

臺灣地區發生雞包涵體肝炎之研究

Studies on Avian Inclusion Body Hepatitis in Taiwan

呂 榮 修

臺灣省家畜衛生試驗所

摘 要

自1976年2月以來，在本省大養雞場流行以肝炎為主徵的急性傳染病，病雞均突然死亡，病理診斷在感染雞肝細胞核內能檢出 Cowdry 之 Type A 及 Scott 等之 Full inclusion (B) 之包涵體。

由各病例病雞之肝材料接種於6~7日雞胚胎蛋黃內或雞腎臟 (Chicken kidney, CK) 培養細胞能分離病毒。

生物學性狀：在 CK 培養細胞呈現圓形化之 CPE，病毒接種後第7~9日形成圓形之 plaque，對雞胚胎有病原性，感染胎兒呈出血、矮小、水腫、肝壞死，在漿尿膜形成 pock，對各種動物血球並無血球凝集性。

理化性狀：分離毒能被 IUDR (50 μ g/ml) 抑制增殖，係屬 DNA 病毒，對20% Ethyl ether, 0.1% Sodium desoxycholate, 0.25% Trypsin, pH 3.0 及對 1 M/MgCl₂ 1小時之加熱均具抵抗力，分離毒能通過 100nm 之 Millipore filter，但不通過 50um pore size 之 filter。

分離毒對幼齡雞 (4日齡) 有病原性。

由以上研究之結果證實本病乃 Adeno virus 所引起之雞包涵體肝炎 (Inclusion body hepatitis; IBH) 與1963年 Helmboldt and Frazier 最初報告者能吻合。

緒 言

雞包涵體肝炎 (Avian Inclusion body hepatitis) 在1963年由 Helmboldt and Frazier 最初報告以來，本病已遍及美國各地，在加拿大、日本均有許多發生病例之報告，1975年在墨西哥也發現本病之流行。

以往在本省未曾發生本病，但自1975年以來，曾有類似病例散見於各地，至1976年，在北部某一大養雞場，首次發現以肝炎為主徵的急性傳染病在流行，本病死亡率高為養雞界帶來新的困擾，為了探討本病之發生，由臨床、病理、病原學方面從事研究，結果證實本病乃由 Adeno virus 所引起的雞包涵體肝炎，與1963年 Helmboldt 及 Frazier 最初報告之 Inclusion body hepatitis 完全一致，為有效控制本病之發生，對本病病原之研究至感重要。

材料與方法

(一) 病雞材料

由發生疾病之養雞場，帶回病雞及死雞供為研究。

(二) 病理學檢查

以肉眼觀察病變之後，放在10% Formalin 液固定然後製成組織切片，並以 HE 染色，鏡檢。

本論文摘要曾於臺灣省畜牧獸醫學會六十五年度春季演講會宣讀。

Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep., 13:1— (1976)

㊦病原之探討

細菌檢查對病雞及死雞主要臟器用 Blood agar 及 Trypticase Soy agar 以好氧性及厭氣性培養。

㊦雞腎細胞之製備

健康雞腎臟細胞以 0.25% Trypsin 消化後製成 0.4~0.6% 細胞懸浮液，然後放置含有牛 0.5% Lactalbumin hydrolysate, 0.1% Yeastolate, 5% 牛血清的 Earle's solution 中培養，俟其形成單層細胞後供為試驗。

1. 病毒分離

同時使用雞胚胎培養法及組織培養法分離病毒。

(1) 雞胚胎法：為人工隔離飼養之蛋雞所生產之雞蛋，經孵育 6~7 日後，接種病雞各臟器 5 倍乳劑上清液 0.2ml 於蛋黃內，觀察 10 日內有無漿尿膜 (Chorioallantoic membrane, CAM) 之變化，雞胚胎死亡或雞胚胎體表出血、肝壞死及胚胎呈水腫者認為病毒感染雞蛋。

(2) 組織培養法：將健康雞腎臟 (Chicken Kidney, CK) 細胞培養於 5.5cm 之培養皿 (Petri Dish) 中，接種病材肝臟 5 倍乳劑之上清液 0.4ml，然後觀察細胞變性 (Cytopathic effect, CPE) 之出現，或以 plaque 法觀察 plaque 之出現。

2. 病毒種屬之鑑定

理化學性狀之檢查，使用 5-iodo-deoxyurine (IUDR) 間接證明核酸，20% Ethyl ether, 0.1% Sodium desoxycholate, 0.25% Trypsin 處理後之病毒感染價，對各種動物血球之凝集性，對酸 (pH 3.0)，對熱 (1M/MgCl₂ 50°C 1 小時) 之抵抗力，Millipore filter (100nm 及 50nm) 過濾試驗及凍結融解對病毒感染價之影響。

