SEDDON, H.R. and HART, L. (1936). Infectivity experiments with the virus of laryngotracheitis of fowls. *Aust. Vet. J.*, **12**, 13-16.
- 92) SEIFRIED, O. (1931). Histopathology of infectious laryngotracheitis in chickens. *J. Exp. Med.*, **64**, 817-826.
- 93) SEVOIAN, M. (1960). A quick method for the diagnosis of avian pox and infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **4**, 474-477.
- 94) SHEFFY, B.E., and RODMAN, S. (1973). Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **163**, 850-856.
- 95) SHIBLEY, G.P., LUGINBUHL, R.E., and HELMBOLDT, C.F. (1964). A study of infectious laryngotracheitis virus. 3. Growth curves of two isolates of infectious laryngotracheitis virus following chorioallantoic sac inoculation. *Avian Dis.*, **8**, 101-104.
- 96) SHIMIZU, T., ISHIZAKI, R., ISHII, S., KAWAKAMI, Y., KAJI, T., SUGIMURA, K., and MATSUMOTO, M. (1959). Isolation of equine abortion virus from natural cases of equine abortion in horse kidney cell culture. *Jap. J. Exp. Med.*, **29**, 643-649.
- 97) SHIMIZU, Y., NAKANO, K., INUI, S., and MURASE, N. (1972). Isolation of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus from aborted fetuses. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, **12**, 110-111.
- 98) SNOEYENBOS, G.H., OLESIU, O.M., and HELMBOLDT, C.F. (1972). Isolates of infectious laryngotracheitis which produce pneumonitis and airsacculitis. *Avian Dis.*, **16**, 278-284.
- 99) SHROYER, E.L., and EASTERDAY, B.C. (1968). Studies on the pathogenesis of infectious bovine rhinotracheitis following aerosol exposure. *Cornell Vet.*, **58**, 442-461.
- 100) 田所章臣・綾部重明・藤島脩治・山田宏・白井保治郎 (1968). 管内に発生した鶏の伝染性喉頭気管炎について. 鶏病研報, **4**, 37-39.
- 101) 谷口稔明 (1977). 伝染性喉頭気管炎の病理学的変化. 鶏病研報, **13** (増刊号), 15-21.
- 102) THORP, F., and GRAHAM, R. (1934). A note on the histopathology of infectious avian laryngotracheitis. *Poult. Sci.*, **30**, 102-109.
- 103) TRIPATHY, D.N., and HANSON, L.E. (1975). Laryngotracheitis. In: *Isolation and identification of avian pathogens*. ed. HITCHNER, S.B., DOMERMUTH, C.H., PURCHASE, H.G., and WILLIAM, J.E., Arnold Printing Corporation, Ithaca, New York, 227-234.

- 104) 宇田津士郎 (1977). 宮崎県における伝染性喉頭気管炎の発生例について. 鶏病研報, **13** (増刊号), 43~52.
- 105) Von BÜLOW, V. (1963). Marek'sche Hühnerlähmung: Reaktiononen in experimentell infizierten embryonierten Ei. *Zbl. Vet. Med., Reihe B*, **16**, 97-114.
- 106) WATRACH, A.M., HANSON, L.E., and WATRACH, M.A. (1978). Crystalline aggregates of infectious laryngotracheitis virus. *Virology*, **35**, 321-323.
- 107) WATRACH, A.M., VATTER, A., HANSON, L.E., and WATRACH, M.A. (1959). Electron microscopic studies of the virus of avian infectious laryngotracheitis. *Am. J. Vet. Res.*, **20**, 537-544.
- 108) WESTERFIELD, C., and DIMOCK, W.W. (1946). The pathology of equine virus abortion. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **109**, 101-111.
- 109) WHITMAN, M.J., WALL, M.J., and WARREN, C.J. (1946). Herpes simplex encephalitis. *J. Am. Med. Assoc.*, **131**, 1408-1411.
- 110) WINTERFIELD, R.W., and GWAN, SO IK (1968). Susceptibility of turkey to infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **12**, 191-202.
- 111) WOODRUFF, A.M., and GOODPASTURE, E.W. (1931). The susceptibility of the chorioallantoic membrane of chick embryos to infection with the fowl-pox virus. *Am. J. Path.*, **7**, 209-222.
- 112) 山極三郎・上田晃・小野威・井上睦・板倉智敏 (1966). 家鶏白血病の病理学的研究. 2. 脚弱および脚麻痺の病理組織学的検討. 日獣誌, **26** (学会号), 387.
- 113) 吉村昌吾・小田切美晴 (1964). 鶏の伝染性喉頭気管炎に関する研究. 1. 病毒の分離と同定. 日獣会誌, **17**, 489-493.
- 114) 吉村昌吾・小田切美晴・友安夫 (1965). 大阪地方の鶏の伝染性喉頭気管炎の発生状況. 日獣会誌, **18**, 679-682.
- 115) 吉村昌吾・小田切美晴・友安夫 (1966). 大阪地方の鶏の呼吸器病症候群の原因調査. 日獣会誌, **19**, 111-115.
- 116) 吉村昌吾・小田切美晴・友安夫・井上哲夫・望月宏 (1966). 鶏伝染性喉頭気管炎の研究. 5. 気のうち病変について. 日獣誌, **28** (学会号), 482.
- 117) 吉野亀三郎 (1967). ヘルペス感染論. 実験感染学, 宮川正澄・三橋進・石田名香雄編, 朝倉書店, 東京, 510-521.
- 118) ZARAFONTIS, C.J.Z., SMADEL, J.E., ADAMS, J.W., and HAYMAKER, W. (1944). Fatal herpes simplex encephalitis in man. *Am. J. Path.*, **20**, 429-455.
- 119) ZUELZER, W.W., and STULBERG, C.S. (1952). Herpes simplex virus as the cause of fulminating visceral disease and hepatitis in infancy. *Am. J. Dis. Child.*, **83**, 421-439.

Explanation of figures

Figures 8 to 19 are illustrations for Chapter 1 (Immuno-histological findings in laryngotracheal lesions of the experimentally infected chicken).

Figures 20 to 26 are those for Chapter 2 (Ultrastructural findings in the tracheal epithelia of the experimentally infected chicken).

Figure 27 is that for Chapter 3 (Quick smear method for the detection of inclusion bodies).

Figures 28 to 42 are those for Chapter 4 (Extra-pulmonary lesions of the experimentally infected chicken).

Figures 43 to 54 are those for Chapter 5 (Pathology of ILT virus infection in the chick embryo).

Figures 55 to 66 are those for Chapter 6 (Susceptibility of the Japanese quail).

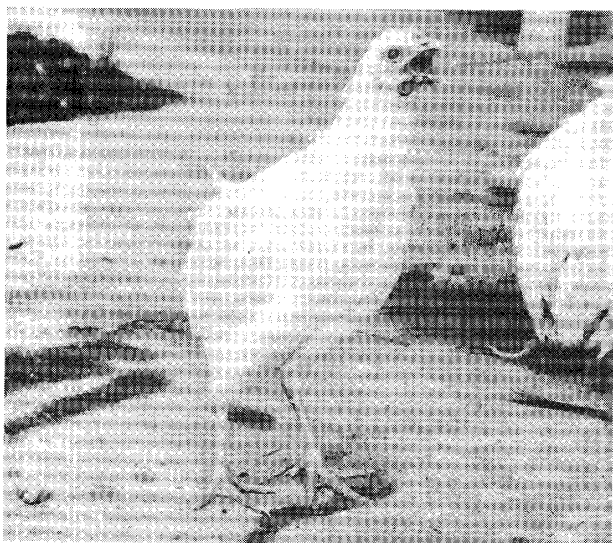


Fig. 8. Characteristic respiratory sign in an experimentally infected chicken on 4 days p.i..

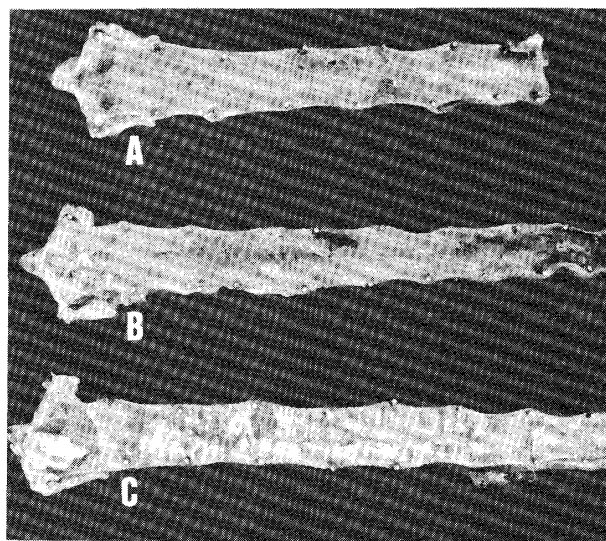


Fig. 9. Laryngotracheal lesions in experimentally infected chickens. Mucous membrane is edematous and congested on 3 days p.i.(A), covered with a film of creamy exudate and blood clot on 4 days p.i.(B) and covered with a yellowish, caseous exudate on 7 days p.i.(c).

