

ニューカッスル病に関する研究

— 特に1967年を中心として最近3
ケ年間の流行例より分離したウイル
ス株の生物学的諸性状について —

吉 村 政 雄

目 次

第一章 緒 論	1
第二章 供試ウイルスの病原性	9
I 研究材料および方法	9
1 供試ウイルス	9
1) 分離ウイルス	9
2) 対照ウイルス	9
a) 佐藤株	9
b) B ₁ 株	9
c) 石井株	10
d) T.C.N.D 株	10
2 鶏および孵化鶏卵	10
3 抗NDウイルス血清および螢光色素標識血清	10
4 供試ウイルスの病原性試験	11
5 供試ウイルスの鶏体内分布	12
II 研 究 成 績	12
1 供試ウイルスの分離および同定	12
2 供試ウイルスの病原性	15
a) 鶏に対する病原性	15
b) 供試ウイルスの鶏体内分布	19
c) 供試ウイルスの病原指数	23
d) 供試ウイルスの鶏胚に対する病原性	26

第三章 供試ウイルスの赤血球凝集能	29
I 研究材料および方法	29
1. 供試ウイルスの Hemagglutinin の耐熱性 (H r) および哺乳動物赤血球凝集能 (mamHA)	29
II 研究成績	29
1. 供試ウイルスの Hemagglutinin の耐熱性 (H r)	29
2. 哺乳動物赤血球凝集能 (mamHA)	31
第四章 供試ウイルスのブラックの性状およびクロン・ウイルスのブラック相	33
I 研究材料および方法	33
1. 組織培養	33
2. 供試ウイルスの CE および CK によるブラック法	33
II 研究成績	34
1. 供試ウイルスおよびクロン・ウイルスのブラック相	34
2. CE におけるクロン・ウイルスのブラック相	40
第五章 クロン・ウイルスの病原性	44
I 研究材料および方法	44
1. クロン・ウイルスの病原性試験	44
II 研究成績	44
1. クロン・ウイルスの病原性	44
a) クロン・ウイルスの ICPI	44
b) クロン・ウイルスの IVPI	46
c) クロン・ウイルスの MDT	46
2. クロン・ウイルスの鶏体内分布	48

第六章	クロン・ウイルスの赤血球凝集能	52
I	研究材料および方法	52
II	研究成績	52
1.	クロン・ウイルスの Hemagglutinin の耐熱性 (Hr)	52
2.	クロン・ウイルスの哺乳動物赤血球凝集能 (mam HA)	52
第七章	考 察	54
第八章	要 約	62
	文 献	64

第一章 緒 論

ニューカッスル病ウイルス (NDV) は抗原的には単一であるにもかかわらず、病原性の多様性が認められている。またその分布も全世界的であること、および多岐にわたる生物学的諸性状を有することが知られている。

1927年, Doyle (1927) は英国ニューカッスル地方にみられた伝播力旺盛な、かつ致死的な転帰をもたらす鶏の急性疾患から病原体を分離し、既知家禽ペスト・ウイルスと交叉免疫試験の結果、本疾病を独立した疾病としニューカッスル病 (Newcastle disease) と命名して報告した。しかしながら、本疾病はすでにインドネシアを中心に東南アジア地方において、広範囲に発生が認められており、これら遠隔の地域にみられた相接した発生については、病原ウイルスの同一由来性を示唆する説もあるが (Levine 1964) いづれにせよ病因学的に同一性状のウイルスによる事は間違いのないところである。すなわち、Doyle (1935) は Java, Philippine および英国の各々の鶏の伝染性疾患の病原因子は血清学的に区別できないと報告し、さらに Beach (1944) は America における鶏の呼吸器および神経系をおかす伝染性の疾病の病原因子が NDV であることを報告し、本疾病の分布がすでに世界的であることを示唆した。

ND の英国における病勢は極めて激しい型であり、鶏の年齢を問わず罹患せしめ、致死率は 98 ~ 100% であり (Doyle, 1927), インドネシアにおける本疾病の病勢もほぼ同様であり致死率も殆ど 100% であつたことが知られている (Levine 1964)。ND のこの型は、その存在が多くアジア地域に認められたことから、急性経過をただり致死的な転帰をもたらす急性型を、ND アジア型と云い、この際の原因ウイルスを、強毒型 (Velogenic type) と呼ぶようになった。

アメリカにおいて認められたNDは、アジア型とは異なる性状を示した、初め比較的軽度の呼吸器系、および神経性の疾患について報告があった (Stover, 1942)。次いでこれら疾病が血清学的にNDであると認められ、さらに鶏感冒 (chicken flu)、9日肺炎 (nine-day pneumonia) および肺脳炎 (Pneumoencephalitis) と云われていた疾病の殆どはNDであり、本病はすでにアメリカ本土に分布している事が証明された (Beach, 1944)。この型の病勢は比較的緩慢な経過をたどるものであつて、Doyle によつて報告された病例とは異なる型である。

アメリカにおけるNDの病勢は鶏日令により異なる。若鶏では神経性の病状をみるが、成鶏では殆どなく、また回復も早い。この型のウイルスは、熱帯または亜熱帯地域に多発する前記アジア型とは、特に成鶏に対する態度から判別しうるようであり、中間毒型 (Mesogenic type) またはアメリカ型と云われている。

一般に高度に感受性である若令鶏でも極く軽度の呼吸器系症状を示すのみで全く神経症状を欠く病原性の著しく低い症例や、さらに全く病状を示さず、血中抗体の変化から感染が察知できるような例からもウイルスが分離されている (Minard, 1949; Asplin, 1952; Hitchner, 1948)。このような病原性の極く軽い、または全く病原性を示さないNDVを弱毒型 (Leptogenic type) と呼んでいる。このようにNDVは病原性の上では極めて差があることが知られているが、これに対してワクチンに用いられるウイルス株は従来病原性の強弱にとらわれることなく無差別的に単一のウイルス株が用いられていることからNDVの抗原としての多様性はないように考えられる。(Jungherr, 1962; Thompson, 1952)

本病防遏のためのワクチンには生ウイルスワクチンと不活化ワクチンとが用いられている。不活化ワクチンはBeaudette によつて開発され、(Lancaster, 1964) 後、Gill (1959) やHaig (1962)

によつて広範囲に追求された。さらにウイルスの不活化因子としてベータプロピオラクトン (BPL) が有用であることが知られていらい (Logrippo, 1955) NDVのBPLによる不活化ワクチンが開発され広く用いられている (Piercy, 1964; Hofstad, 1963; Keeble, 1962; 五十嵐, 1964)。

また生ウイルス・ワクチンとして, B₁ 株によつて代表される本来の弱毒型ウイルスによる生ワクチン (Hitchner, 1948; Asplin, 1952) と, 本来の宿主以外の場で連続的に継代増殖を行なつて人為的にもとの強毒型から弱毒型へ変異せしめられたウイルス株 (T.C.N.D) (Bankowski, 1958, 1962) によるワクチンもある。さらに比較的病原性の低い, かつ免疫性の良好なウイルス株 (Vonroakel, 1948; Beaudette, 1949; Komorou, 1947; Clancy, 1949) による生ウイルス・ワクチンもある。このようにワクチンの製造様式には種々あるが血清型すなわちウイルスの Type による区別はない。

NDVは, その最も特徴ある Marker である病原性については鶏に対して3つの異なる性状を有しており, さらに株特異性とも云うべきいくつかの生物学的性状を有することが知られている。

インフルエンザ・ウイルスに血球を凝集する性質のあることが Hirst (1941, 1942) によつて認められていらいこの性状について, 多くのウイルスがテストされた。NDVも赤血球凝集能を有しこの現象はNDV免疫血清により特異的に抑制されることが Burnet (1942) によつて見出されてから, 赤血球凝集能はNDVの特異性状の1とされている。さらに, NDVは他種動物, 例えば多くの両棲類, 爬虫類および鳥類の赤血球をも凝集する (Clark, 1943)。また哺乳類赤血球に対する凝集能はNDウイルス株によつて異なることが知られている (Winslow, 1950)。この性状の差, 例えば牛および馬赤血球に対する凝集がNDVの Strain typing の1つとして用いられている (Poultney disease

Subcommittee, 1963)。

N D V の鶏赤血球凝集能は、株によつて熱抵抗性に差がみられる。56℃に加熱されると株によつては全く凝集能を示さなくなる例があり、また反対に長時間加熱されてもこの性状を維持している株もある。(Hanson, 1949)。この性状はその株の鶏および鶏胚に対する感染性とは必ずしも比例するものではないことが知られている。

N D V の培養細胞に示す態度については、TapacioによつてN D V の増殖が培養細胞上で証明されていらい、数多くの細胞系について追求されている(Bankowski, 1964)。すなわち本来の宿主である鶏由来の細胞のみならず、豚・牛・猿およびモルモット等の腎臓細胞に、さらに数種の動物腫瘍由来の継代細胞にも増殖することが知られている。N D V は、本質的に培養細胞に於いては、細胞融合性の巨細胞を作り、また細胞質内にエオジン好性の封入体を形成する。(Brandt, 1958; Butler, 1965; Churchill, 1965; Ch, 1961; Johnson, 1964; Wheelock, 1961; Tanaka, 1959; Rodriguez, 1964; Prince, 1957)。しかし、N D V 各株の各種培養細胞に対する態度は必ずしも画一的でない。(Durand and Eisenstark, 1962; Gelenczei and Bordt, 1960)。

動物ウイルスについて、ブラック法を応用し、ウイルス定量法の精度を単一粒子に近いレベルまで引上げ、さらに基本的なassayの確立はともにDulbecco (1952, 1954)によつてなしとげられた。さらにDulbeccoはN D V の鶏胎児培養細胞(CE)におけるブラック産生の可能性についても示唆している。Bouer (1958)はN D V 5株を用いて各々のCEにおけるブラック産生能を検索し、接種5日後には各株とも4.0~5.0 mmのClear typeのブラックを産出することを報告した。さ

らにNDVのCEに示すブラック集団には形態およびサイズに多様性のあることが知られ(Granoff, 1959; Thiry, 1963), NDVのある種の株の病原性はCEにつくるブラック・サイズに関係のあることが知られている(Baron, 1964)。