3. 病毒含量測定

病雞之肝、腎、脾、胰、腦、氣管製成 5 倍乳劑後取上清液，接種於 CK 培養細胞，以 plaque 法算出 plaque 數為病毒量 (plaque forming Unit, PFU)。

4. 病原性試驗

(1) 對各種細胞之感染情形：利用猴細胞 (VE-RO)、鴨胚胎、雞腎、雞胚胎、兔腎 (RK)、猴腎 (MK) 等細胞觀察有無 CPE 之出現。

(2) 接種觀察：對雞胚胎蛋黃內及漿尿膜 (CAM) 接種觀察感染胎兒及 CAM 之變化。

(3) 對小雞接種試驗：健康小雞 (1~4 日齡) 腹腔內接種 10^{5.0} TCID₅₀/隻。

結 果

㊦發生狀況

本病之發生均在 6~8 週齡肉雞或肉雞種雞，其發生情形如表一。

表一 雞包涵體肝炎發生情形

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------|--------|--------|--------|--------|
| 發 生 時 期 | 1976,2 | 1976,2 | 1976,5 | 1976,5 |
| 發 生 地 區 | 林 口 | 關 西 | 后 里 | 后 里 |
| 雞 種 | 肉 雞 | 種 雞 | 肉 雞 | 肉 雞 |
| 雞 週 齡 | 6 | 8 | 6 | 8 |
| 飼 養 隻 數 | 5,000 | 2,000 | 4,500 | 3,500 |
| 死 亡 情 形 (隻/日) | 5~10 | 20~30 | 1~22 | (不明) |

(一)臨床症狀

在全無臨床症狀之下突然死亡者頗多，發病後在數小時內死亡，一般病雞呈衰弱，被毛逆立，食慾減退，時有下痢、黃疸、貧血、佇立腳弱。

(二)剖檢病變

剖檢病變情形見表二。

表二 剖檢所見（野外發生病例）

| 部位 | 變 狀 | 病 雞 號 碼 | | | | | | |
|----|---------------|---------|----|----|----|----|----|----|
| | | 29 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 |
| 肝 | 黃色脂肪肝、灰黃白色壞死斑 | — | — | + | + | — | — | — |
| | 腫大、黃褐色 | + | + | + | + | — | — | — |
| | 點狀、斑狀出血、腫大 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| 腎 | 褪色、腫脹、尿酸增加出血 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| 肺 | 肺炎 | 卅 | + | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | — |
| 氣管 | 黏液 | — | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 |
| 胸肌 | 出血 | 卅 | 卅 | — | — | — | — | — |
| 小腸 | 充血 | + | + | + | + | + | + | + |

病雞之肉眼病變，在皮下及肌肉內可見斜紋狀出血，肝脆弱脂肪化，腫脹及出血（如圖一）及灰黃色壞死斑點，腎臟呈棕黃色腫脹及出血，氣管內黏液增加，肺滲出物增多，小腸充血等較為顯著。其主要解剖變狀如表二所示。在肝臟變性細胞之核內能觀察到 Cowdry 之 Type A 及 Scott 之 Full inclusion (B) 包涵體（如圖二）。

(四)病原之探討

1. 細菌之檢查

病雞之各主要臟器如肺、肝、腎、脾、腦等細菌檢查均為陰性。

2. 病毒之分離試驗

從 7 例之各主要臟器材料接種於初代雞腎細胞，自 2 例之肝分離出能引起 CPE 之病毒，同時也形成 plaque，又病雞材料接種於 6~7 日齡雞胚胎經培養 5 日後即陸續死亡，胎兒之尿液，CAM 均能分離病毒。

3. 分離病毒之生物學性狀

(1) 雞胚胎之變化：分離毒接種雞胚胎卵黃囊後胎兒呈發育遲緩，體表出血、水腫、肝出血、綠色化、壞死（如圖三），如接種於 CAM 時膜面增厚，有白色斑點（pock）出現。

(2) 雞腎細胞增殖：病毒接種於雞腎培養細胞（如圖四）之後，自 36 小時開始增殖至 96 小時為最高感染價有 $10^{6.3}$ PFU/ml，在 CK 細胞呈圓形化之 CPE（如圖五），以 Maygrünwald-Giemsa 染色法在核內可以檢出 Cowdry 之 Type A 及 Scott 等之 Full inclusion body (B)。在 CK 細胞上病毒接種後 7 日形成圓形 plaque，其直徑在 0.5~3mm 之間（如圖六），分離毒對雞胚胎纖維芽細胞也同樣能引起 CPE，但對鴨胚胎纖維芽細胞及 VERO、RK、MK 等株化細胞不引起 CPE。

