

学 位 申 請 論 文

マレック病の免疫方法に関する研究

とくに七面鳥ヘルペスウイルスに由来するワクチンの開発について

(要 旨)

藤 川 英 雄

マレック病（以下MDと略す）はヘルペス型ウイルスによつて起る鶏の伝染性疾患で、最初に報告したのはハンガリーのMarekである。1907年に白血病の研究を行なつたマレックは神経病変を示すものは他の白血病とは異なることを病理学的に証明した。その後MDは欧米において若齢ひなに1950年後半から1960年前半にかけ集団的に発生し注目されたが、現在では世界各国に流行発生している。我国においてもMDは1963～1964年頃より発生しはじめ、今日では全国的に蔓延し、そのためひなの育成率低下の大きな原因となつた。ことにひなは30～120日齢時に発病し死亡するため養鶏業界に甚大な被害を与えた。

MDの病原体は1967年Churchill and Biggsにより分離され、細胞随伴性の強いヘルペスウイルス（以下MDHVと略す）であることが明らかにされた。MDの予防に関する研究は、病原体が分離され、各種の性状が検討されはじめると同時に始められ、ワクチンの研究はもとより、遺伝的抵抗性を持つ鶏の作出および閉鎖環境下での飼育が検討された。後二者ではそれぞれよい成績が得られたが、実際養鶏場での実施には経済的負担が著しく大きいと、ワクチンの開発を望む声が高かつた。ワクチンについてはヨーロッパでは強毒を弱毒化したMDHVあるいは自然界より分離した弱毒MDHVを用いるもの、またアメリカではMDHVと抗原的にきわめて類似しており、かつ鶏に対して病原性を示さない七面鳥ヘルペスウイルス（以下HVTと略す）をMDワクチンとして利用しようとする試みがなされた。いずれのワクチンも野外ではMDの予防に効果のあることが報告された。いづれも我国においてはまだMDワクチンの開発はされていない。そこで著者はMDワクチンの開発を目的に本研究に着手した。

まず、本研究を進めるにあたり攻撃用の強毒ウイルスが必要であり、またMDの予防方法を確立するためにはMDHVそのものの性状をも検討する必要が認められたので、野外からMDHVの分離を試みた。その結果強毒MDHVは6株分離され、またこの分離株の2・3の性状を明らかにした。つづいて分離MDHVを用い九州地方におけるMDの疫学をゲル内沈降反応を用い検討を行なつた。その成績からMDHVは1964年頃より九州地方にはすでに広く浸潤していたことがわかつた。

次にHVTのMDに対する発病防止効果に着目し、日本で飼育されている七面鳥からHVTの分離を試みた。その結果7群中2群より多数のウイルスが分離され、その代表株（YT-7株と命名）の性状を詳細に検討したところ、HVTと同定された。HVTを用いてMDワクチンの研究を進め、ワクチンが実用化されるため必要な諸条件を検討し、凍結および乾燥ワクチンの試作に成功した。また試作ワクチンを用いて野外における本ワクチンの効果とその影響が詳細に検討された。さらにワクチン接種時の省力化を目的としMDおよびニューカッスル病（以下NDと略す）混合生ワクチンを試作して実験室内および野外応用試験を行ない、実用可能な成績が得られた。