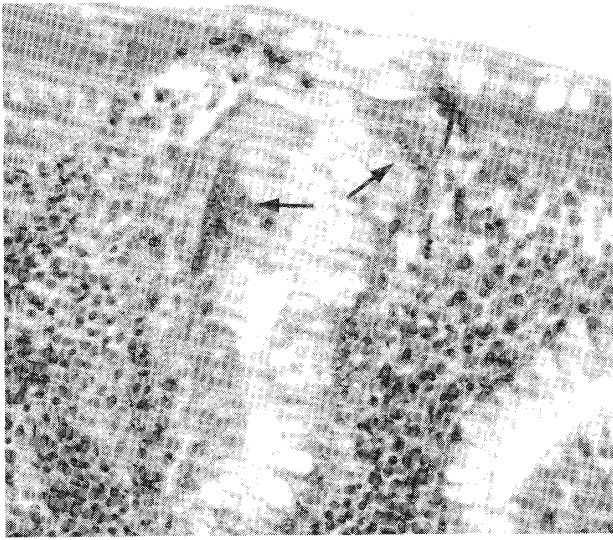


Fig. 10. Laryngeal mucosa from a chicken killed on 2 days p.i. Arrows showing groups of nuclei containing inclusions in the mucous gland. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

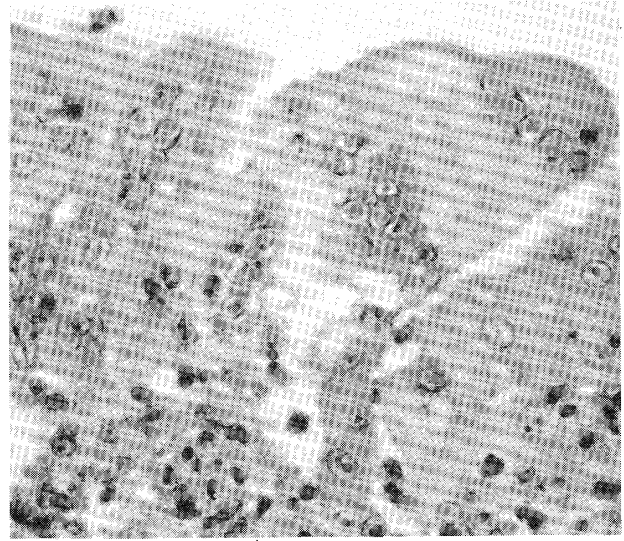


Fig. 11. Tracheal mucosa from a chicken on 3 days p.i. Presence of syncytial cells with intranuclear inclusions in the epithelia. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

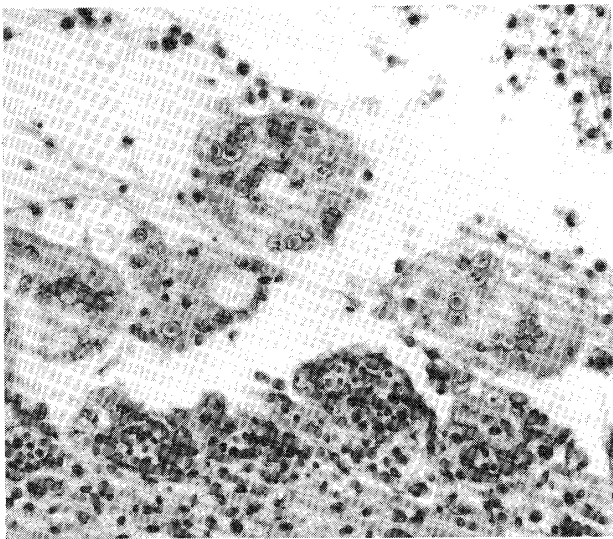


Fig. 12. Syncytial cells with intranuclear inclusions in process of becoming detached from the tracheal epithelia to form "multi-nuclear giant cells". Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

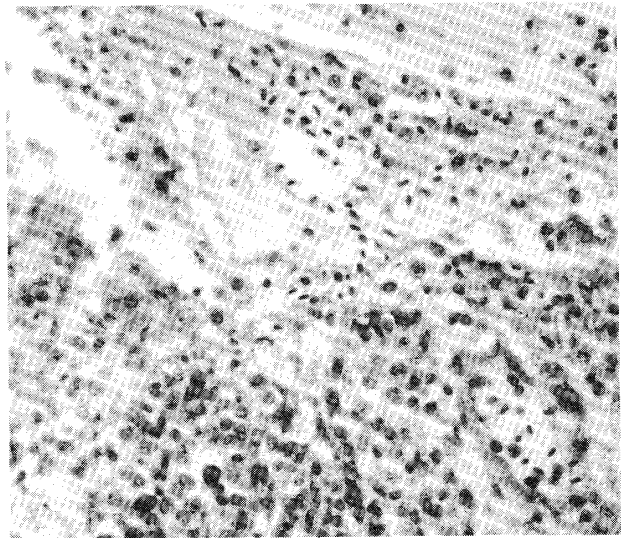


Fig. 13. Tracheal mucosa from a chicken on 4 days p.i. Extensive desquamation of epithelial cells causing hemorrhagic involvement. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

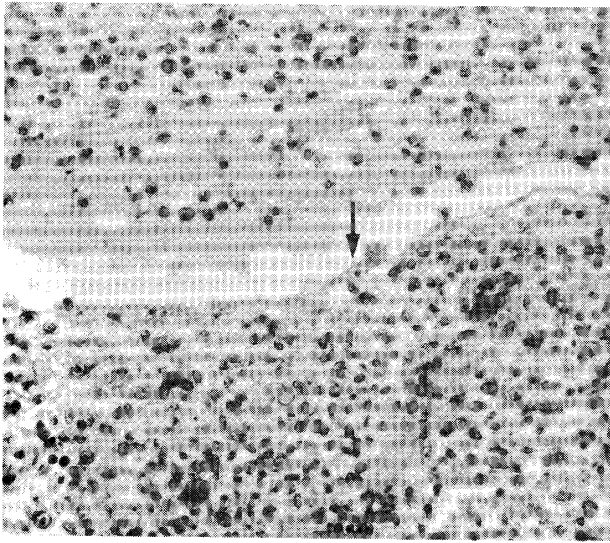


Fig. 14. Tracheal mucosa from a chicken on 7 days p.i.. Showing a single thin layer of regenerating epithelial cells (arrow) covering the lamina propria. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

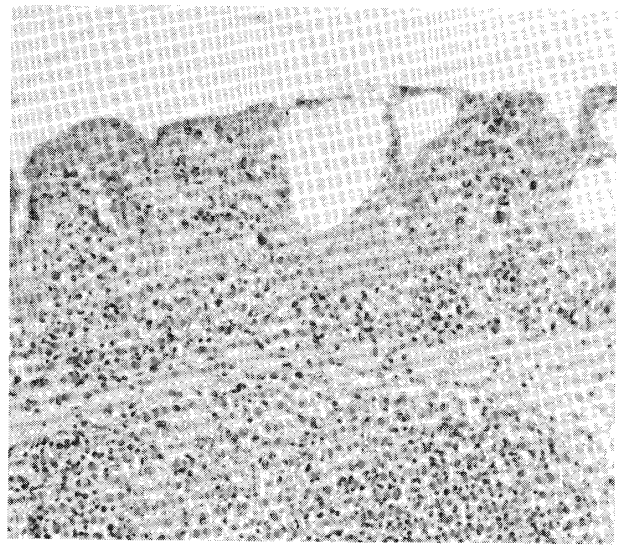


Fig. 15. Tracheal mucosa from a chicken on 8 days p.i.. Showing regeneration of the epithelium. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.



Fig. 16. Trachea from a chicken on 14 days p.i., the mucosa of trachea have largely recovered to normal. Lymphonodules with well-developed germinal centers were seen in the connective tissue (arrow). Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

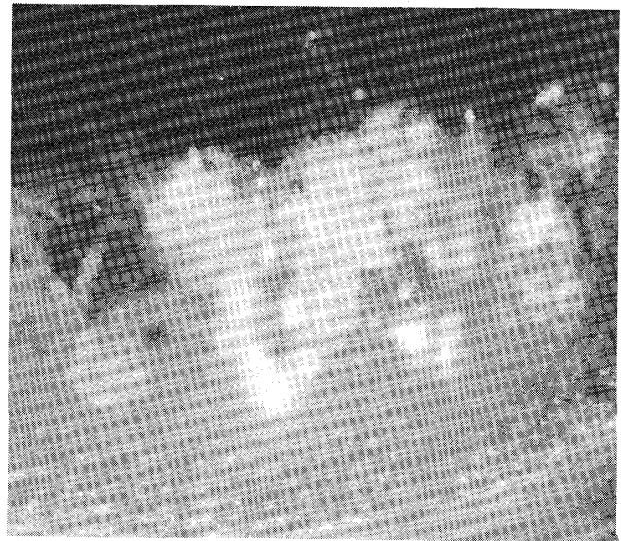


Fig. 17. Immunofluorescence in the trachea from a chicken on 2 days p.i., viral antigens appear brightly fluorescent in the mucous gland and adjacent epithelial layer. Direct immunofluorescent antibody stain. Middle-power mag.

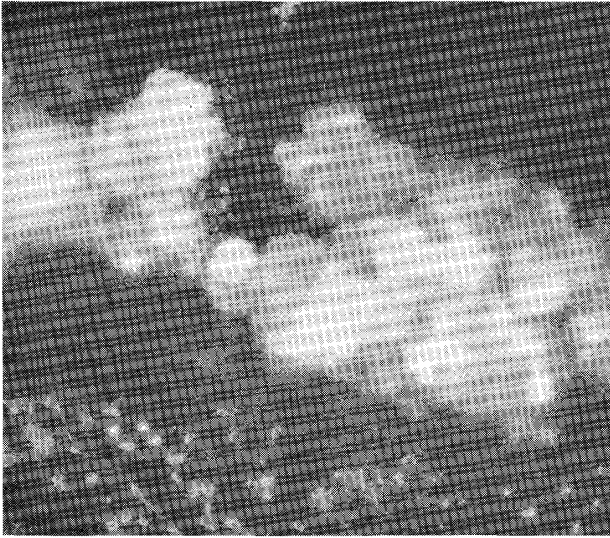


Fig. 18. Immunofluorescence in the tracheal mucosa from a chicken on 3 days p.i., specific fluorescence is extensive in the entire epithelial lining agreeing with the appearance of intranuclear inclusions. Direct immunofluorescent antibody stain. Middle-power mag.

