

学位論文題名

Etiological and Pathological Studies on
Rabbit Haemorrhagic Disease

（兎出血病に関する病因学的並びに病理学的研究）

学位論文内容の要旨

成兎が高熱を発し、100%の罹病率、70 - 100%の死亡率を示す急性ウイルス性疾患が、1984年に中国で初めて発生した。その後本病は、韓国、西及び東ヨーロッパの多くの国々、旧ソビエト、メキシコにも流行し、大きな被害をもたらしている。本病は病理学的特徴から兎出血病（rabbit haemorrhagic disease; RHD）と当初から命名されている。原因ウイルスはピコルナウイルスあるいはパルボウイルスと報告されてきたが、未だ確定されていない。RHDは肝の壊死性変化を特徴とするが、これとウイルスの増殖との関連性は明らかでない。

著者は、1985年から韓国の各地のアンゴラ兎に多発しているRHDの、原因ウイルスと特徴病変、さらにその病理発生の解明を目的として本研究を行った。特に、本病の原因ウイルスは韓国のみならず、本病の初発生国である中国でも同定されていないので、両国の原因ウイルス株を用い、その同定を行った。

第1章では、韓国の本病についてウイルス学的研究を行った。すなわち、韓国で本病により死亡した兎の肝乳剤上清を超遠心及びCsCl密度勾配遠心することによって精製ウイルスを得た。その浮上密度は $1.31 - 1.33 \text{ g/cm}^3$ であった。ネガチブ染色して観察した粒子は、直径約40 nm、表面に突起と凹みがあることが確認された。Markham rotation法による観察では正20面体構造を示した。次に、RHDウイルス感染後回復期の兎に、同ウイルスを追加接種して高度免疫血清を作製した。これによって得られた高度免疫血清のHI titerは1 : 131,072であった。これからIgGを精製し、Bayerの方法によってビオチン化した。RHDウイルス感染肝乳剤を高度免疫血清と反応させた後、Protein A-goldで標識して観察した。この結果、ウイルス粒子はコアの有無に関わらず凝集し、これらは金粒子で特異的に標識された。ウイルスの構成蛋白を精製ウイルス及び感染成兎由来の肝乳剤を用いてSDS-PAGE後、ウエスタン・ブロット法によって解析した結果その主蛋白の分子量は63kDaであった。

以上の成績から、RHDウイルスはカリチウイルスとみなされ、この知見は第4章の肝細胞に

おけるウイルス増殖パターンによっても支持された。

第2章では、本ウイルスを実験的に感染させた成兎16羽について病理学的に検索した。感染例は臨床的には元気消失、食欲廃絶、末期には鼻孔周囲に血様滲出物を示し、感染後20時間から96時間の間に全例が死亡した。主な肉眼病変は、肝の軽度腫大、退色、脆弱化及び肺、脾、腎等の充血並びに点状出血の散発であった。

おなも組織病変は急性壊死性肝炎、全身の臓器・組織における充・出血と撒種性血管内凝固（DIC）の形成であった。肝では、肝細胞の孤在ないし限局性変性・壊死が多発性に見られた。また、DICは腎糸球体、肺の毛細血管に特に著名であった。以上の結果から、本病の特徴病変は急性壊死性肝炎とみなされた。よって本病は、^レ兎のカリチウイルス性肝炎、と呼称するのが適当と考えられた。

第3章では、RHDウイルス感染組織のABC直接法による免疫染色を試み、ウイルス抗原の分布を検索すると共に、免疫染色法による診断法の開発を行った。本ウイルスを9羽の成兎（体重3.2kg以上）に接種したところ、全てが接種後4日以内に死亡し、組織検査ではいずれも本病特有の病変を示した。また、ホルマリン固定後のパラフィン切片と凍結切片の免疫染色では、いずれも特異的反応を示した。しかし、両切片を比較すると、凍結切片の方がやや優れた染色性を示した。ウイルス抗原は肝細胞の細胞質に顆粒状に認められた。肝細胞の抗原陽性反応の分布は、組織学的に認められた肝細胞の変性・壊死の分布と一致した。また、個々の肝細胞では、陽性反応は細胞辺縁により強く見られる場合と、細胞質全域に微細顆粒状に認められる場合とがあった。免疫染色は、肝、脾のほか、肺、心、腎、十二指腸及び盲腸の各組織切片に対しても試みたが、抗原陽性は脾の血管内皮細胞とマクロファージにのみ認められた。なお、免疫染色は blocking test の対照試験によって特異性が確認された。すなわち、RHDウイルス感染肝の組織切片に対する免疫染色は、特異性を示し、本病の診断並びに抗原検索に極めて有効であった。なお、免疫染色結果は、組織病理学的検索の結果と共に、RHDウイルスが肝細胞に強い親和性を有することを示した。