以下著者が検討し得られた成績の概要について述べる。

1) 野外からの MDHV の分離およびその性状

1970年8月佐賀県の某養鶏場において臨床的にMDと診断された120日齢の鶏10羽より腎臓の直接培養でMDHVの分離を試みたところ9例中6例よりウイルスが分離できた。分離ウイルスの代表株(SD-3株と命名)について2・3の性状が検討された。分離ウイルスは鶏、アヒルおよび七面鳥由来の初代培養細胞に病原性を示し、屈光性の強い円形細胞の集族を特徴とするCPEを出現させたが細胞随伴性の強い性質を示した。また感染細胞は癒合して多核巨細胞となり、核内にはA型の封入体が認められた。しかし兎、モルモット、マウス、豚、牛腎、牛睾丸およびマウス胎児の初代細胞、猿、豚およびハムスター腎、ハムスター肺、人羊膜の継代細胞ではウイルスは増殖せず、CPEも認められなかった。分離ウイルスを发育鶏卵の漿尿膜上に接種するとボックを形成し増殖したがIUDR添加により増殖は阻害された。電顕により形態学的な追求を行なったところヘルペス型のウイルス粒子が認められた。次に分離ウイルスの赤血球凝集性が鶏、モルモット、兎、牛および馬血球を用いて検討されたが、MDHVの凝集する血球は認められなかった。分離ウイルスを1日齢SPFひなの腹腔内に接種したところ、70日齢時までに33例中2例に症状を、10例に肉眼病変を、また全例に組織学的に変化が認められた。病変の部位は肝、脾、腎、肺および腺胃に著明で、神経には特に多発する傾向は認められなかった。また接種および不接種同居鶏全例からウイルスが回収され、ゲル内沈降抗体は50%のものが陽性を示した。

2) MDの疫学的検討

1964年に九州各県から収集された544例(A群)および1968~1971年に収集された871例(B群)計1415例の血清についてゲル内沈降反応により抗体調査が行なわれた。その結果A群の血清では検査全県に陽性例が認められ、陽性率は低い県で15.4%、また高い県で44.8%であった。B群の血清では0~84.3%の陽性率が得られた。このことからMDHVはすでに1964年頃より九州地方に広く浸潤していたことが明らかになった。次に抗体陽性率は日齢により差があり、1~30日齢では1%であったが90~120日齢時になると72.4%を示し、日齢の進むとともに高くなった。鶏の系統別にみるとハンドレスでは10%の陽性率であったがデカルブでは68.8%と高く、系統により陽性率に差がみられた。次いで熊本県内で

得られた1～3日齢のひなを7群について移行抗体の保有状況を検討したところ、1群を除き55～83%の陽性率が得られた。これらMDHVの移行抗体は12日齢まで認められたが、15日齢以上では陰性となった。またウイルス感染後の能動抗体の出現は早いもので30日齢、遅いものでは100日齢から認められた。その他七面鳥、アヒル、鳩、牛、犬および人の血清にはMDHVに対する抗体は認めなかった。次にふ化後日齢毎にウイルス分離試験を行なったところ、汚染環境下では9日齢のひなから、消毒の行なわれた環境下では28～33日齢時からウイルスが検出された。

3) 野外からのHVTの分離およびその性状

健康な七面鳥の血液、腎および毛のう部からウイルスの分離を試みたところ、熊本県収集の37例は全例陰性であったが、山口県収集の43例中39例の血液から分離できた。この分離ウイルスの代表株(YT-7株)について2・3の性状が検討された。

分離ウイルスは鶏胎児線維芽細胞(以下CEFと略す)およびアヒル胎児線維芽細胞(以下DEFと略す)に屈光性の強いCPEを現わした。感染細胞は多核巨細胞となり、核内にA型の封入体を形成した。またウイルスは細胞随伴性が強く、発育鶏卵で増殖し、漿尿膜上にはボックを形成した。しかしIUDR添加により増殖は阻害された。分離ウイルスを電顕により形態学的に追求したところヘルペス型のウイルス粒子が認められた。次に鶏、モルモット、兎、牛および馬の血球を用いて分離ウイルスのHA性を検討したが凝集した血球はなかった。その他分離ウイルスは実験用小動物(乳のみマウス、成熟マウス、乳のみモルモットおよび兎)に対して病原性を示さず、また哺乳動物由来の初代(兎、モルモット、マウス、豚、牛の各腎、マウス胎児および牛睾丸)および継代(猿、豚、ハムスター腎、ハムスター肺および人羊膜)細胞では増殖しなかった。次に分離ウイルスを1日齢SPFひな20羽の腹腔内に接種し70日間臨床症状を観察したが、臨床症状を示したものは1例もなく正常に発育した。また70日齢時の剖検および組織学的所見においても全例変化は認められず、抗体は全例陽性であった。