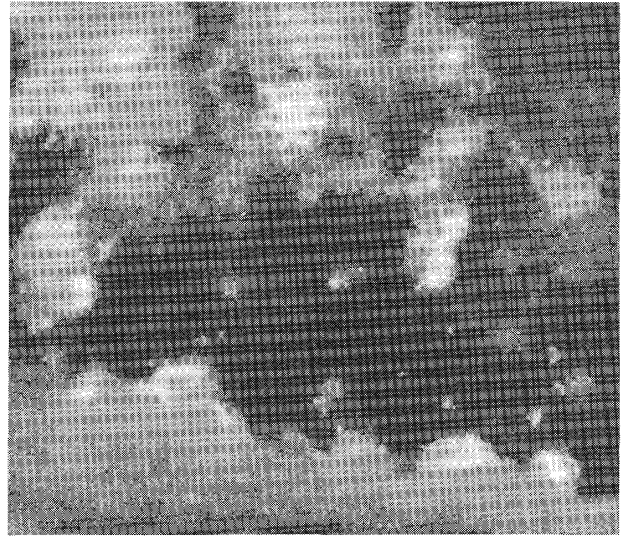


Fig. 19. Immunofluorescence in the trachea from a chicken on 5 days p.i., viral antigens are abundant in the exudates of the lumen as a result of epithelial desquamation, while fluorescence decrease remarkably in the mucosal epithelia. Direct immunofluorescent antibody stain. Middle-power mag.

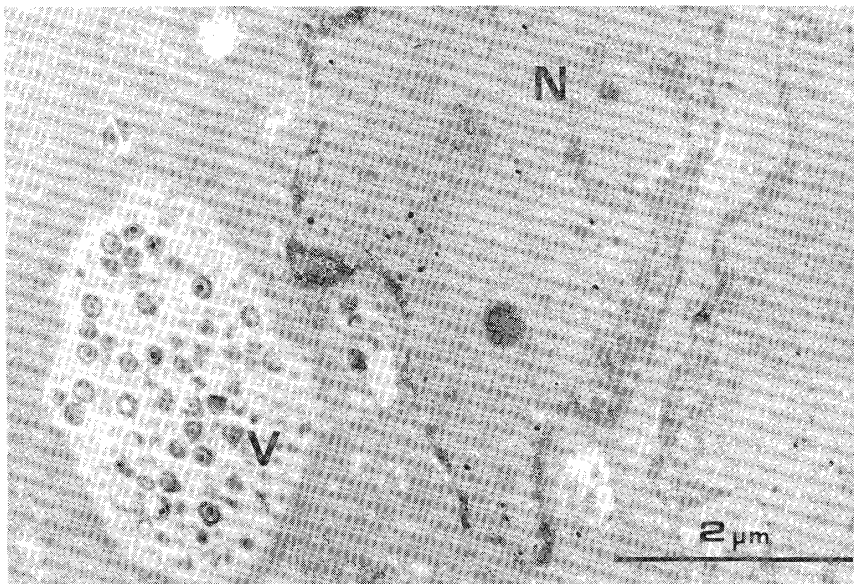


Fig. 20. Showing a syncytium of the tracheal epithelial cells from a chicken at 72 hours p.i.. Notice peripheral accumulations of chromatin and centrally located amorphous material. Many incomplete virions are evident in the nucleus(N), and virions are in cytoplasmic vacuoles(V).

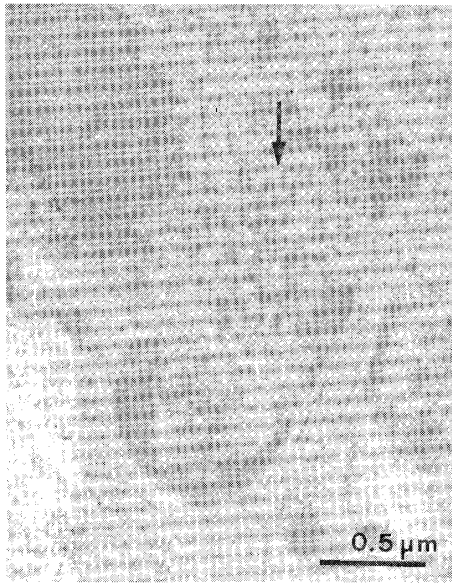


Fig. 21. Showing nucleus in a syncytium at 24 hours p.i.. Partially formed cores and capsids of the virus (arrow) encountered at early stage of infection.

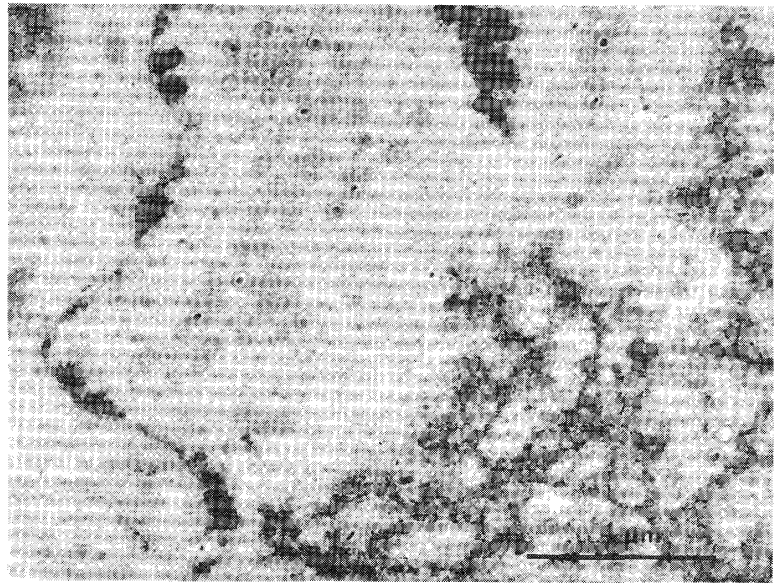


Fig. 22. Showing detailed structure unenveloped virus particles in a nucleus at 36 hours p.i..

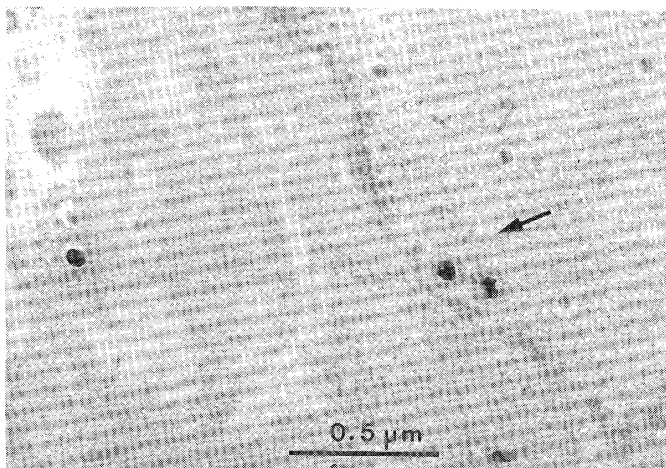


Fig. 23. Arrow showing enveloped virus particles between the layers of the nuclear membrane at 48 hours p.i..

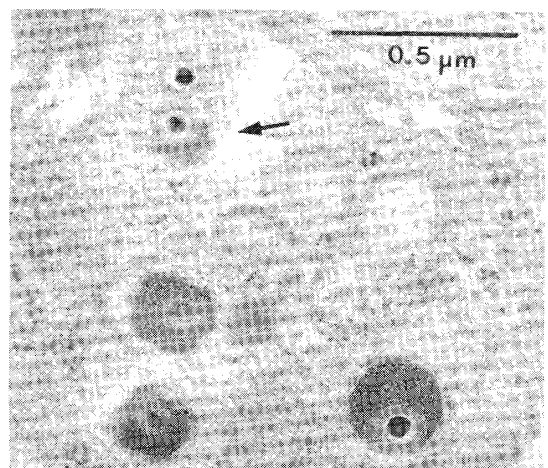


Fig. 24. Arrow showing envelopment of nucleocapsids with evidence of accumulation of electron-dense granular matrix between nucleocapsid and outer viral envelope at 72 hours p.i..

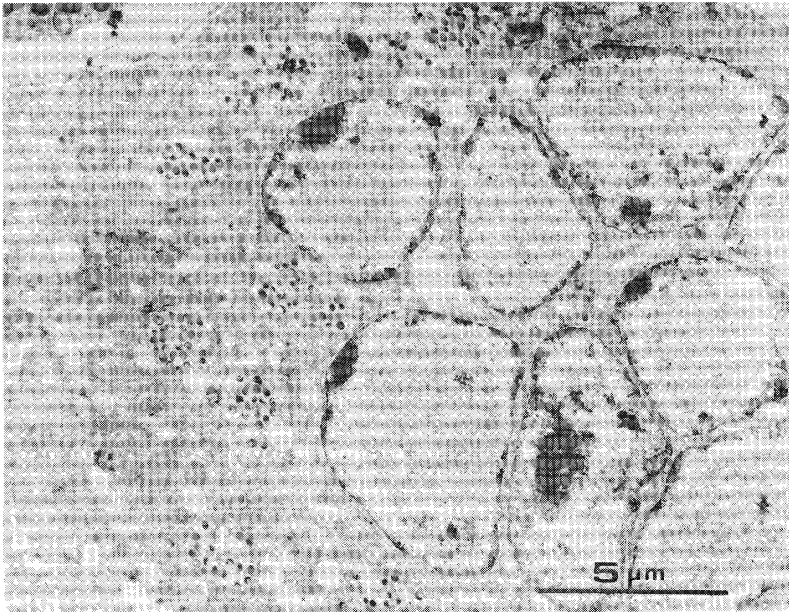


Fig. 25. Showing a typical syncytium of the tracheal epithelial cells on 3 days p.i.. Notice small cytoplasmic vacuoles containing many enveloped virions.