第4章では、実験的に感染させた兎11羽（殺例2羽、死亡例9羽）の肝組織を電顕的並びに免疫電顕的に検索し、主に肝細胞におけるウイルスの増殖と細胞小器官の変化を観察した。その結果、感染後12時間から肝細胞に変化が見られた。初期的変化は肝細胞の水腫性変性であった。壊死に陥った肝細胞では、細胞小器官は崩壊していたが、その細胞質に単位膜に囲まれた嚢胞、空胞及び小空胞が多発し、ウイルス粒子も認められた。すなわち、小空胞内には電子密度のある無構造物質を入れ、これとは別に、比較的大型の、単位膜に囲まれた空胞が散発し、これらの内部には自らの進入（突出）によって形成された空胞性破片が、時にはウイルス粒子を伴って認めら

れた。また、ウイルス粒子は細胞質に孤在しているほか、囊胞膜と空胞膜の周縁にも線上に配列していた。ウイルス粒子には結晶状あるいは類結晶状配列を示すものもあった。ウイルス粒子は直径35 nm でコアとスパイク様構造を持ったカプシドで構成されていた。なお、核にはウイルス粒子は認められなかった。以上のように、ウイルス粒子は細胞質の単位膜構造と密接に関連して増殖し、これは猫のカリチウイルス感染で観察されている増殖パターンと酷似していた。壊死に陥った肝細胞には、多くの場合ウイルス粒子が見られた。壊死に陥った肝細胞内あるいは類洞には偽好酸球が見られ、肝細胞の壊死はウイルスの直接的影響のほかに白血球の細胞毒性によることも示唆された。

第5章では、中国由来（中国株）と韓国由来（韓国株）の RHD ウイルスについて、ウイルス学的並びに病理学的に比較検討した。その結果、両ウイルスは、粒子の形態、構成蛋白質並びに抗原性において同一なばかりでなく、家兎に対する病原性(病変形成)にも差が認められなかった。さらに、電顕による観察においても、両ウイルス株は、共に肝細胞内で囊胞や空胞と関係を持って増殖することが示唆された。

以上の成績から、韓国のみならず、中国の RHD ウイルスもカリチウイルス属または株に属するものと結論された。また、RHD は兎における急性ウイルス性肝炎を起こす新しい疾病として浮き彫りにされた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	板 倉 智 敏
副 査	教 授	清 水 悠 紀 臣
副 査	教 授	橋 本 信 夫
副 査	助 教 授	喜 田 宏

成兎が高熱を発し、100%の罹病率、70%以上の死亡率を示す急性ウイルス性疾病が、1984年中国で発生した。以後本病は韓国をはじめ兎産業の盛んな国々に急速に蔓延し、大きな被害をもたらしている。本病は当初から兎出血病と呼称され、原因ウイルスについては未確定であった。申請者は本病についての病因並びに病態についての研究を行い、本論文をまとめた。

原因については、韓国と中国で発生した本病例の肝臓乳剤を出発材料とし、ウイルスの分離・精製を行った。その結果、ウイルスは直径約40 nm で、正20面体構造を示し、その主構成蛋白

の分子量は63KDaであることを明らかにした。

このウイルスを成兎に接種すると、接種後20～96時間で95%以上が死亡した。病理学的検索の結果、特徴病変は急性壊死性肝炎と播種性血管内凝固（DIC）であった。電顕的検索では、ウイルス感染後12時間から肝細胞が変性・壊死を示し、それらの細胞質にウイルス粒子が認められた。この粒子は、細胞質の囊胞膜あるいは空胞膜と関連を持ちながら複製していた。

本ウイルス接種後回復期にある兎に同ウイルスを追加接種して免疫血清を作製した。この血清を用いたABC法直接法による免疫染色を行った結果、感染兎の肝細胞の細胞質が特異的に陽性反応を示した。

以上の成績から、本病の原因は肝細胞に親和性を有するカリチウイルスで、病態としては急性壊死性肝炎であると結論づけた。

以上のように、申請者は、兎出血病について原因を含めた本態を明らかにした。この成果は本病の診断に有益であると共に、未だ知見の乏しいカリチウイルスの理解に貢献するところが大きい。よって審査員一同は、朴在鶴氏が、博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。