あるNDV株がCE上に示したブラック集団から、主としてサイズによる選択およびクローニングを行なつて得られたクローン・ウイルスについても、前記のような病原性を含めた諸性状を検索して、遺伝的かつ潜在的にその集団が保有している生物学的性状にも株固有性の存在することが明らかにされている(Granoff, 1964)。

著者は、1967年を中心として最近3ケ年に亘つて局地的に流行した例や、連続的に頻発流行した例から分離した9株のNDVについて、病原性を含めた生物学的諸性状を追求した。すなわち各分離株の鶏および鶏胚に示した病原性から、中間毒型ウイルス1株、強毒型ウイルス8株に分けられ、8株の強毒型(同程度の病原性を示した流行ウイルス)の中にも、他の生物学的性状検索の結果多様性が存在することが認められた。更に各分離株から得たクローン・ウイルスについて、各々の生物学的諸性状を検索の結果流行ウイルス株を構成するウイルス集団の中にNDVに特有な株の多様性が認められ、野外の流行を解折し、また弱毒株を得ることについても極めて興味ある知見が得られたので、ここにその大要を取纏めて報告する次第である。

第二章 供試ウイルスの病原性

I 研究材料および方法

1. 供試ウイルス

1) 分離ウイルス

1965年より1968年に亘り野外発生例より分離されたウイルス株で分離順に、分離1株より9株 (Isolate (1)~(9) = I(1)~(9) と略称) とした。(Table 1)

分離株はいづれも関東地方における発生例からで、ウイルス分離には罹病鶏の中で強度に元気消衰した発生初期から頻死期までのものが無作為的に用いられたが、斃死鶏は含まれていない。罹病鶏の肺臓、肝臓、および脾臓の10倍乳剤を9日孵化鶏卵の漿尿腔内へ接種する事によつてウイルス分離を行なつた。

接種培養48時間以降に死んだ鶏胚の漿尿液を採取して、鶏赤血球凝集反応 (Hemagglutination = HA) (+), 無菌試験(-)のものを次代への継代材料とした。このようにして3代継代して得た漿尿液を供試ウイルスとして-20°Cに保管した。

2) 対照ウイルス

a) 佐藤株

NDV強毒株。強毒対照ウイルスとして用いた。本株は定期的に鶏へ復元が行なわれており供試株は鶏3代通過後9日孵化鶏卵を3代通過したウイルスである。

b) B₁ 株

供試B₁株は、農林省家畜衛生試験場よりNDV生ウイルス・ワ

クチン株として分与され、鶏胚で維持されている株である。

c) 石井株

本株は病原性および鶏胚に対する致死性は極めて低いが、鶏胚での増殖性は著明である（清水ら，1966）。本株は鶏胚で維持されている。

d) T.C.N.D株

培養細胞通過によつて本来の強毒な病原性を著しく減弱せしめられた株である（Bankowski 1957, 1958）。供試ウイルスは、ワクチン・ウイルスとしてHela細胞に維持されてきたウイルスである。

2. 鶏および孵化鶏卵

白色レグホーン系の健康な鶏を用いた。供試ウイルスの病原性試験および体内分布の検索に用いた供試鶏の日令は2日令から、30週令にわたるが全て同一農場から供給されている。同鶏群については血清学的にNDおよび慢性呼吸器病（Chronic respiratory disease）についての既往症のないことが確かめられている。また、NDに対する予防接種も行なわれておらず、したがつて当農場で生れたひなの移行抗体の保有率はごく低いものである。

細胞培養のための腎臓は、ほゞ2ヶ月令の若鶏より採取され、また感染価測定および鶏胎児細胞培養のための孵化鶏卵も同一農場から供給された。

3. 抗NDV - 免疫血清および蛍光色素標識血清

免疫は既知株として佐藤株およびB₁株、分離株からI₍₁₎₍₂₎₍₆₎および

(7)株を各々用いて行なつた。免疫動物は家兎および鶏を用い抗原は各株の感染漿尿液を低速遠心した上清に、Freund の complete adjuvant を加えて作成し、また鶏への抗原は感染漿尿液を Betapropiolactone で不活化し、これに燐酸アルミ、ゲルを adjuvant として同量加えて作成した(五十嵐, 1964)。家兎への免疫は抗原 1.0 ml 宛を筋肉内へ1週間2回接種し、これを7週間連続し、最終免疫から2週間後、採血して得た血清を免疫血清とした。鶏への免疫は家兎と同様、筋肉内接種によつて行なつたが、補強免疫は2週間間隔で2度行なつたのみである。免疫血清は最終免疫後2週間で得られた。これら免疫血清による交叉中和試験をOKにおけるブラック法によつて行ない分離ウイルスの同定を行なつた。さらに I₍₃₎₍₄₎₍₅₎₍₈₎ および (9) についても免疫血清を作成し追加して同定を行なつた。

この免疫血清に、Fluorescein isothiocyanate を conjugate することによつて螢光抗体液を作成して鶏体内分布ウイルスの検出の一助に用いた。Conjugate serum の作成は川村(1966)の方法に準じて; また切片標本の作成は Sainte - Marie (1962)の方法によつて作成した。

4. 供試ウイルスの病原性試験

供試ウイルスの鶏に対する病原性は、4, 13, および30週令鶏へ10倍に希釈したウイルスを筋肉内接種(IM)および片側鼻腔内滴下(IN)による接種を行ない、10日間観察して病原性を比較した。

鶏および鶏胚に対する病原性の正確な指数算定には、Poultry Disease Subcommittee (1963)の方法によつて行なつた。すなわち、8週、および30週令の鶏の静脈内(IV)に、供試ウイルスを各々10倍に希釈して、その0.1mlを接種し、後11日間観察して、Intravenous Pathogenicity Index (IVPI)を算出し、また

I V P Iと同様に、10倍にうすめた供試ウイルスを2日令ひなの脳内（I C）に0.025 ml 接種し、後8日間観察して、Intracerebral Pathogenicity Index（I C P I）を算出した。

孵化鶏卵では供試ウイルスを 10^{-9} 位まで希釈し、その 10^{-1} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} および 10^{-9} の希釈位を各々0.1 ml あて9日孵化鶏卵の漿尿腔へ接種し、Minimum Lethal Dose（M L D）によるMean Death Time（M D T）を算出した。

5. 供試ウイルスの鶏体内分布

供試ウイルスを略 $10^{4\sim5}$ MLD/chicken になるように8週令および30週令鶏の片側鼻腔内へ滴下して感染せしめた。強毒供試ウイルスでは、接種された鶏が死に致るまで、また比較的病原性の劣るウイルスの例では、H I抗体の上昇がみられるまで、各々経日的に感染鶏を2羽づつ無作為に取り出して殺処分し、その諸臓器を採取した。感染ウイルスの検出は、採取臓器の10倍乳剤を9日孵化鶏卵へ接種して行なつた。

強毒ウイルスの例では接種後48時間以降に死んだ卵により判定し、また弱毒ウイルスの例では接種5日後、接種卵の漿尿液を採取し、鶏赤血球凝集試験（H A）を行なつて判定し供試ウイルスの鶏体内分布をその有無によつて検索した。同時に、脳、肺、腺胃、フアブリキウス嚢、肝および腎、または卵巣における感染ウイルスの定量は、C Kを用いてのブラック法を応用して行なつた。

ii 研究成績

1. 供試ウイルスの分離および同定

各分離株が得られた野外所見および分離材料を得た発症鶏の所見はTable 1 に示した。

Table 1 Origins of The isolates of N D V during
The epizootic from 1965 to 1968

No of Isolates	Virulence	Date of Isolation	Major Clinical Signs of Affected birds
Isolate (1)	Mesogenic	Jun'65	Two-month-old chickens (layer) in rhythmic twitching. Adult in mild rales and abnormal egg-production followed by rapid recovery.
Isolate (2)	Velogenic	November'66	Four-week-old chickens (broiler) in marked depression followed by acute death.
Isolate (3)	"	January'67	Twelve-month-old chickens (layer) in lethargy.
Isolate (4)	"	January'67	Three-month-old chickens (layer) in prostration (moribund)
Isolate (5)	"	March'67	" "
Isolate (6)	"	June'67	Quails in rhythmic twitching. The course in a bevy of the quails proved to be longer than in the chickens, but they mostly died.
Isolate (7)	"	June'67	Three-month-old chickens (Layer) in paralysis.
Isolate (8)	"	"	
Isolate (9)	"	March'68	Chickens (Layer) in marked depression, near by the area where "Isolate 5" had been isolated.

I₍₁₎株が得られた症例は、比較的軽度な病原性のウイルスによるものと思われ、成鶏の致死はごく稀であつたが、3ヶ月令未満の雛の所見は強度であつて顕著な神経症状を示して致死率も高いのが特徴であつた。同一農場における他の鶏について、無作為に Sampling して、血中の HI 抗体を測定した。その結果は多くの成鶏はすでに、ND に感染耐過していることを推定しうる抗体価を示した。

I₍₆₎株をのぞく他株の症例は、鶏日令による抵抗性に差はなく、殆ど100%が3~5日以内で致死する強烈なウイルスによるものと思われた。

I₍₆₎株はウズラにおける野外例から分離された。ウズラの個々の症状は鶏にみられた多くの強毒感染例と類似であつたが、経過はやゝ長く致死には7~8日を要した。

神経症状は必発で、発症3~5日に出現し、頭部震戦、起立不能のまま死に致る例が多くみられた。

感染鶏の臓器を分離材料としたが、どの株も分離過程における鶏卵に対する致死性の高いことが認められ、I₍₁₎株の場合でも接種後4日には全ての接種卵を致死せしめた。

これら致死卵より得た漿尿液は鶏赤血球を凝集したが、既知免疫血清によつてこの凝集能は著明に抑制された。

これら分離ウイルスは、またCKおよびCE細胞に、ブラックを産生するが、対照ウイルスの佐藤株およびB₁株で免疫された家兎および鶏血清によつて、両細胞へのブラック産生能は著明に抑制された。

すなわち、既知株に対する免疫血清の各々の中和価はいづれも、対数值3に近いものであり、この数値は今回分離されたI₍₁₎~I₍₉₎の各株に対する中和値とほぼ一致する。