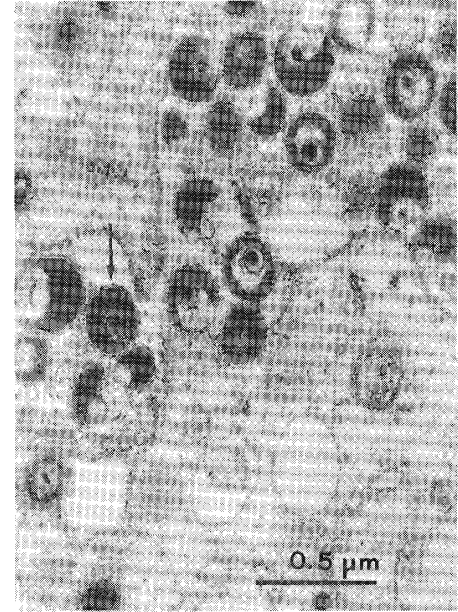


Fig. 26. Higher magnification of a cytoplasmic vacuole containing ILT virions. Mature virion (arrow) shows minute protrusions from outer envelope, coarse granular matrix and central nucleocapsid.

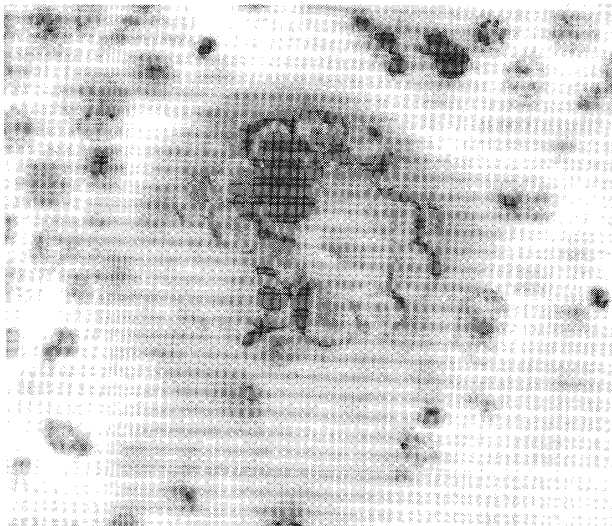


Fig. 27. Showing a typical syncytium of the epithelial cells containing intranuclear inclusions obtained from the tracheal smear specimen. GENDRE's fixation. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

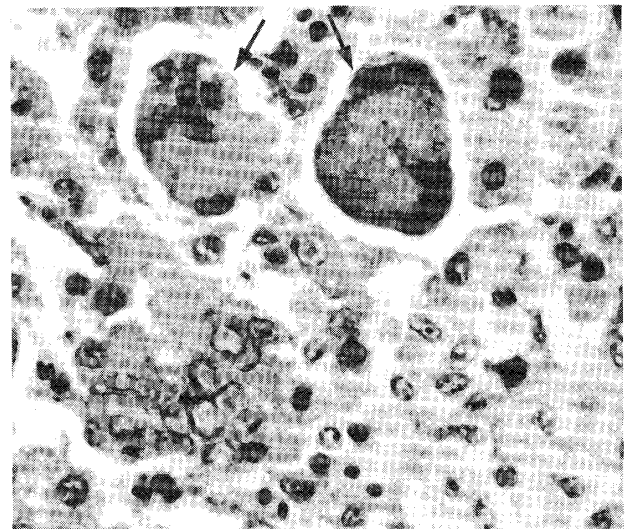


Fig. 28. Hepatic lesion of a chicken on 4 days after intravenous inoculation. Showing intranuclear inclusions in the hepatic cells. Arrows indicate syncytial cell with intranuclear inclusions. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

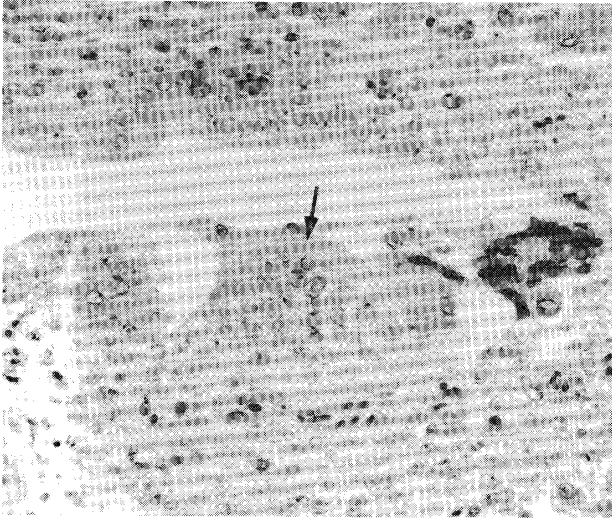


Fig. 29. Interlobular bile duct of the same liver as Fig. 28. Arrow showing a group of nuclei containing inclusions in the epithelial cells. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

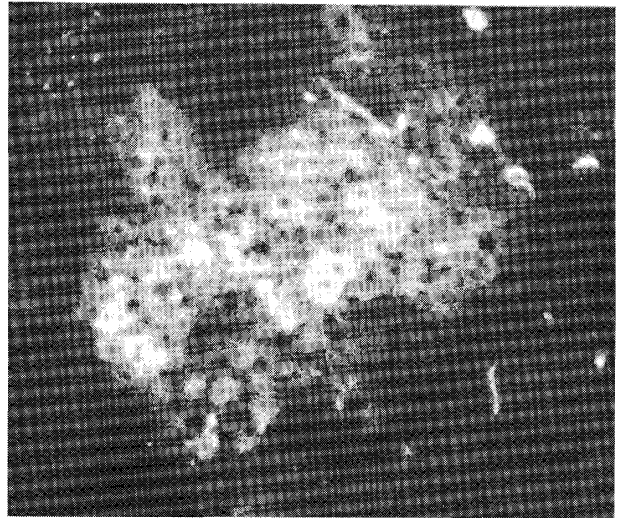


Fig. 30. Immunofluorescence in the liver of a chicken on 3 days after intravenous inoculation. Focus of specific fluorescence in the hepatic cells. Direct immunofluorescent antibody stain. Middle-power mag.

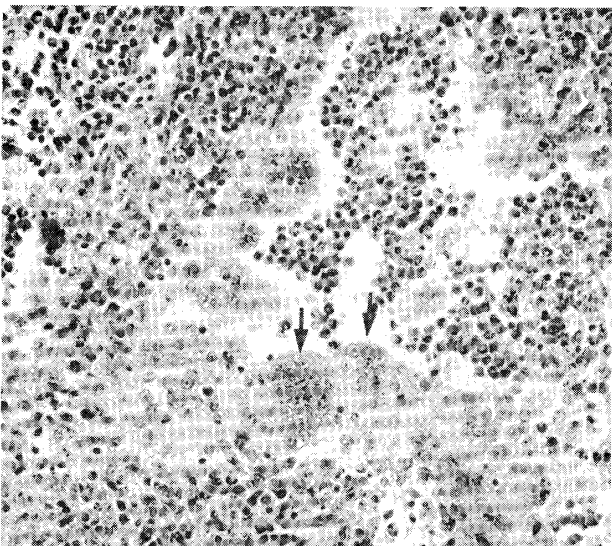


Fig. 31. Thymic medulla of a chicken on 4 days after intravenous inoculation. Arrows showing groups of nuclei containing inclusions in the epithelial cells of HASSAL's corpuscle. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.



Fig. 32. Choroid plexus of a chicken on 3 days after intracerebral inoculation. Arrow showing a group of nuclei containing inclusions in the epithelial cells. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

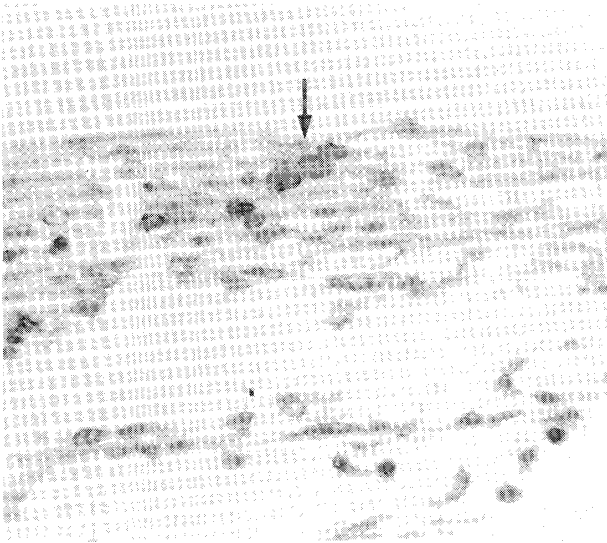


Fig. 33. Meninges of injection area from a chicken on 3 days after intracerebral inoculation. Presence of intranuclear inclusions in the epithelial cells of arachnoidal mesothelia. Nuclei shows margination of the chromatin, and are filled with homogeneous blue staining material. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

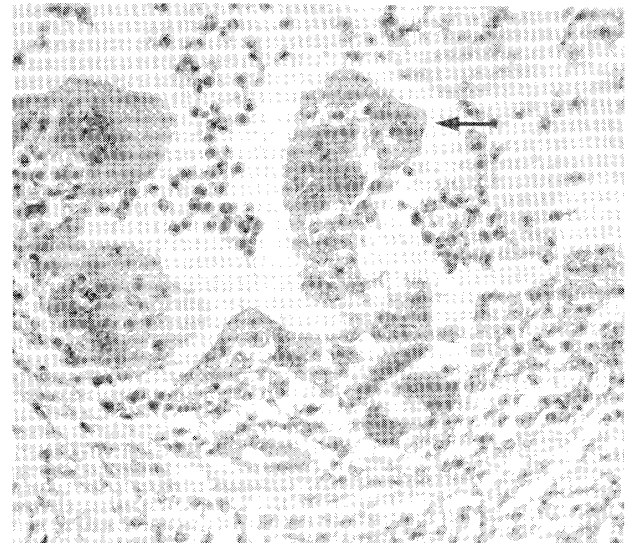


Fig. 34. Cloaca proctodeum of a chicken on 2 days after cloacal brushing with the virus. Arrow showing desquamation of the epithelial cells containing intranuclear inclusions from mucous membrane. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

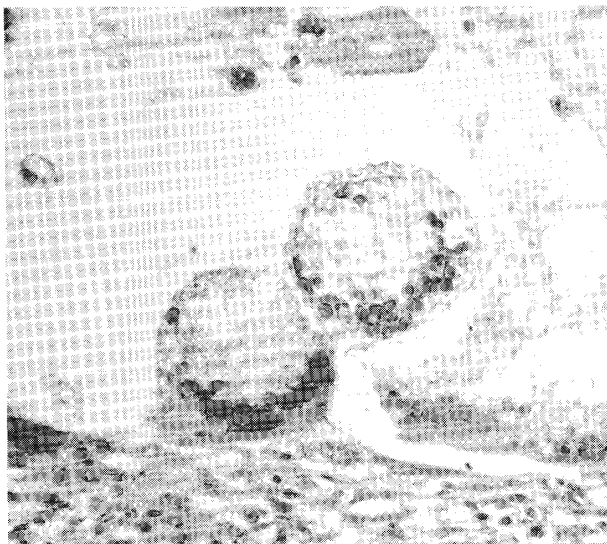


Fig. 35. Bursa of FABRICIUS of a chicken on 3 days after cloacal brushing. Syncytia with nuclear inclusions in process of becoming detached from bursal epithelium to form "multi-nuclear giant cells". Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.