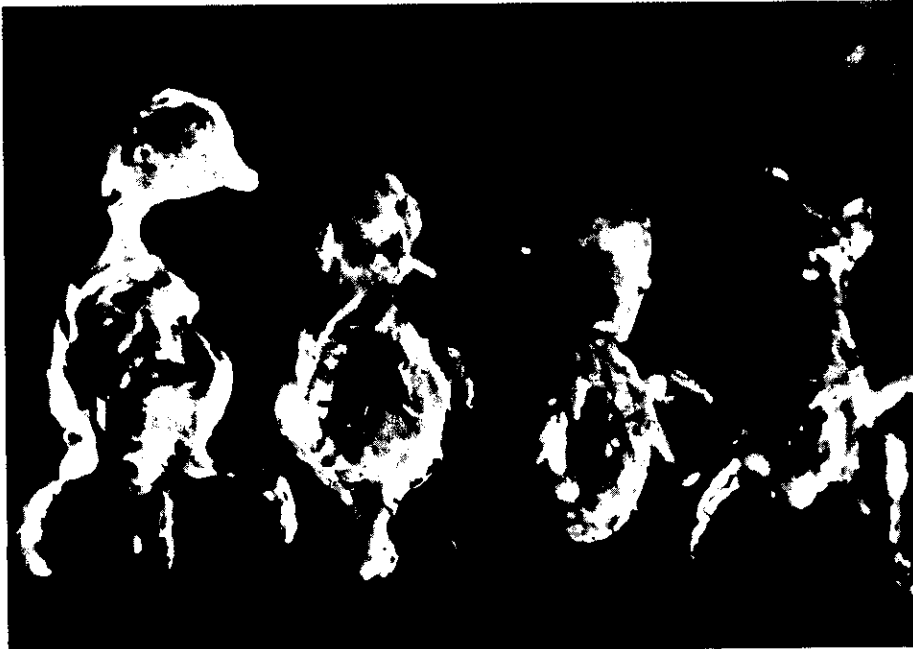
(3) 血球凝集性：分離毒在 4°C 及 37°C 不凝集雞、鴿、小白鼠、天竺鼠、家兔、山羊、綿羊、豬、牛、馬等紅血球。



圖一 肝之斑點狀出血 (野外病例)



圖二 病雞肝變性細胞上之核內包涵體 (HE染色)

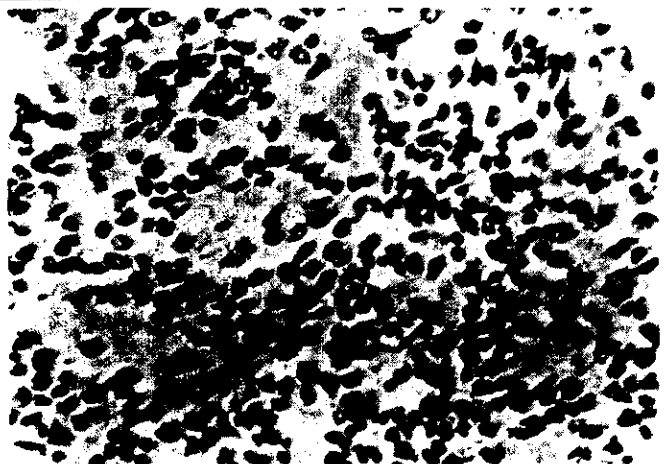


圖三 感染IBH 雞胚胎之體表出血及肝壞死



圖四 正常雞腎臟培養細胞第七日×70

圖五 分離毒在CK細胞上之 CPE
第七日×70



4. 分離毒之理化學性狀

分離毒在添加 IUDR 50 μ g/ml 之培養液中被抑制其增殖，對 20% Ethyl ether, 0.25% Trypsin, 0.1% Sodium desoxycholate, pH 3.0及對熱 (1M/MgCl₂ 50°C 1小時之處理) 均具抵抗力，且分離毒不通過 50nm 之 Millipore filter 但能通過 100nm 之 Filter，對凍結融解並不影響其感染價。其成績如表三。

5. 各主要臟器之病毒含量試驗

病雞各主要臟器製成乳劑後接種於 CK 培養細胞以 plaque method 算出其 PFU 結果，6 例中僅 1 例之肝臟有 10^{2.12} PFU/ml 之病毒，其它均為陰性，其成績如表四。