同時に分離ウイルスによる免疫血清は、佐藤株および B₁ 株（中和試験は C K のみ）に対し同じ様な作用を示した。

これら各例の中和値には有意差は認められなく、かくて得られた交叉中和反応の結果から分離ウイルスは N D V である事が証明された（Table 2）。

なお、佐藤株ならびに佐藤株に対する抗血清と、I₍₂₎~(5) , I₍₈₎および I₍₉₎株、さらにこれら諸株に対する抗血清による中味試験は、佐藤株および I₍₂₎株および各々の抗血清に対して行なつたものであつて、I₍₃₎~(5), I₍₈₎および I₍₉₎の諸株間の交叉中和試験は行なつていない。

2. 供試ウイルスの病原性

a) 鶏に対する病原性

分離ウイルスの鶏に対する病原性試験の結果は、野外での各々の病勢を反映した成績であつた。（Table 3）

4 . 1 3 , および 3 0 週令の感受性鶏へ、分離各株を、ルートを異にして接種した試験では強毒対照ウイルスの佐藤株が鶏日令および接種ルートに関りなく、接種後 6 日で全てを致死せしめ、分離各ウイルスも I₍₁₎株をのぞき、ほぼ同様な病原性を有する結果を示した。

I₍₁₎株は他株と異なつた病原性を示し、鶏日令および接種ルートによつて病原性の差が著明にみとめられたことが注目された。すなわち 4 週令若ひなに対しては、I M 接種でも、I N 接種でも結果は全て 6 ~ 7 日後に致死せしめる作用を示したが、1 3 週令および 3 0 週令鶏に対しては、鶏日令および接種ルートにより病原性の差のあることを示した。1 3 週令、I N 接種群に対しては 8 日後までに全てに致死性

Table 2. Cross-neutralization Test With the Isolates, Sato and B₁ Strains of NDV and the Respective Anti-serum.

1)		Neutralization Index (log)				
Serum	Virus					
	Sato	I(1)	I(2)	I(6)	I(7)	B ₁
Sato	3.14	2.93	3.03	2.95	3.03	3.00
I(1)	3.19	2.98	3.19	3.17	3.17	3.02
I(2)	2.97	3.02	3.02	2.98	3.08	2.97
I(6)	3.07	3.07	3.05	3.03	3.06	3.05
I(7)	3.04	3.05	3.00	3.07	3.00	3.02
B ₁	2.96	2.98	2.91	2.98	3.07	2.96

2)						
	Sato	I(3)	I(4)	I(6)	I(8)	I(9)
Sato	2.93	2.91	2.87	2.84	3.16	2.80
I(3)	3.45	3.49	NT	NT	NT	NT
I(4)	3.10	NT	3.07	NT	NT	NT
I(5)	3.17	NT	NT	3.00	NT	NT
I(8)	3.16	NT	NT	NT	3.06	NT
I(9)	2.16	NT	NT	NT	NT	2.22
I(2)		3.02	3.15	2.91	2.97	2.90

NT: -not - tested

Table - 3. Pathogenicity of the Isolates and Strain Sato of N D V for Suseeptible chickens

Virus	I (1)			I (2)			I (3)			I (4)			I (5)			I (6)			I (7)			I (8)			I (9)			Sato																	
Age of Chickens ^{*(1)}	30	13	4	30	13	4	30	13	4	30	13	4	30	13	4	30	13	4	30	13	4	30	13	4	30	13	4	30	13	4	30	13	4	30	13	4									
Route of inoculation ^{*(2)}	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN	IM	IN											
^{*(3)} 1																																													
2																																													
3																																													
4					1		2	1	1											1				1	1			2			1	^{*(5)} 2	2	2											
5			1	1	2	2	2	1	3	1	2	1		1	1	1	2			1	1	1	1	2	3		1	2	2	1	2	1	3	4	3	4	3	1							
6	^{*(4)} 3	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	3	4	1	2	1	3	2	1	2	3	3	4	3	2	1	1	1	1	2	2	1	3	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1
7		1		3	1	1				1	2	2	1	3	2	2	1	1	2	1	1	1	2	3	1	2	1	1		1	1	1	2	1											
8		1	2	2														2		1							1	3																	
9																																													
10	(1)	(2)	(3)																																										
Remarks	(1) All survived with on-signs (2) 1/4 survived with signs (3) 2/4 survived with signs																																												

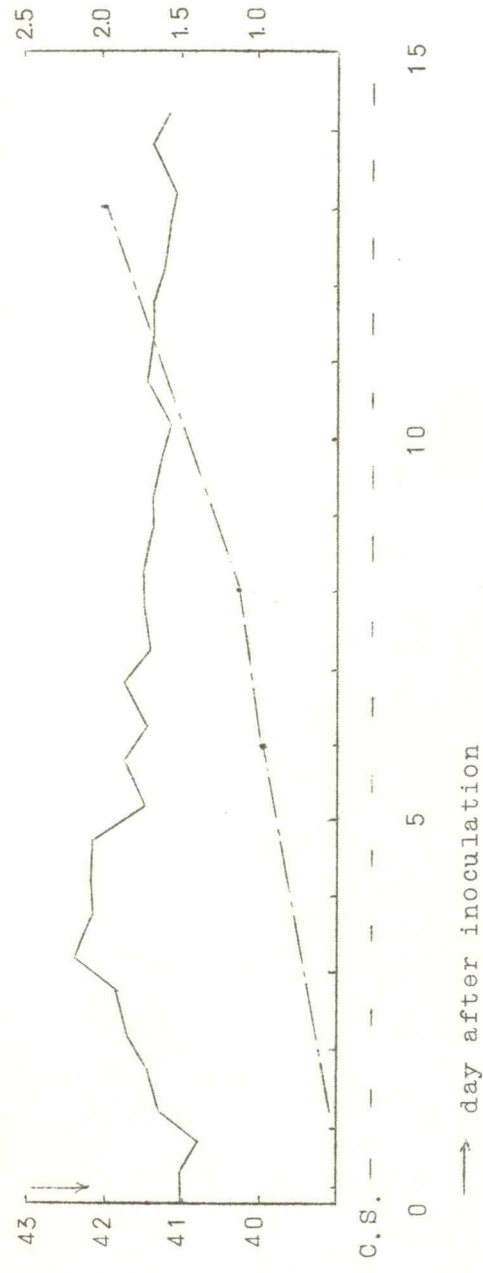
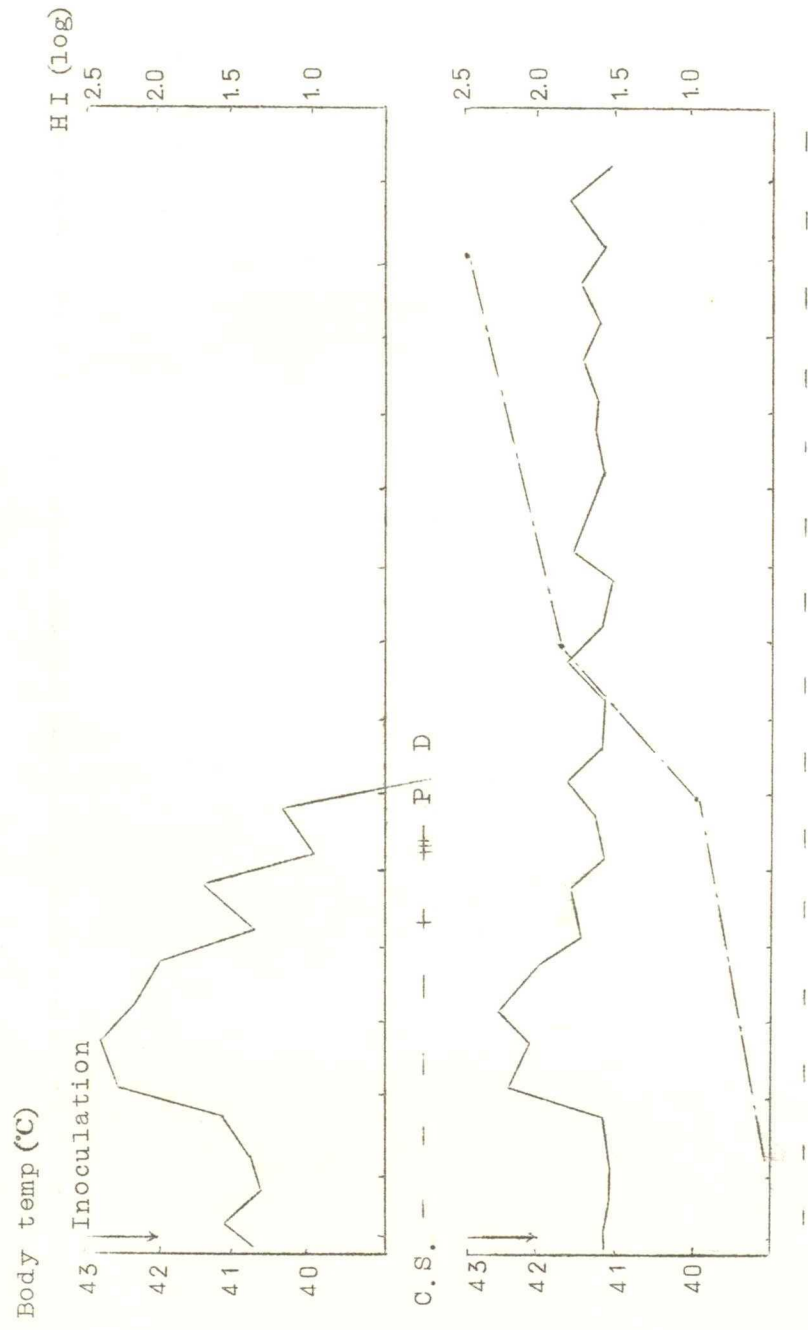
* (1) = week old

* (2) = IM: - Intramuscularly, IN: - Intranasal instillation

* (3) = Observation date

* (4) = Number of dead chickens on the day (4 chicken used)