Fig. 36. Bursal follicle of a chicken on 3 days after cloacal brushing. Presence of syncytia with intranuclear inclusions in the epithelial reticular cells of bursal medulla. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

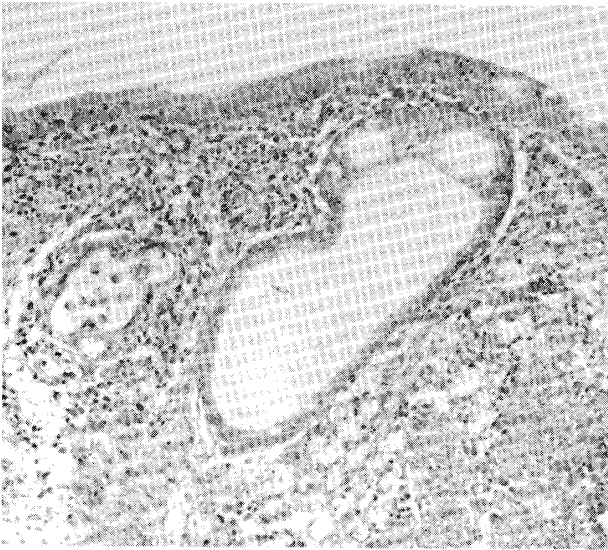


Fig. 37. Bursa of FABRICIUS of a chicken on 10 days after cloacal brushing. At this stage, necrotic cells have disappeared in the bursal medulla and cystic structures are seen as a result of the epithelial regeneration. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

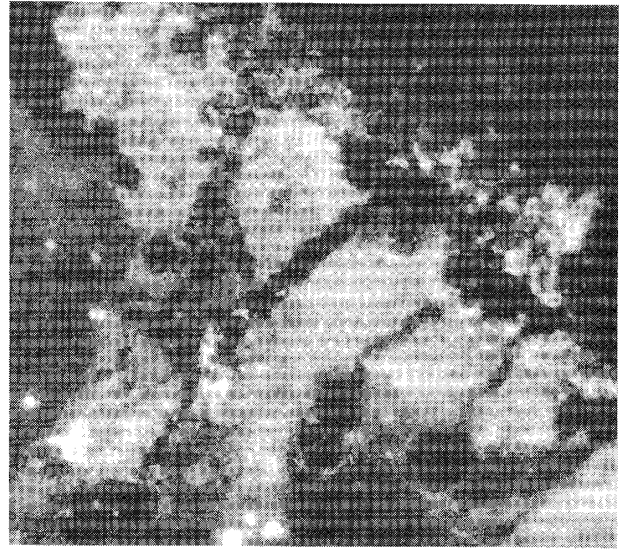


Fig. 38. Immunofluorescence in bursa of FABRICIUS from a chicken on 3 days after cloacal brushing. Viral antigens appear brightly fluorescent in the entire epithelial lining and medulla of follicle. Direct immunofluorescent antibody stain. Middle-power mag.

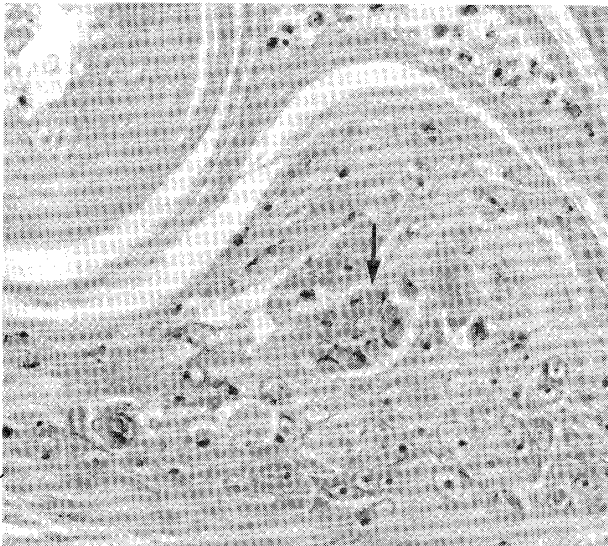


Fig. 39. Feather follicle from a chicken on 2 days after feather brushing with the virus. Arrow showing a syncytium with intranuclear inclusions in the epithelial cells of feather follicle. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.



Fig. 40. Dermis near the junction to feather follicle from a chicken on 5 days after infection, characteristic microscopic lesions of ILT (arrow) are seen over the epidermal layer. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

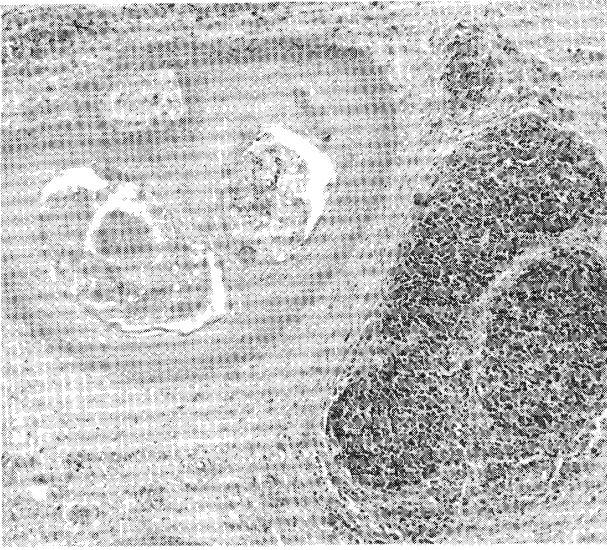


Fig. 41. Feather follicle from a chicken on 12 days after brushing with the virus. Showing regeneration of epithelium with newly formed lymphonodes in connective tissue. Hematoxylin-eosin stain. Low-power mag.

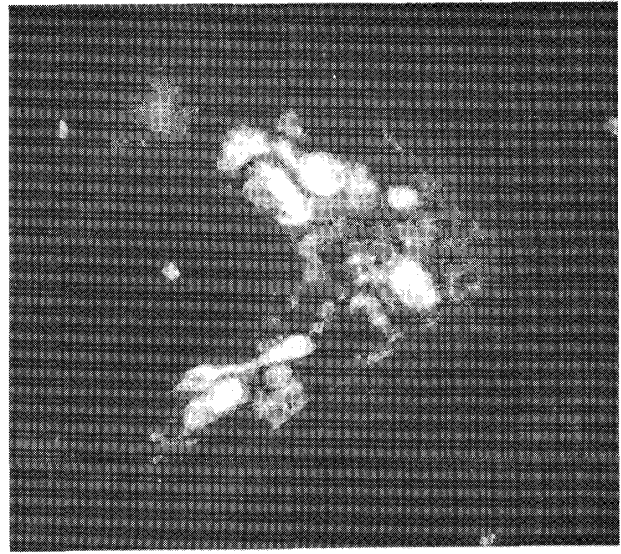


Fig. 42. Immunofluorescence in feather follicle from a chicken on 4 days after inoculation. Specific fluorescence are abundant in the epithelial cells of feather follicle. Direct immunofluorescent antibody stain. Middle-power mag.

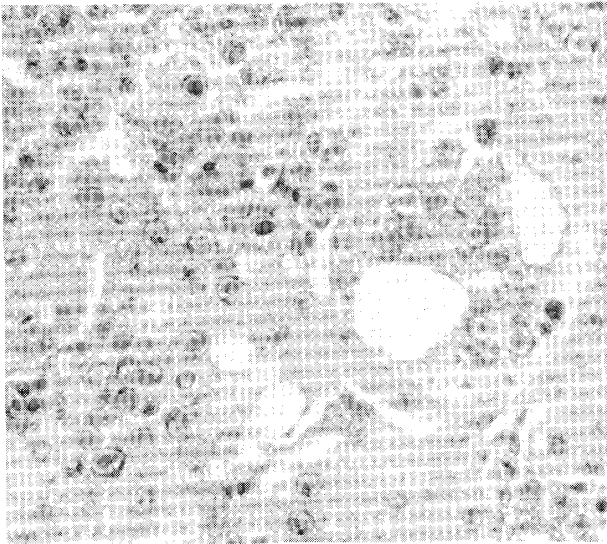


Fig. 43. Hepatic lesions from a 17-day-old chicken embryo inoculated on the chorioallantoic membrane at 10 days of age. Showing intranuclear inclusions and syncytial cell formation of the hepatic cells. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