4) HVT凍結生ワクチンの野外応用試験

HVT(FC-126株)を用いてMD凍結生ワクチンを作成し産卵鶏および肉用鶏に対する野外応用試験が行なわれた。

産卵鶏に対する接種試験は熊本県内の5養鶏場をえらび接種群10,174羽、対照群4,972

羽を対象とし、ワクチンは1,000 PFU/羽を腹腔内あるいは皮下に接種し、180日間観察した。この間死亡とうたされたもの全例についてその原因が病理組織学的に検討された。その結果ワクチン接種後臨床的に異常を示すひなは認められなかった。供試鶏の死亡とうたの割合は接種群3.3~10.1%、平均7.5%であつたが対照群では6.1~23.2%、平均14.4%で、接種群では対照群に比較し死亡とうた率が48.1%減少した。これらの死亡とうた率を推計学的(χ^2 -test)に検討すると両群間に有意差($P<0.001$)が認められた。死亡とうた原因の主なものは虚弱、事故、カンニバリズム、発育不良、MD、白血病および慢性呼吸器病などであつた。虚弱、事故および卵巣異常を除いたその他の死亡とうたの原因は接種群では対照群よりいずれも少なかった。MD発生数はワクチン接種群で1.1%および対照群では7.1%で両群間には推計学的に有意差($P<0.001$)が認められ、接種群のMD発生数は対照群に比較し84%減少した。ワクチンウイルスは180日間91.4~100%回収され、また低率ではあるが同居感染が認められた。ワクチン接種鶏でも野外MDHVの感染を阻止できず重感染が成立していた。MDHV抗原によるゲル内沈降抗体陽性率、伝染性気管支炎ウイルス中和抗体価、マイコプラズマガリセブチカム凝集抗体陽性率およびND-H1抗体価には接種群および対照群との間に差を認めず、また体重の増加率および産卵率においても差は認められなかった。

肉用鶏に対する接種試験は4養鶏場をえらび接種群103,509羽、対照群36,021羽を対象とし、ワクチンは1,000 PFU/羽を1羽量として1、1/2および1/4羽量を皮下に接種し49~70日間観察した。さらにまた出荷時食鶏処理場で腫瘍病変の出現状況が観察された。その結果、死亡とうた率では接種および対照群で差を認めなかったが、腫瘍発生数は対照群に比較し接種群で88.7%減少し、推計学的に両群間に有意差($P<0.001$)を認めた。次に各鶏群について、各回50~150羽宛体重を測定し、その平均値とばらつきを求めた。その結果接種群の平均体重は対照群に比較し10~100g重く、また体重のばらつきも少なかった。ワクチンウイルスは17日齢時から回収され、またゲル内沈降抗体も33日齢から陽性となった。飼料要求率は接種群で0.06~0.11、平均0.09少なく、経費計算をすると1羽当り14.38円の増収があつた。

以上の成績からHVTを用いた凍結生ワクチンはMD発病予防および肉用鶏の飼料要求率を減少させるため、きわめて有効なワクチンであると思われる。

5) HVT凍結乾燥ワクチンに関する検討

HVT分離株(YT-7株)はDEFおよびCEEで継代を重ねると細胞フリーウイルスの量が

次第に増加し、DEF 12代—CEF 40代継代株では 6.5×10^6 PFU/mlの細胞フリーウイルスが得られるようになった。また細胞フリーウイルスの性状を検討したところ原株と同じ性状が得られた。この継代ウイルスを用いて凍結乾燥ワクチンが作成され、1日齢SPF ひなに200~9,000 PFU/羽接種した。その結果接種群は全例臨床的に異常を示すものではなく、ゲル内沈降抗体は15週齢時80%の陽性率であり、ワクチンウイルスは100%のものから回収された。また3週齢時に攻撃試験を行なったところ対照群は80%にMD病変が認められたが、ワクチン接種鶏ではMD病変を示すものはなかった。次に同居感染試験を行なったところ実験室内試験では同居感染は成立しなかった。つづいて $10^{1.0} \sim 10^{5.0}$ PFU/羽のウイルスを1日齢の移行抗体陰性および陽性ひなに接種しウイルスの回収試験を行なった。その結果抗体陰性ひなでは $10^{1.0}$ PFU/羽接種群においてもワクチンウイルスは回収された。しかし大量($10^{2.0} \sim 10^{5.0}$ PFU/羽)接種群に比較し、その回収率は低かった。また移行抗体保有ひな群は $10^{3.0}$ PFUのワクチンウイルスを接種した場合、ウイルスの回収時期がおくれた。