* (5) = Only 3 chickens were used



Inocul:- Intranasal Instillation

C.S:- Clinical sign, -:-normal, +---+++ :-degree of signs

P:- Paralysis D:-death

Figure-1 Clinical Signs including Body Temperature, and HI-Antibody Response of the Chickens Inoculated with I(1)-strain of NDV

を示したが、I M 接種群には中等度の神経性の症状をふくめた発症を示しつつも、10日の観察期間内には致死性を示さなかつた。この傾向は30週令鶏群に対してはさらに顕著であつた。I M 接種群は殆ど病原性を示すことはなくこの群は見かけ上全く無症状に観察期間を耐過している。この群について毎日1回の検温の結果、接種後3~5日の間に viremia を推定させるような一過性の発熱が認められ同時に血中抗体は接種後6日から、その発現がH1試験によつて探知され、2週後には高度に抗体が産生されていることがみとめられた。(Figure - 1)

30週令鶏へのI N接種の影響は13週令鶏、I N接種群の示した所見とほぼ等しいものであつて、1羽のみが発症しつつ観察期間を経過した。

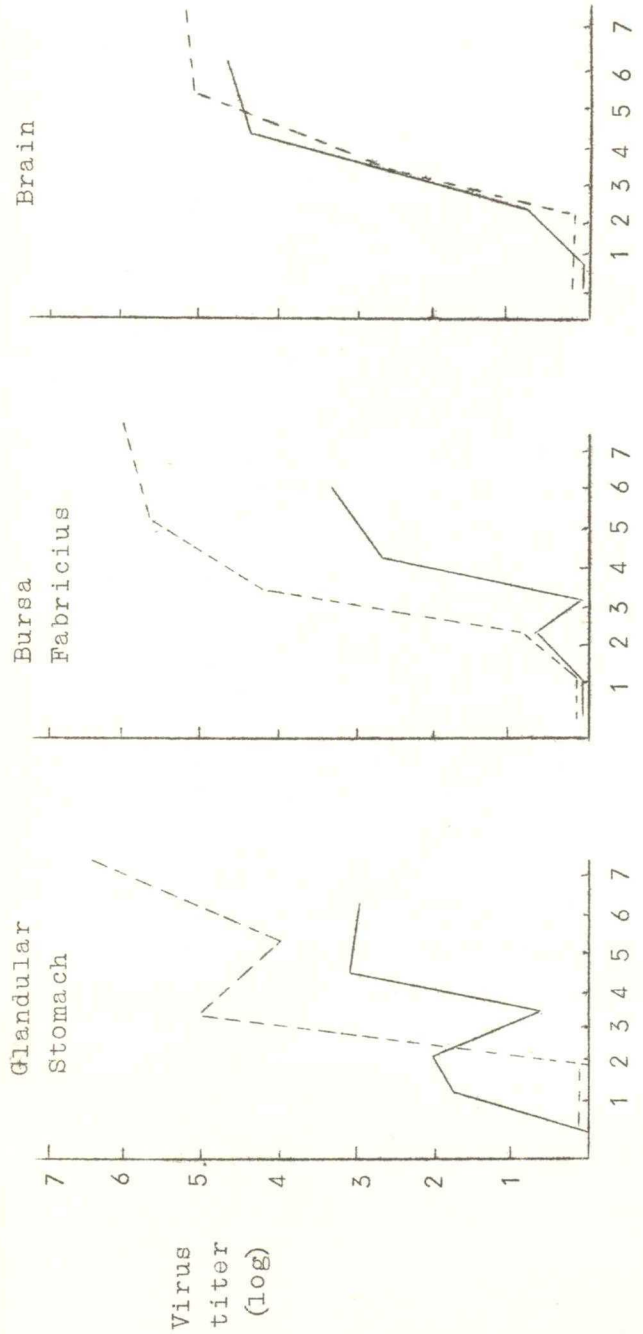
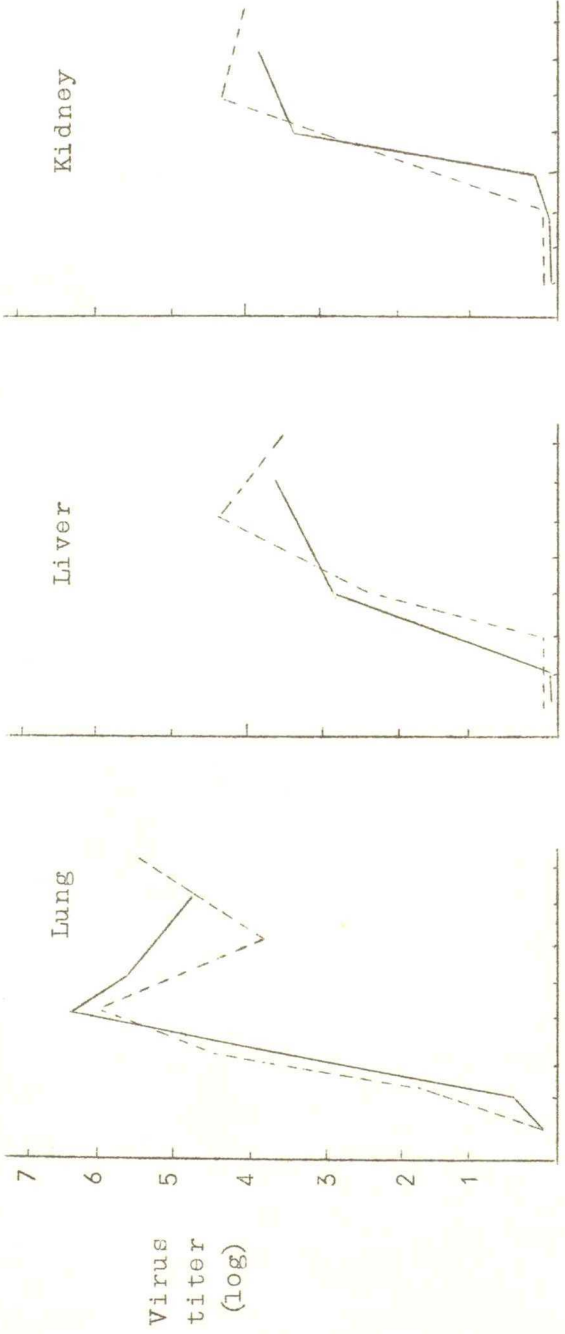
b) 供試ウイルスの鶏体内分布

供試ウイルスはおゝむね、接種後は鶏の体内全域に亘つて分布することが見出された。比較的病原性の弱いI (1)株においても同様な分布相がみられた。接種ウイルスが体内分散の後到達部位における2次的なウイルスの増殖があつて症状の発現がみられるようであつた。

I (2)~(9)株においては、接種後48時間で呼吸器系、消化器系、肝、脾、膵、および腎または生殖器等殆ど全ての器官にウイルスの到達がみとめられ、24時間位おくれる例もあつたが、脳内への到達も全ての株についてみとめられた。これら強毒ウイルスの接種をうけた鶏の症状発現は多く3日後にみられ発症後、1~2日で死亡する。また、I (2)~(9)株の分布は、鶏日令に左右されることなく、また鶏に示す転帰も同様であつた。