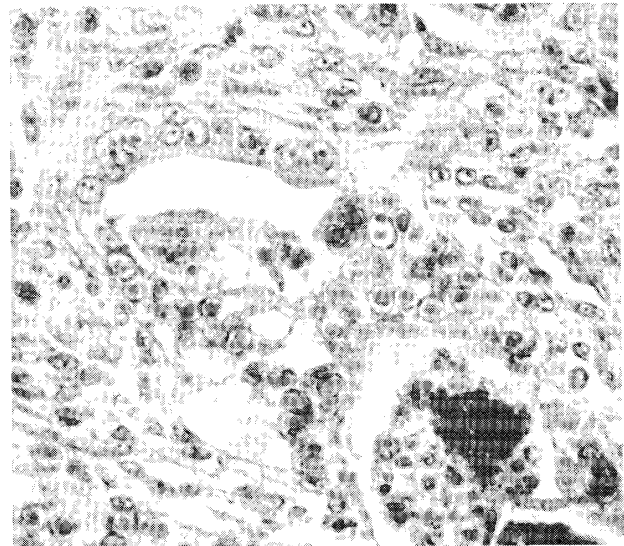


Fig. 44. Lesions of the same liver as Fig. 43. Presence of intranuclear inclusions in the epithelial cells of interlobular bile duct. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

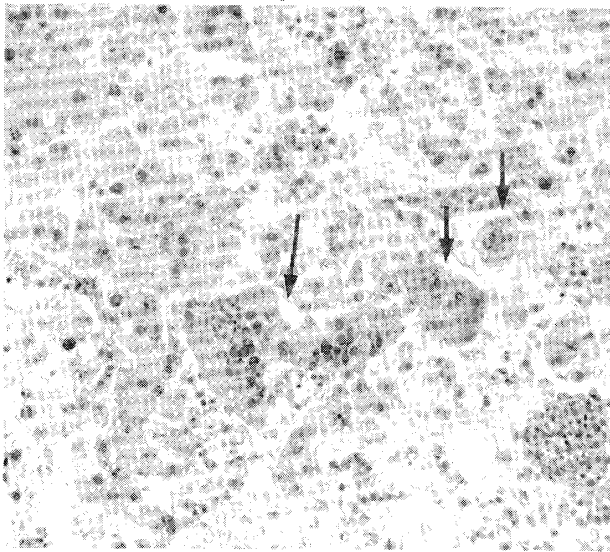


Fig. 45. Hepatic lesions from a 19-day-old chicken embryo inoculated on the chorioallantoic membrane at 10 days of age. Syncytial cell formation of the hepatic cells in the edge of necrotic foci. Hematoxylin-eosin stain. Low-power mag.

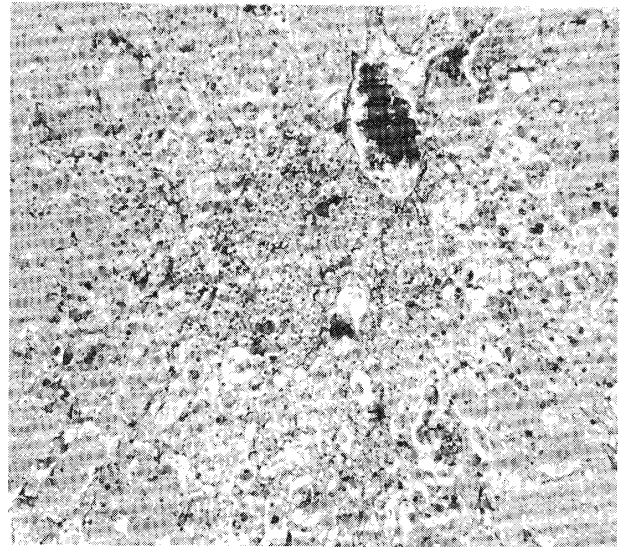


Fig. 46. Lesions of the same liver as Fig. 45. Focal necrosis adjacent to the portal area in the liver, showing a slight reticuloendothelial proliferation and inflammatory cell infiltration in the necrotic area. WILDER's silver impregnation stain. Low-power mag.

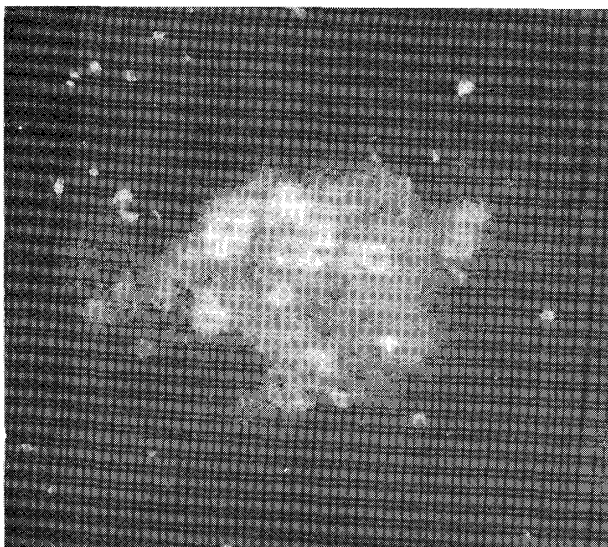


Fig. 47. Immunofluorescence in hepatic lesions from a 16-day-old chicken embryo inoculated on the chorioallantoic membrane at 10 days of age. Specific fluorescence in the hepatic cells, agreeing with the presence of characteristic microscopic ILT lesions. Direct immunofluorescent antibody stain. Middle-power mag.

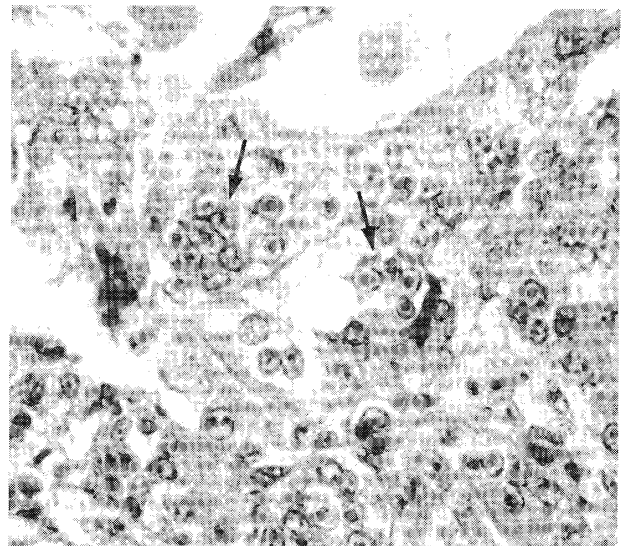


Fig. 48. Gland of proventriculus from a 18-day-old chicken embryo inoculated on the chorioallantoic membrane at 10 days of age. Arrows showing groups of nuclei containing inclusion in the epithelial cells of proventricular gland. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

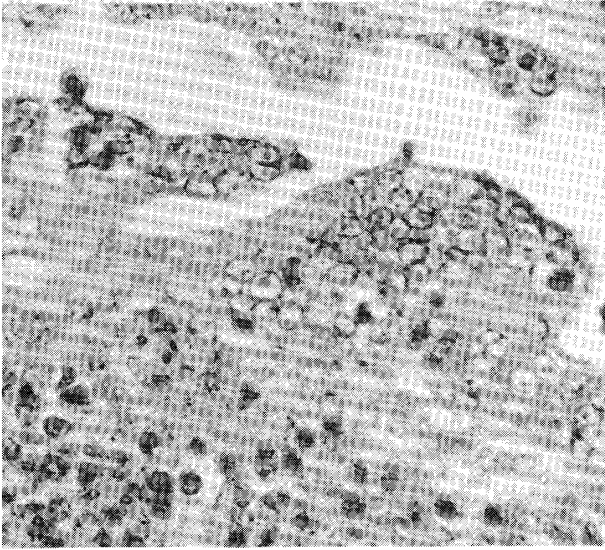


Fig. 49. Bursa of FABRICIUS from a 19-day-old chicken embryo inoculated on the chorio-allantoic membrane at 10 days of age. Presence of intranuclear inclusions in the epithelial cells at the junction to the bursal mucous membrane. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

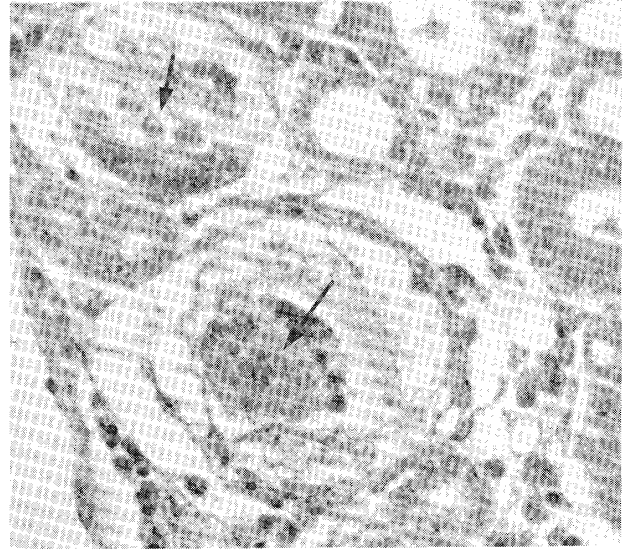


Fig. 50. Kidney of the same embryo as Fig. 49. Arrows showing syncytia with intranuclear inclusions in the epithelial cells of uriniferous tubules. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

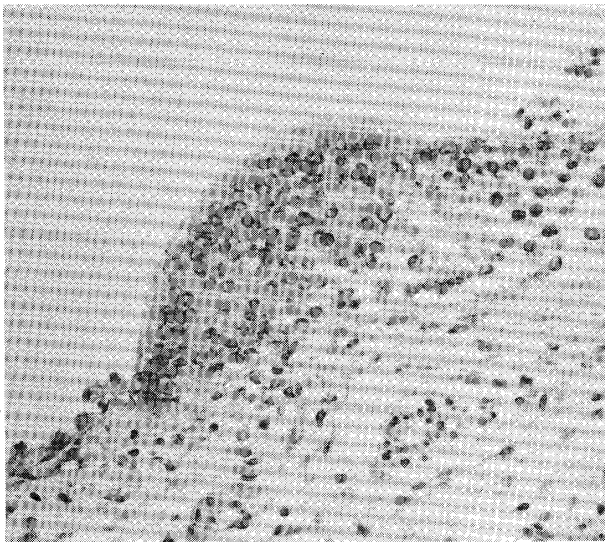


Fig. 51. Dermal lesions from a 15-day-old chicken embryo inoculated into the amniotic cavity at 11 days of age. Showing a group of nuclei containing inclusions in the epithelial cells of the epidermal layer. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