6. 分離病毒對小雞接種試驗

分離毒 10^{5.0} PFU/隻接種 0.1ml 於 4 日齡小雞腹腔內結果 10 隻中 8 隻發病 (80%)，其中 6 隻死亡 (75%)，斃死小雞之剖檢病變肝之出血變狀不甚明顯，但肝有輕度腫大，脂肪化及脆弱化，並能自 8 隻發病雞肝臟分離出接種病毒。

表三 分離毒之理化學性狀

| 試 驗 項 目 | 處 理 方 法 | 感 染 價 | |
|----------------------|--------------------------------|-------|-----|
| | | 前 | 後 |
| 核 酸 | 1UDR50 μ g/ml | 5.5* | 1.5 |
| Ethyl ether | 20%37°C 1 小時後冰室 1 夜 | 4.8 | 4.8 |
| Sodium desoxycholate | 1 %37°C 1 小時後冰室 1 夜 | 5.0 | 5.2 |
| Trypsin | 0.25%37°C 1 小時後冰室 1 夜 | 5.5 | 6.5 |
| 酸 | 30°C 1 小時 | 5.0 | 5.0 |
| 熱 | 1M/MgCl ₂ 50°C 1 小時 | 5.5 | 4.5 |
| 過 濾 | Millipore filter 100nm | 5.5 | 4.8 |
| 過 濾 | Millipore filter 50nm | 5.5 | 0 |
| 凍結融解 | 37°C與70°C 5 次 | 5.5 | 5.5 |

*log PFU/ml



圖六 分離毒在CK培養細胞上所形成之plaque第七日

表四 各臟器病毒含有情形

| No. | 氣 管 | 肺 臟 | 肝 臟 | 胰 臟 | 腎 臟 |
|-----|-----|-----|-------|-----|-----|
| 1 | — | — | — | — | — |
| 2 | — | — | 2.12* | — | — |
| 3 | — | — | — | — | — |
| 4 | — | — | — | — | — |
| 5 | NT | NT | — | NT | NT |
| 6 | NT | NT | — | NT | NT |

* : log PFU/ml ; NT : not tested ; — : 陰性。

討 論

雞包涵體肝炎 (Inclusion body hepatitis) 在1963年由 Helmboldt and Frazier⁽¹⁰⁾ 最初報告，至1970年以來在美國各地均有發生病例報告^(8,9,12,13)，在加拿大 (1970)⁽¹¹⁾ 也發生病例甚多，日本於1968年由中松發現最初病例以來，至目前也有不少有關本病之發生報告⁽¹⁻⁷⁾，本省於1975年有類似病例在各地散見，至1976年2月始證實本病之發生病例，因 IBH 之發生歷史雖短，但其為害之程度逐漸為人所注目，本病之病原已由許多研究者認為是 Adeno virus 所引起^(1-3,5,9)，筆者由本流行病例中首次分離之病毒的生物學性狀及理化性狀亦鑑定為 Adeno virus 所感染。

對本病之診斷許多研究者^(6,8,13)，在感染病雞肝細胞核內能檢出 Cowdry 之 Type A 及 Scott 等之 Full inclusion (B)，在雞腎細胞之變性細胞核內同樣可看到 inclusion body，因此本病之診斷並非困難。

對本病毒分離最佳之方法以肝乳劑接種於雞胚胎蛋黃內接種法或接種於 CK 或 CEF 培養細胞，此與 Fadly 及 Winterfield⁽⁹⁾ 及其他學者^(1,2) 所報告者頗能吻合。

有關本病病原 adenovirus 對小雞之接種試驗^(5,4) 應使用 SPF 小雞，且其年齡在 1~7 日齡者感受性頗高能引起發病或死亡，14 日齡以後發病率較低，此與野外發生病例稍有差異，野外病例在 8 週齡有 10% 以上之死亡且剖檢變狀頗為顯明，但人工感染者雖能感染 1~7 日齡小雞，但其解剖變狀並無野外病例之特徵，此種感染是否尚有其他之因素值得檢討，如山口等⁽⁵⁾ 報告的本病毒 $10^{7.3}$ PFU/0.1ml 接種 0.2ml 於 4 週齡 SPF 雞後至 4 日在肝、胰、小腸、直腸尚有 10^6 PFU/ml，以上之病毒，依次在腎、滑氏囊、氣管也有高單位之病毒，但筆者等在野外病例 6 例中，僅 1 例之肝檢出 $10^{2.12}$ PFU/ml 之病毒，其餘臟器均無法檢出病毒，此種自然病例與人工感染病例之差異有待今後之研究，而且本病之感染途徑，是否如 Fadly 及 Winterfield 所指摘本病之發生與其種雞頗有關連，可否介卵傳播值得探討，本病在臺灣既然構成威脅應及早謀求防疫對策，如用疫苗之控制將是今後努力之目標。