I (1)株は8週令鶏では、発症および経過、さらにウイルスの組織到達能も他の強毒ウイルスと異ならなかつた。30週令鶏に対しても2

--- 8-week-old
 — 30-week-old



→ day after inoculation

Figure-2. Titer of Isolate (1) Strain of N D V in Tissues of Infected Chickens

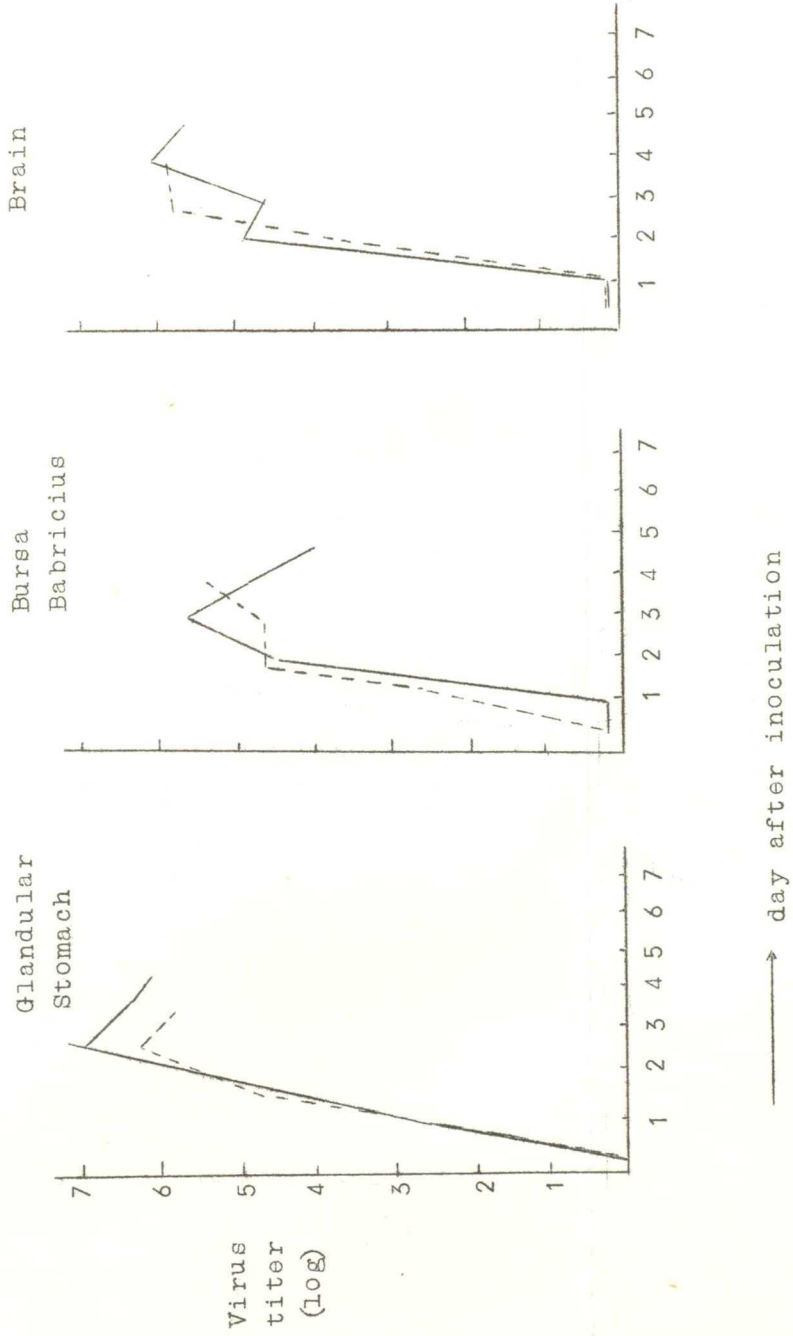
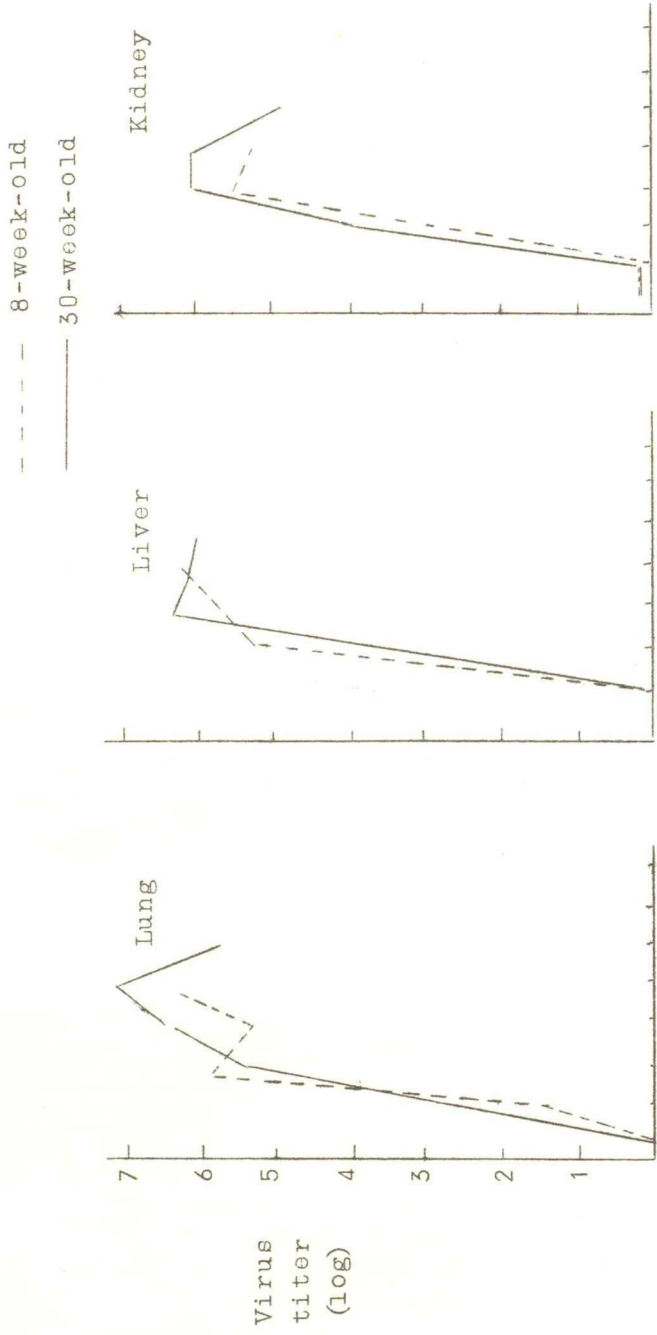


Figure-3. Titer of Isolate (2) Strain of N D V in Tissues of Infected Chickens

— 30-week-old
 - - - 8-week-old

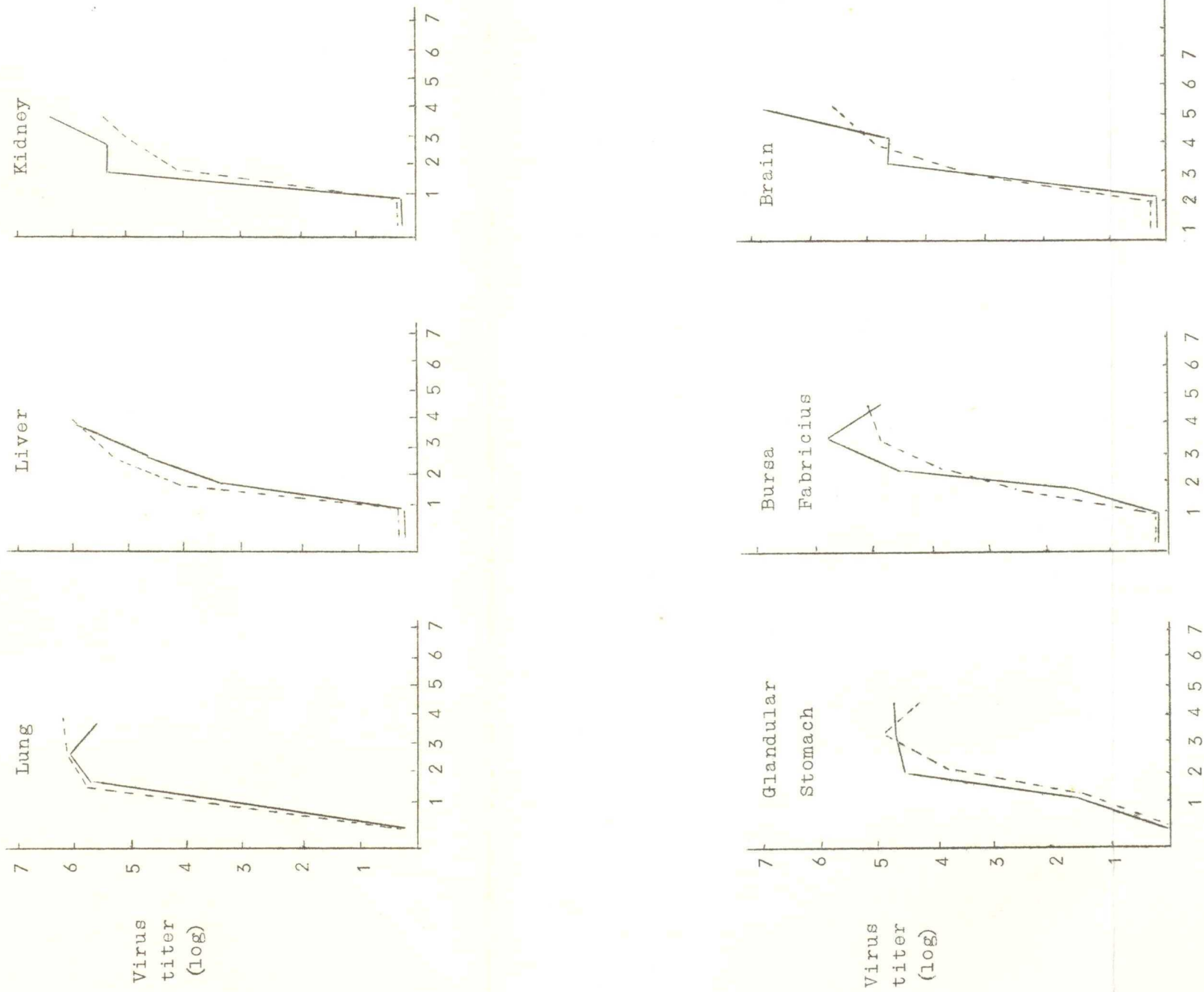


Figure-4. Titer of the Strain Sato of N D V in Tissues of Infected Chickens

日後には各諸臓器からウイルスの回収が可能であった。

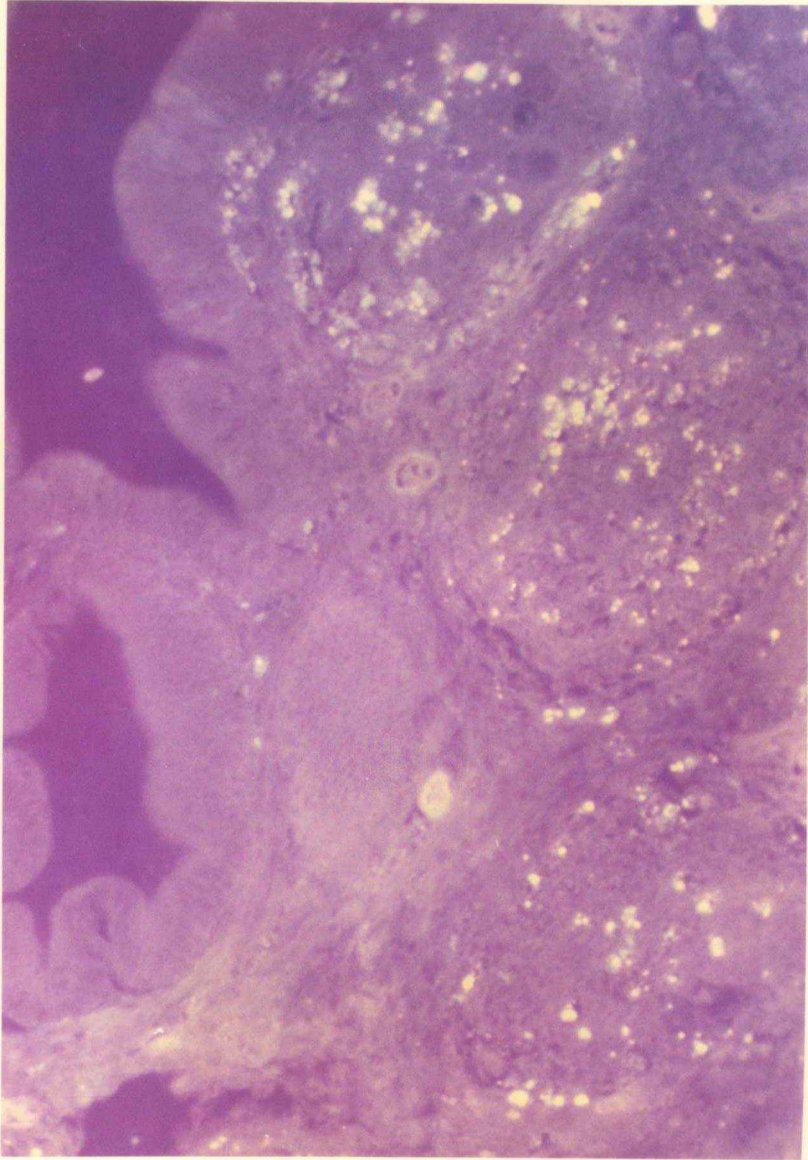
供試各株のなかから、I₍₁₎、(2)および対照ウイルスとして佐藤株をえらび、8週令および30週令鶏の脳、肺、肝、腎、腺胃およびフアブリキウス嚢への各々の到達およびその量的な消長を測定した。