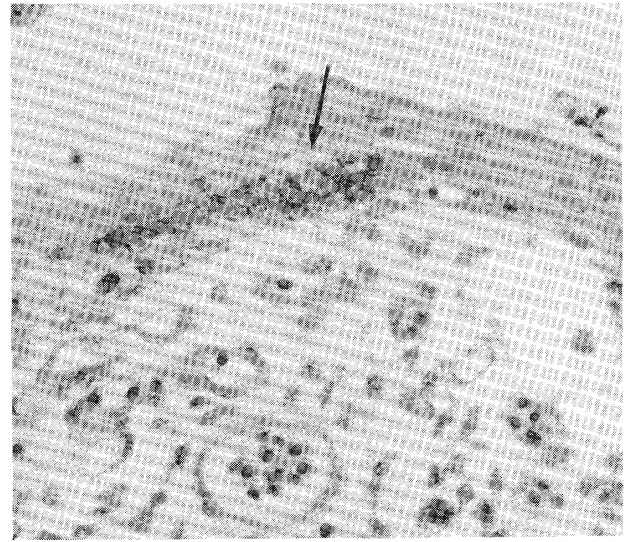


Fig. 52. Feather of the same embryo as Fig. 51. Arrow showing a group of nuclei containing inclusions in the epithelial cells of basal layer. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

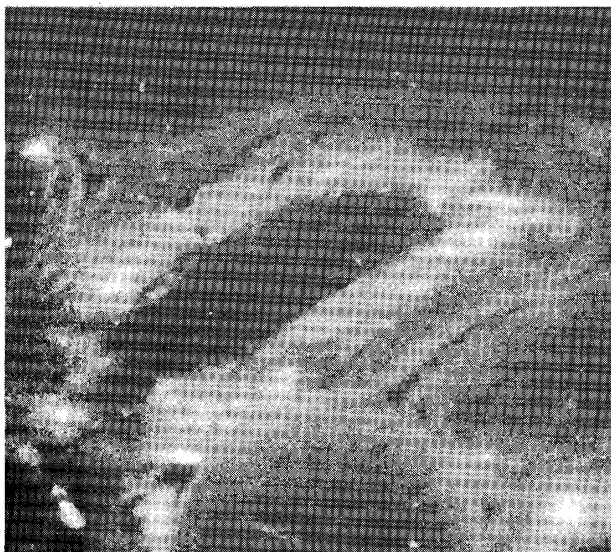


Fig. 53. Immunofluorescence in feather from a 15-day-old chicken embryo inoculated into the amniotic cavity at 11 days of age. Specific fluorescence in the epithelial cells of basal layer. Direct immunofluorescent antibody stain. Middle-power mag.

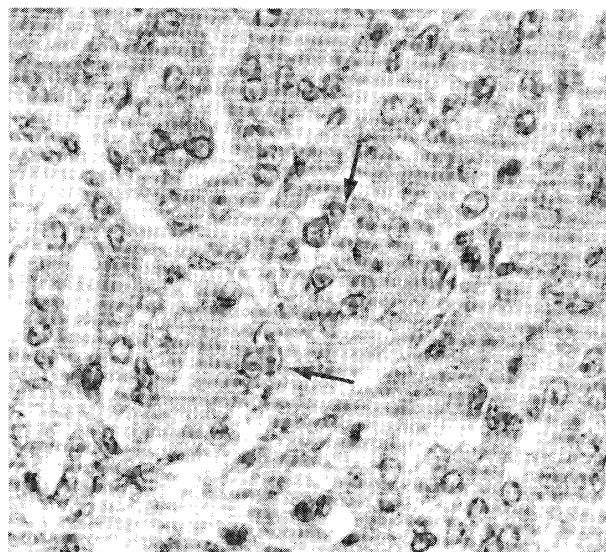


Fig. 54. Pancreas from a 18-day-old chicken embryo inoculated into the amniotic cavity at 11 days of age. Arrows showing groups of nuclei containing inclusions in the epithelial cells of pancreatic acini. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

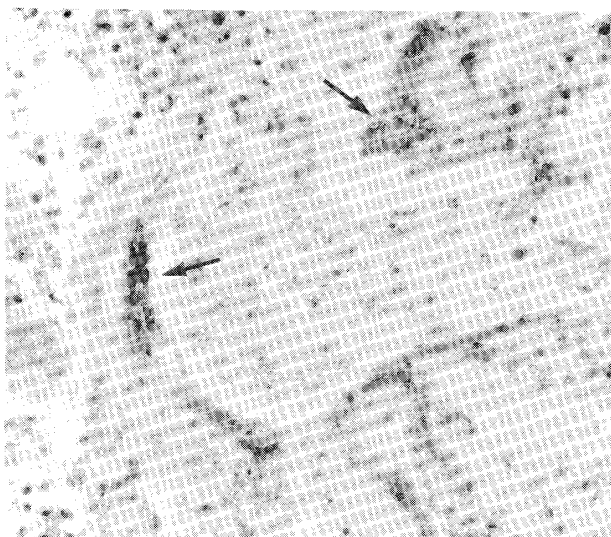


Fig. 55. Pulmonary lesions in a Japanese quail on 3 days after air sac inoculation. Notice marked distention of tertiary bronchus and atria with inflammatory exudate. Arrows showing groups of nuclei containing inclusion bodies. Hematoxylin-eosin stain. Low-power mag.

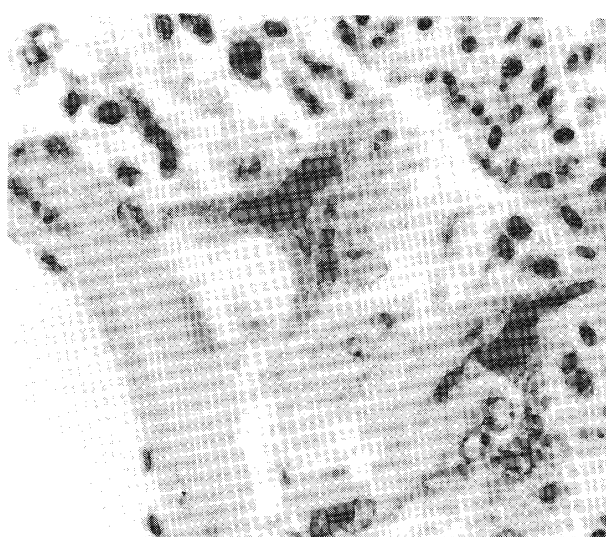


Fig. 56. Pulmonary lesions in a Japanese quail on 4 days after air sac inoculation. Showing intranuclear inclusions in the epithelial cells of atrial wall. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

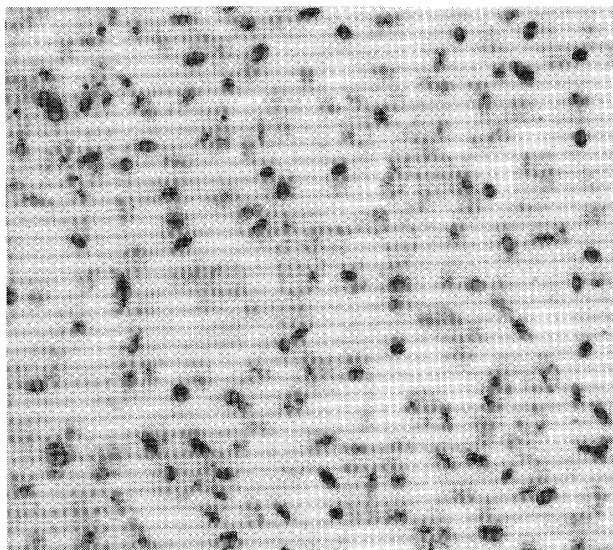


Fig. 57. Pulmonary lesions of the same quail as Fig. 56. Presence of intranuclear inclusion bodies in the epithelial cells of air capillary. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

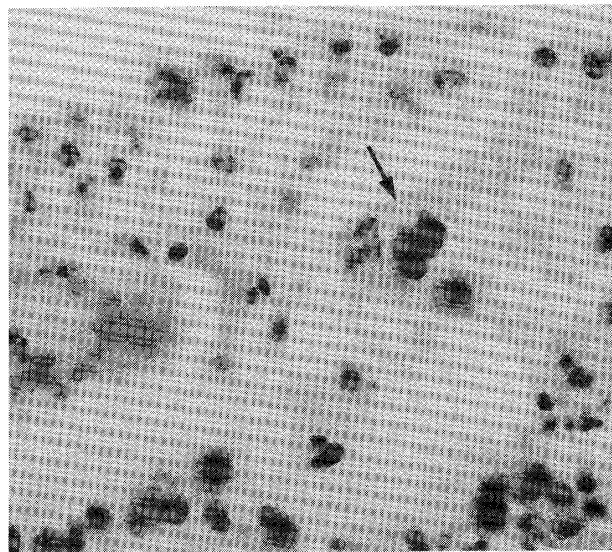


Fig. 58. Air sac lesions of the same quail as Fig. 57. Arrow showing intranuclear inclusions in the epithelial cells of air sac mucosa. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

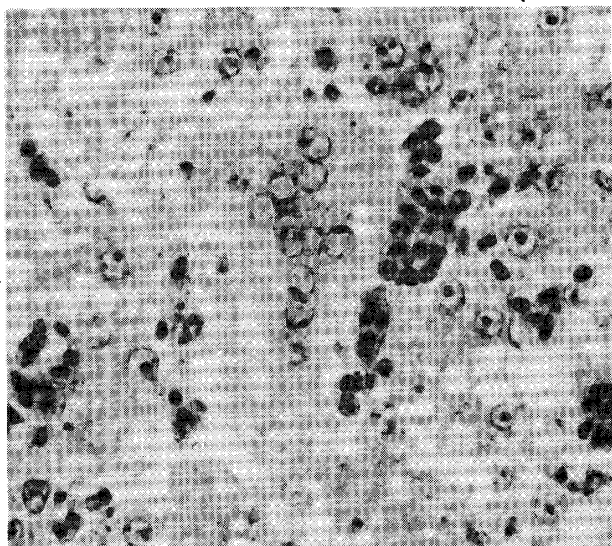


Fig. 59. Hepatic lesions in a quail on 3 days after intracerebral inoculation. Showing a group of hepatic cells containing intranuclear inclusions. Hematoxylin-eosin stain. High-power mag.