誌 謝

本研究報告承蒙國家科學委員會之獎助；又蒙臺灣省立屏東農業專科學校劉副教授正義對病雞肝組織核內包涵體之檢查予以協助；復蒙國立中興大學獸醫系主任吉德之斧正，謹此一併致謝。

参考文献

1. 平松計久、中井正久、中山純子、佐佐木文存 (1975) : 鶏の封入體肝炎に関する研究。I. 罹患鶏より分離したウイルスの性状について。日本獣醫學會, 79 : 83 (演講要旨)。
2. 大槻松一、坪倉操、直川志律子、板垣啓三郎、齊尾秀隆、細川 大 (1975) : 鶏の封入體肝炎の病原に関する研究。I. 分離ウイルスについて。日本獣醫學會, 77 : 41 (演講要旨)。
3. 森田廸夫、伊藤志津子、齊加啓三、菊地龍彦、佐藤多津雄、涉谷重雄 (1975) : 野外鶏からアデノウイルスの分離。日本獣醫學會, 80 : 132 (演講要旨)。
4. 山田進二、上川慎一、内布洋一、池上敬之、木下 且、西岡 修 (1975) : 鶏の封入體肝炎罹患鶏由来アデノウイルスの鶏接種試験。日本獣醫學會, 79 : 84 (演講要旨)。
5. 山口成夫、川村齊、谷口稔明 (1974) : 鶏の封入體肝炎罹患鶏から分離したアデノウイルスの接種試験。I. 接種鶏體內におけるウイルスと蛍光抗原の分佈。日本獣醫學會, 78 : 74 (學會記事)。
6. 山中進吾、喜田英治 (1974) : ブロイラー鶏羣に見られた封入體肝炎の一發生例。鶏病研究會報, 10(9) : 105-109。
7. Antilnon, A. and B. Lucio, (1975) : Case report-Inclusion Body Hepatitis in Mexico. Avian Dis. 19 : 192-195.
8. Bickford, A. A., M. A. Krasovich, and A. M. Fadly, (1973) : Demonstration of virus Particles in Hepatic cell of Chicken with Inclusion Body Hepatitis. Avian Dis. 17 : 629-638.
9. Fadly, A. M. and R. W. Winterfield (1973) : Isolation and Some Characteristics of an agent Associated With Inclusion Body Hepatitis, Hemorrhages and Aplastic Anemia in Chickens. Avian Dis 17 : 182-194.
10. Helmboldt, C. F. and M. V. Frazier (1963) : Avian Hepatic Inclusion Bodies of Unknown Significance. Avian Dis 7 : 446-450.
11. Howll, J., D. W. Macdonald, and R. G. Christian (1970) : Inclusion Body Hepatitis in Chickens Can. Vet. J. 11 : 99-101.
12. Laursen-Jones, A. P. (1972) : Inclusion Body Hepatitis. Vet. ReC. 90 : 166.
13. Pettit, J. R. and H. C. Carison (1972) : Inclusion Body Hepatitis in Broiler Chickens. Avian Dis 16 : 858-863.

Studies on Avian Inclusion Body Hepatitis in Taiwan

Yong-Siu Lu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

Abstract

The large scale chicken raising farms in Taiwan, have been sporadic observed with an acute infectious fatal liver disease since February, 1976. The affected chickens died suddenly. The Cowdry' type A and Scott' full intranuclear inclusion body could be observed from the affected liver.

The virus has been successfully isolated from the affected liver by the inoculation of chicken kidney cell culture and the yolk sac of 6-7 day-old chicken embryo.

The biochemical properties of isolated virus are : The production of characteristic cytopathic effect (rounding of cells) and the plaque formation in the CK cell culture after 7-9 days of inoculation. Positive pathogenicity to the infected chicken embryos with the lesion of hemorrhage, edema, dwarfing and hepatic necrosis, and production of pock on the chorioallantoic membrane. No hemagglutination of red blood cells of various species.

The biophysical properties of the virus are resistant to 20% ethyl ether, 0.1% sodium desoxycholate, 0.25% trypsin, pH 3.0 and 1 M/MgCl₂ heating for 1 hour. The virus can pass through 100 nm Millipore filter but not 50 nm filter. The virus is DNA virus (treatment of 50 μ g/ml IUDR) .

The isolated viruses are pathogenic to young chicken (4 day-old) .

From the above results, it was suggested that the Inclusion Body Hepatitis (IBH) caused by Adeno-virus was similar to that the first report of this disease by Hemboldt and Frazier.