(Figure. 2. 3. 4) (Photograph 1-1, 2) これら各株による病日は4~7日であり、その間、各器官にみられたウイルス量は組織1gあたり最高 10^7 PFUに達した。I₍₂₎株の場合臓器への到達は30週令鶏において肺および腺胃では24時間でフアブリキウス嚢、腎、肝および脳へは48時間以内に到達し、検出されたウイルスの量は組織1gあたり $10^4 \sim 5$ MLDと高濃度であった。このことから、48時間目の測定時には、組織到達後すでに2次的なウイルスの増殖が行なわれていることが推定された。72時間の検索では、多くの組織におけるウイルスの量は極限に達し宿主の臨床所見は、著明な元気低下、食欲廃絶を主徴とする時期にあたる。以後のウイルス量はほぼ一定であるが、宿主は時には筋麻痺、嗜眠等を発現して斃死するに至った。佐藤株の体内での動態もほぼ同様な知見が得られた。

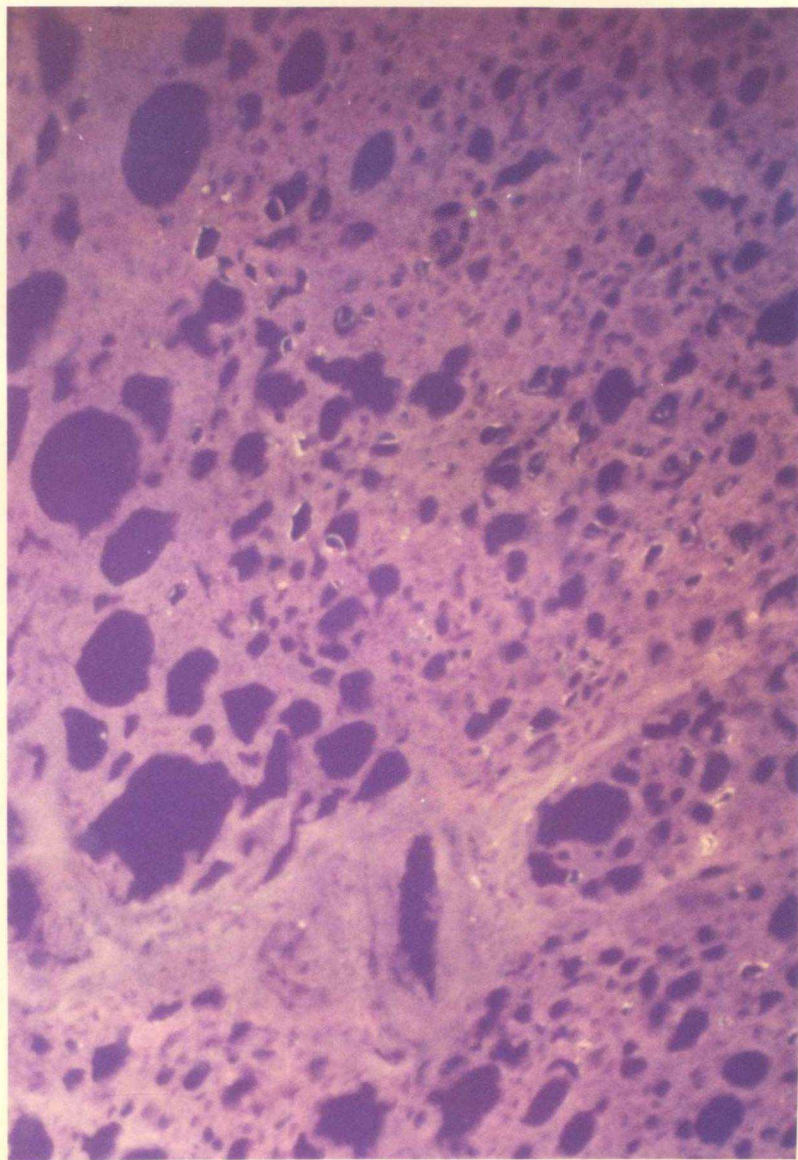
I₍₁₎株ではほぼI₍₂₎株におけるウイルスの拡散と同様であるが、肺をのぞく他臓器への到達および増殖がやゝおくれるようであり、これに関連して臨床所見も同様におくれてみられた。I₍₁₎株においては、接種後6日以後の検索は行なわなかつたが、この時点はFigure-1にみられる様に抗体発現の時期に一致し耐過する例では急速に分布ウイルスは消退していくものと考えられる。

c) 供試ウイルスの病原指数

8週令および30週令鶏に供試ウイルスを、IVへ接種する事によつて得られたIVPIさらに2日令ひなの脳内接種によつて得られたICPIは、I₍₁₎株とその他の株ではそれぞれの病原指数から Strain



Photograph 1-1. Multiplicaton of Isolate (2) strain of Newcastle Disease Virus. Stained with fluorescein-labeled Newcastle disease virus antibody: Bursa Fabricius of infected chicken. x200



Photograph 1-2. Multiplication of Isolate (2) strain of Newcastle Disease Virus. Stained with fluorescein-labeled Newcastle disease virus antibody: Lung of infected chicken. X200

Type の異なることを示唆した (Table 4.5)。接種された鶏の転帰は病原性試験や体内分布試験にみられた成績とほぼ同様であり、 $I_{(2)\sim(9)}$ 株接種鶏群は日令をとわず接種後3~5日で全て斃死した。 $I_{(1)}$ 株では、IN接種による転帰とはやゝ異なり死は7日間を要し、全て致死する事はない。 $I_{(1)}$ 株のIVPIは30週令鶏で0.9、8週令鶏で、1.18 $I_{(2)\sim(9)}$ 株では日令を問わずに2.22~2.48で佐藤株の2.52に匹敵した。

2日令ひなの脳内接種による病原性は $I_{(1)}$ 株も含めて高いものであり、全株致死的な性状を示した。 $I_{(1)}$ 株は6日後に、 $I_{(2)\sim(9)}$ 株は3~5日後に全ひなを致死せしめている。算出されたICPIは $I_{(1)}$ 株は1.2、 $I_{(2)\sim(9)}$ 株は1.5~1.7であり佐藤株の1.6に匹敵した。

これらの各供試ウイルスについて得られた病原指数から $I_{(1)}$ 株は、中間毒型 (mesogenic または American form) と云われる型に、また $I_{(2)\sim(9)}$ 株は対照の佐藤株の価に近く強毒型 (velogenic または Asiatic form) の範疇に入るウイルスであろうと思われた。

d) 供試ウイルスの鶏胚に対する病原性

供試ウイルスの鶏胚に対する病原性はIVPIおよびICPIにそれぞれ比例した結果がみられた。全株とも鶏胚に対し致死的であり、MLDにおける各分離株のMDTは (Table 4), $I_{(1)}$ 株64時間、 $I_{(2)\sim(9)}$ 株は55~62時間であつた。このように各株について得られたMDTから $I_{(1)}$ 株はmesogenic typeに、他の株は対照ウイルス佐藤株と同様にVelogenic typeに入れるべきである。

Table - 4 Intravenous Pathogenicity Index (IVPI) for Susceptible Chickens and Mean Death Time (MDT) of the Minimum Lethal Dose (MLD) for 10-day Chicken Embryos of the Isolate and Known Strain of NDV

Virus	Chicken IVPI			Embryo MDT	
	8-wk-old	13-wk-old	30-wk-old	MLD	MDT
I (1)	1.18	. 2.09	0.90	6.0	64
I (2)	2.45	. 2.34	2.40	7.0	56
I (3)	2.20	. N . T	2.30	7.0	56
I (4)	2.40	. N . T	2.30	7.0	54
I (5)	2.48	. N . T	2.10	7.0	63
I (6)	2.22	. N . T	2.30	7.0	60
I (7)	2.24	. 2.29	2.10	7.0	50
I (8)	2.40	. N . T	2.30	7.0	54
I (9)	2.36	. N . T	2.30	7.7	58
Sato	2.52	. 2.54	2.14	7.0	49
B ₁	N . T	. N . T	N . T	<1.0	0

Table - 5 Intracerebral Pathogenicity Index (I C P I)
 for 2-day-old chicken of the Isolates, Cloned
 Virus from the Isolates and Sato Strain, and B₁
 and T.C.N.D Strain of NDV

Virus	I C P I
B ₁	0 (0.025)
T.C.N.D	0.4
I (1) O	1.2
S	0.2
L	0.5
I (2) O	1.6
S	1.7
L	1.7
I (3) O	1.6
S	1.6
L	1.6
I (4) O	1.6
S	1.7
L	1.6
I (5) O	1.6
S	1.6
L	1.5
I (6) O	1.7
S	1.2
L	1.5
I (7) O	1.5
S	1.3
L	1.6
I (8) O	1.7
S	1.6
L	1.1
I (9) O	1.7
S	1.7
L	1.7
Sato O	1.6
S	1.4
L	1.7

第三章 供試ウイルスの赤血球凝集能

I 研究材料および方法

1. 供試ウイルスの Hemagglutinin の耐熱性 (Hr) および哺乳動物赤血球凝集能 (mam HA)

供試ウイルスを、1,000回転、5分間遠心し、その上清をとって56°Cに加熱し、一定時間毎(5・15・30および60分)にsamplingして、鶏赤血球に対する各供試ウイルスのHA活性の耐熱性を測定した。

mamHA活性の試験には、供試赤血球として、馬、牛、山羊、および緬羊から採取して用いた。ウイルスの遠心上清を1:10および1:20に希釈して、各供試ウイルスのHA活性をみた。