このワクチンについて5養鶏場のひな13,965羽(接種群10,384羽および対照群3,581羽)を用いて野外応用試験が行なわれた。観察は150日間行ない、この間死亡とう汰したもの全例についてその原因を病理組織学的に検討した。

ワクチンは皮下に0.2 ml ($1,600$ PFU/羽)宛接種された。その結果ワクチン接種により異常を示したひなは認められなかった。死亡とう汰数は接種群468例(4.5%)、対照群271例(7.6%)で減少率は41.8%であった。MD発生数は、接種群117例(1.13%)、対照群133例(3.71%)で、MDの減少率は69.7%を示し、両群間には推計学的に有意差($P < 0.001$)を認めた。ワクチンウイルスは150日間、79~90%のものから回収され、また5群中1群に同居感染した例があった。ゲル内沈降抗体は121~150日齢時に72%の陽性率を示した。またワクチン接種鶏は野外MDHVの感染を阻止せず重感染が成立していた。

これらのことからこの乾燥ワクチンは凍結ワクチンと同様に十分野外に応用できるものと思われる。

6) MD (HVT)・ND混合生ウイルスワクチンに関する試験

HVT およびニューカッスル病ウイルス(以下NDVと略す)B₁株二種混合生ワクチンを作成し安全性および免疫原性が検討された。供試ひなはSPFおよび市販の1日齢ひなで、1羽量(HVT 1200~2200 PFU/羽、NDV $10^{6.1} \sim 10^{6.5}$ EID₅₀/羽)の混合ワクチンを皮下、筋肉および腹腔内に接種した。その結果混合ワクチンおよびMD単味ワクチン接種鶏との間にMDワ

クチンウイルス回収率、MD中和価および攻撃試験による発病防禦に差はみられず、また混合ワクチンおよびND単味ワクチン接種鶏の間にもND-HI価および攻撃試験による耐過率に差がなかった。接種部位は腹腔内接種が皮下および筋肉内に比べてよかった。混合ワクチン接種後3日毎にMDワクチンウイルスの回収試験を行なったところ6日目では86~100%回収され、MD単味ワクチン接種群と比較し差を認めなかった。また混合ワクチンの接種は、その後に再接種されたND単味生ワクチンの免疫効果に影響を与えなかった。NDワクチンウイルスの同居感染は市販およびSPF ひなともに点鼻したND単味ワクチン群より皮下接種した混合ワクチン群で起りにくかった。市販およびSPF ひなを用いて安全試験を行なったところ、市販ひなでは全例接種反応は陰性であったが、SPF ひなではND単味ワクチンと同程度の軽い一過性の呼吸器症状(5~10分間に1~2回クシャミ)が認められた。しかし反応を示したひなは発育には影響をうけなかった。次に混合ワクチンを用いて2養鶏場のひな5,092羽(混合接種群3,014羽、MD単味接種群2,078羽)に野外応用試験を行ない、観察は120日間実施した。その結果混合ワクチン接種後接種反応が認められたものは1例もなく、120日齢時の育成率は96.1および98.8%と良好であった。またこれらの接種ひなからはMDワクチンウイルスが100%回収され、ND-HI抗体の上昇も認められた。次に試験管内でHVT およびNDV B₁株の干渉の有無を検討したところ相互に干渉は起さなかった。

以上の成績から、この混合ワクチンは実用可能なものと考える。