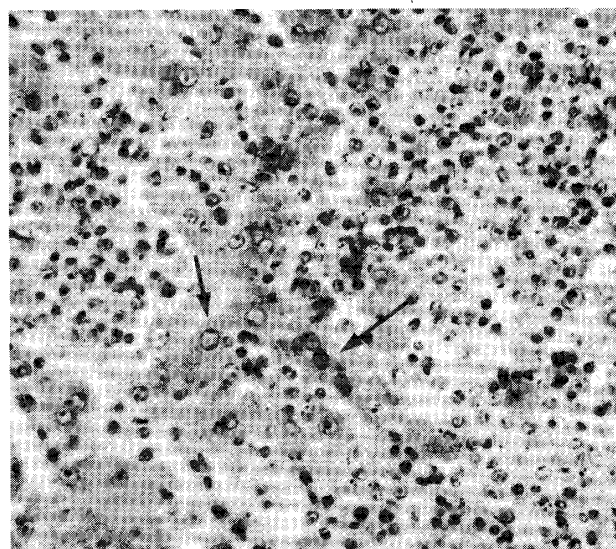


Fig. 60. Necrotic foci in the liver from a quail on 4 days after intracerebral inoculation. Showing reticuloendothelial proliferation around degenerate hepatic cells with intranuclear inclusions (arrows). Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

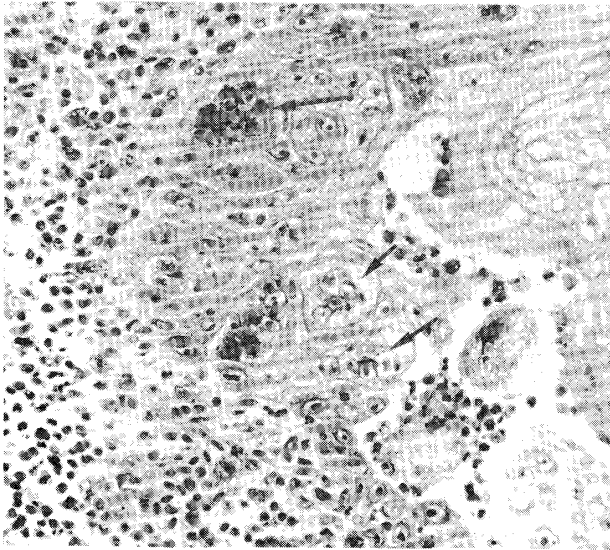


Fig. 61. Feather follicle of a quail on 3 days after feather follicle brushing. Arrows showing syncytia with intranuclear inclusions in the epithelial cells of feather follicle. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

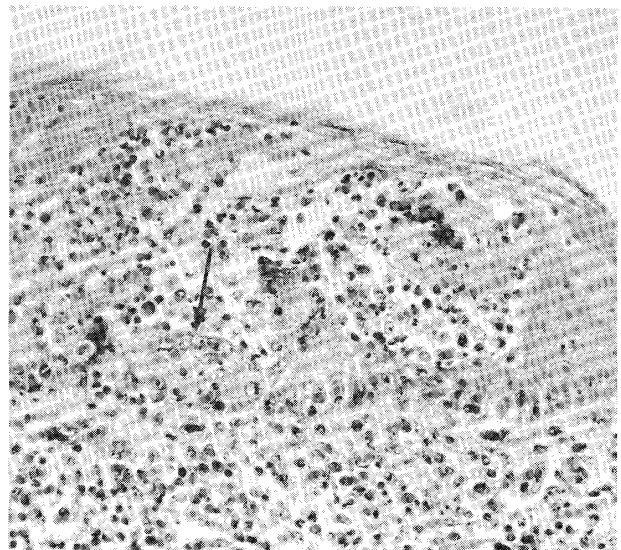


Fig. 62. Skin lesions of a quail on 5 days after feather follicle brushing. Notice the intraepidermal vesicle containing many lymphocytic and mononuclear cells. Arrow showing syncytial cell in the basal layer. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

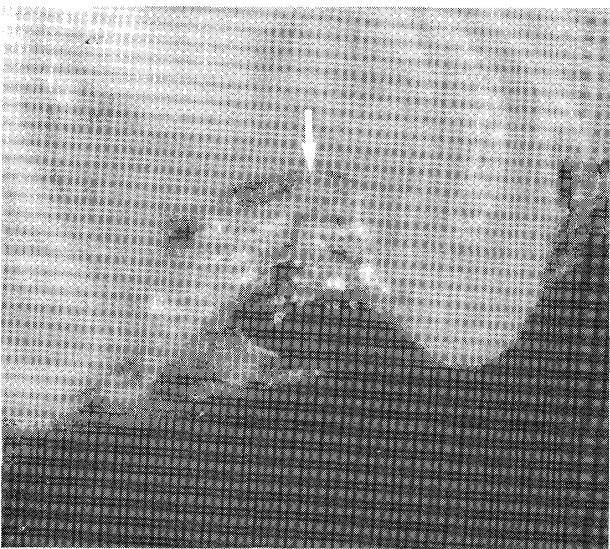


Fig. 63. Immunofluorescence in feather follicle from a quail on 4 days p.i.. Arrow showing specific fluorescence in the epithelial cells of feather follicle. Direct immunofluorescent antibody stain. Low-power mag.

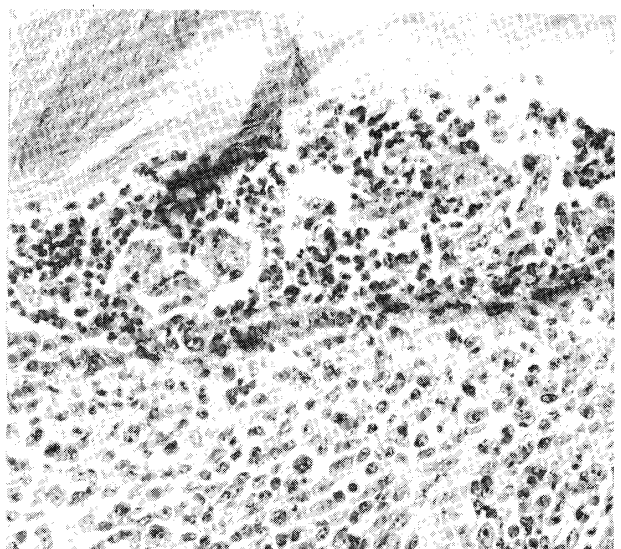


Fig. 64. Feather follicle of a quail on 6 days p.i.. Showing necrosis and desquamation of the epithelium, and severe inflammatory exudation in the necrotic area. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

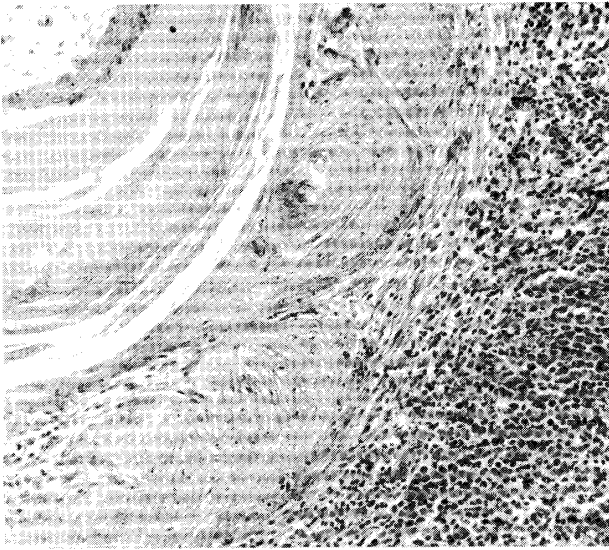


Fig. 65. Feather follicle of a quail on 8 days p.i. The epithelial cells of feather follicle begin to regenerate. Lymphocytic and reticulum cell proliferations are seen in the surrounding connective tissue. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.

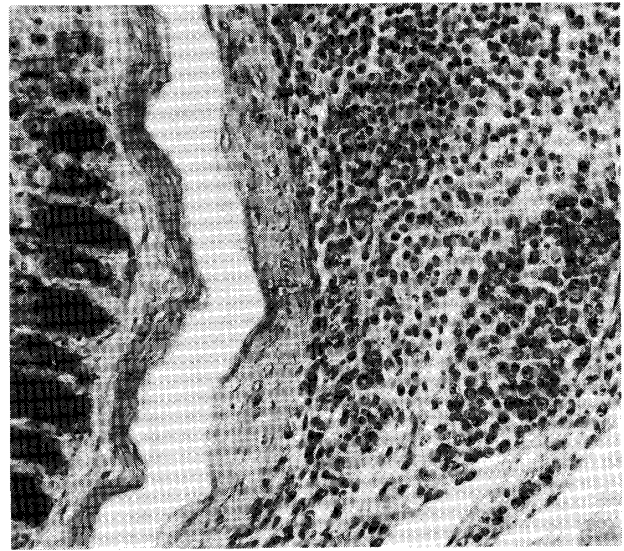


Fig. 66. Feather follicle in a quail on 12 days p.i. Feather follicle regenerates completely, and lymph-follicle appears in the surrounding connective tissue. Hematoxylin-eosin stain. Middle-power mag.