赤血球凝集反応の術式は通常行なわれている方法である。

II 研究成績

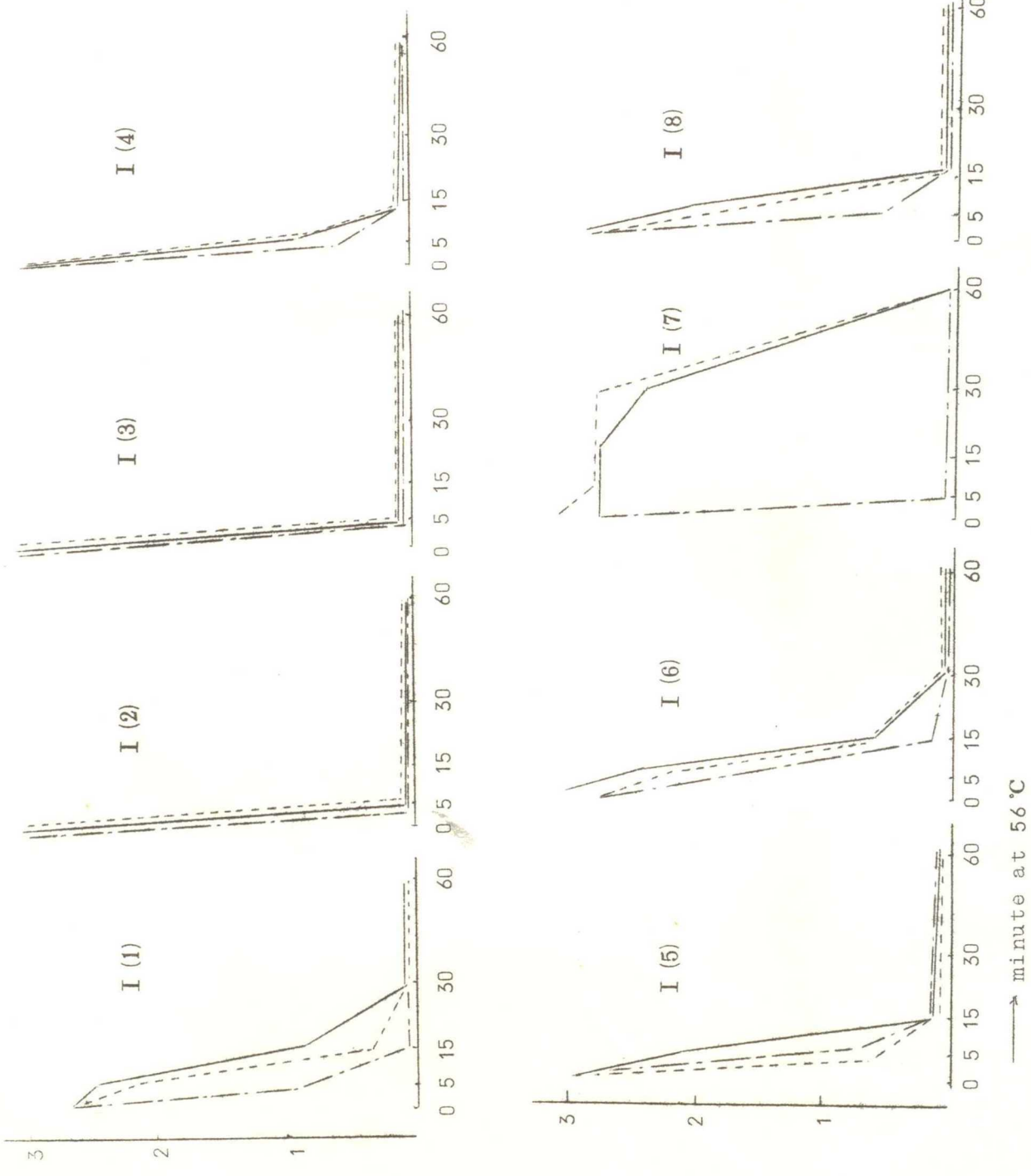
1. 供試ウイルスの Hemagglutinin の耐熱性 (Hr)

本実験には、対照ウイルスとして強毒佐藤株および弱毒に石井株、とB₁株を用いた。

各ウイルス株のHr性は各株の鶏および鶏胚に示した病原性とは関連性のない様相がみられた。(Figure - 5)

中間株ウイルスの病原性を示したI₍₁₎株と強毒タイプ・ウイルスI₍₂₎株とでは、I₍₁₎株の方にやゝ熱抵抗性がみられ、I₍₂₎株は56°C15分でHA活性は消失するが、I₍₁₎株のHr性は15分では、尚わづかではあるが活性を示した。しかし乍ら、I₍₇₎株をのぞく、I₍₃₎~(9)株は傾向としてはI₍₂₎株と同様に、加熱5分で全くHA活性が消失し、強毒対照ウイルス佐藤株に類する性状であつた。加熱30分をこえてHA活性を

(log) HA



30

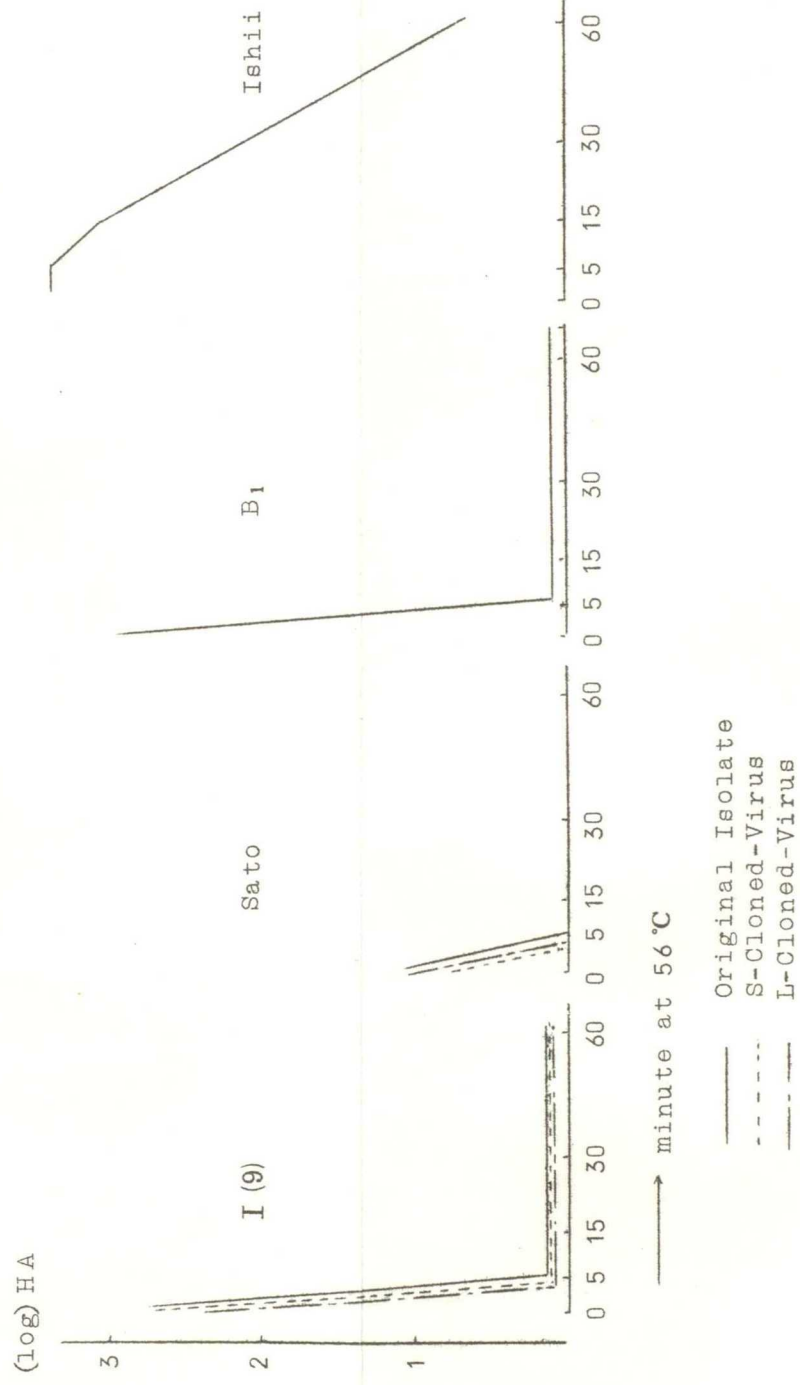


Figure-5. Heat Stability of the Isolates, Cloned virus from the Isolates and Sato, Ishii and B₁ strain of NDV

保持しているウイルス株は I₍₇₎ 株および石井株の 2 株であつた。I₍₇₎ 株は加温 60 分をこえて HA 活性を維持することはないが、石井株の HA 活性は加温 60 分で尚活性の保持がみとめられ、石井株の HA 活性の強固なことが示された。一方、弱毒ウイルス B₁ 株の HA 活性は、石井株とは全く相反して弱く、加温 5 分後には殆ど消失し、15 分後には HA 活性は全く消失した。

2. 哺乳動物赤血球凝集能 (mamHA)

馬、牛、山羊および緬羊の赤血球に対する供試ウイルスの凝集能 (mamHA 性) は Hr 性と類似する相を示した。(Table 6) すなわち I₍₇₎ 株と弱毒対照ウイルス石井株に巾広い凝集能の保持がみられた。I₍₇₎ 株では全供試動物赤血球を、また石井株では牛をのぞく他動物赤血球を凝集する能力を有することがみとめられた。反面、I₍₁₎ 株を含めた他株、さらに佐藤株および B₁ 株は供試哺乳動物赤血球に全く凝集能を示さなかつた。

mamHA と Hr との両性状は病原性とは全く併行しない独立した性状で NDV の株特異性とみなされるものと思われた。

Table-6 Homagglutination of Isolates and Known Strains of
 N D V for Mammalian Erythrocytes

Virus	Mammalian erythrocytes			
	Horse	Cow	Goat	Sheep
I (1)	-	-	-	-
I (2)	-	-	-	-
I (3)	-	-	-	-
I (4)	-	-	-	-
I (5)	-	-	-	-
I (6)	-	-	-	-
I (7)	+	+	+	+
I (8)	-	-	-	-
I (9)	-	-	-	-
Sato	-	-	-	-
B ₁	-	-	-	-
Ishii	+	-	+	+

第四章 供試ウイルスのプラックの性状 およびクロン・ウイルスのプラック相

I 研究材料および方法

1. 組織培養

使用した培養細胞は、2ヶ月令の鶏腎臓（CK）および9日令孵化鶏卵胎児（CE）の初代培養細胞である。培養方法は川村（1961）の鶏腎臓の培養法に準じた。すなわち細切したCKを0.25% trypsin earle液の消化により室温で細胞を個々に分離し採取した。培養液は10%馬血清（56℃ 30分 非働化）、0.5% lactalbumin hydrolysate、0.1% yeast extract および抗生物質（penicillin 100 units/ml, streptomycin および spiramycin 各々100¹/ml）を加えたearle液（LYE）を用いた。

分離した細胞を、0.5%になる様にLYEに浮遊し、petri-dish（直径60mm）に5mlずつ分注して、38℃高湿のincubatorにて培養した。CEの培養方法も全くCKと同様で分離した細胞を約10⁶/mlの浮遊液として培養し通常24時間後に単層が形成される。

2. 供試ウイルスのCE、およびCKによるプラック法

供試ウイルスが、CEおよびCKにつくるプラックについては、主として産生されたプラック集団に認められたsize variationに注目した。

プラック法は通常行なわれている方法を用いた。すなわち、ウイルス接種後、cell plateを37℃に30～45分おいて、接種ウイルスの細胞への吸着を促し、未吸着ウイルスの除去はphosphate buffer（P.H 7.2）で2回cell plateを洗うことによつて行ない、これに0.8%寒天（Bacto agar, Difco）を加えた5%馬血清加LYEをoverlayした。37℃に3日間incubateした後、血清を加えない寒天加ELYに1:

10000になる様に neutral red を加えて、second overlay を行ない、さらに1日 incubate してからブラックの観察を行なった。この様にしてCE細胞上にみられた各供試ウイルスによるブラックには広い size variation がみられた。

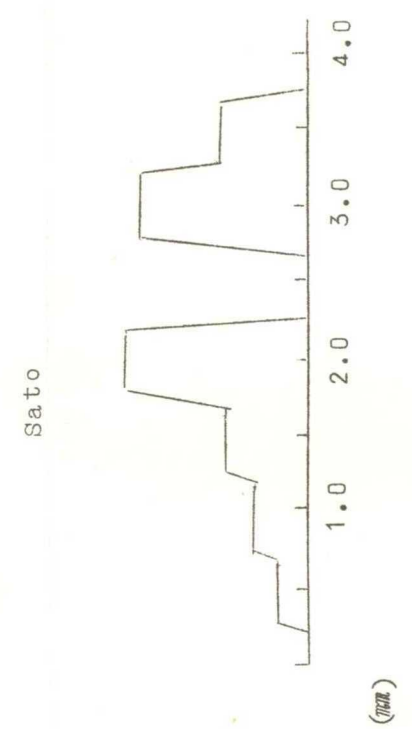
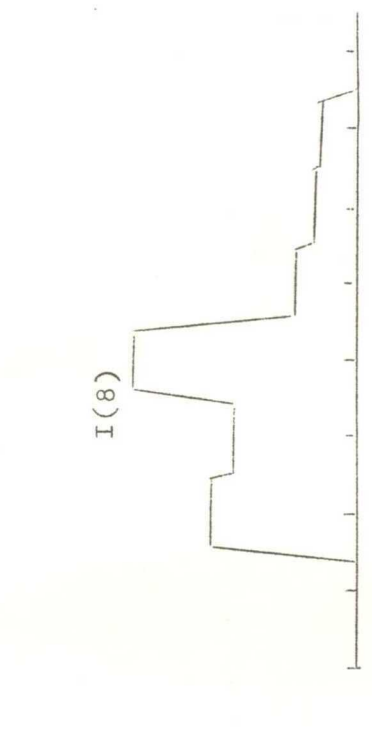
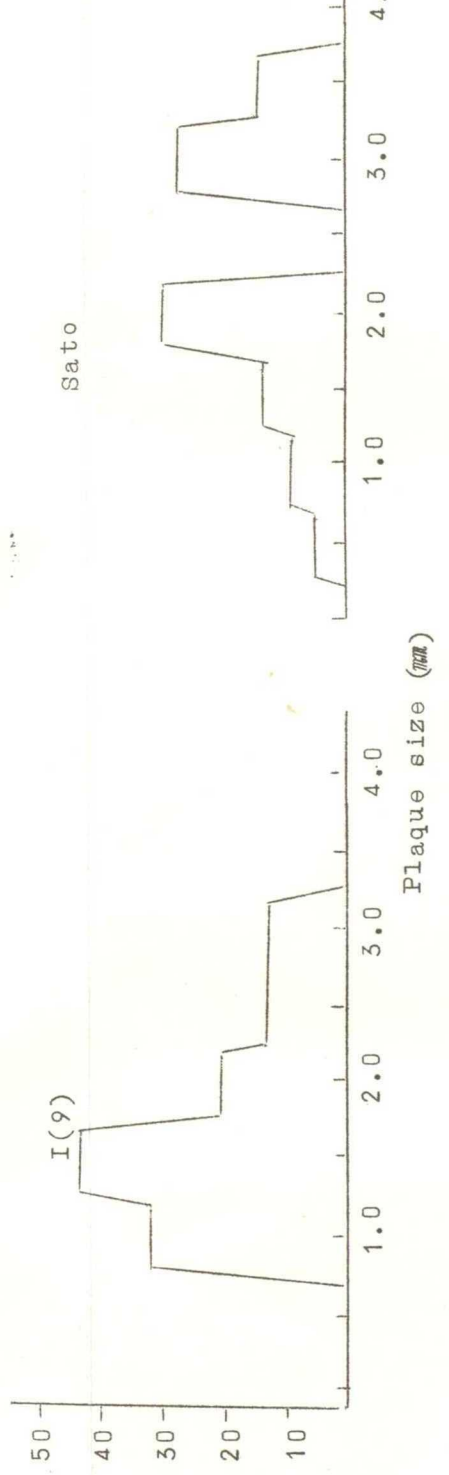
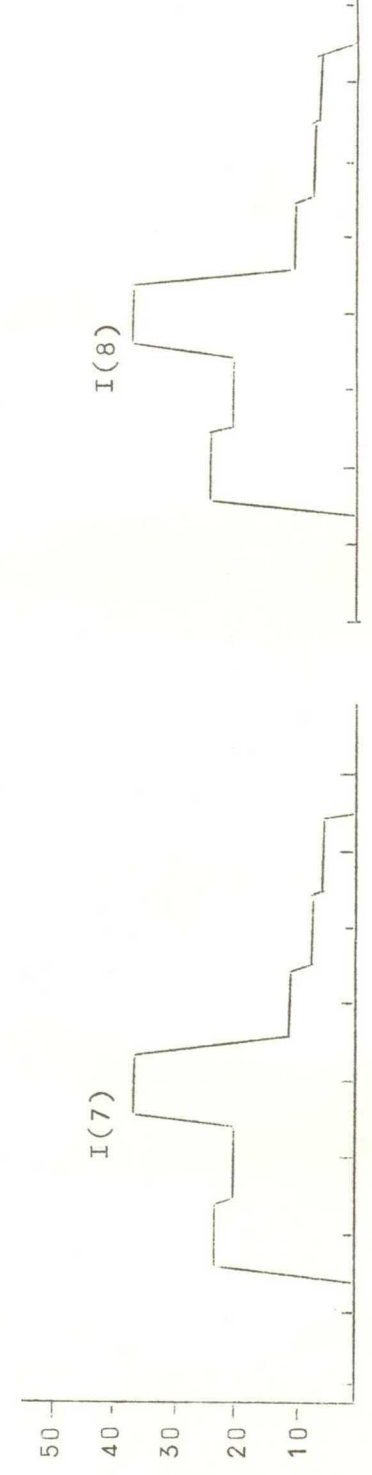
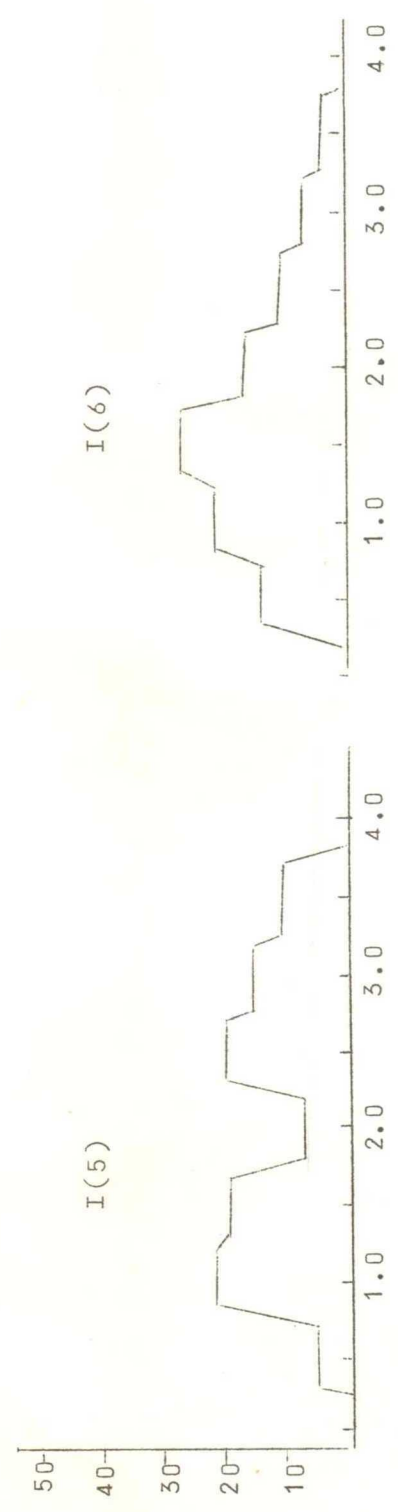
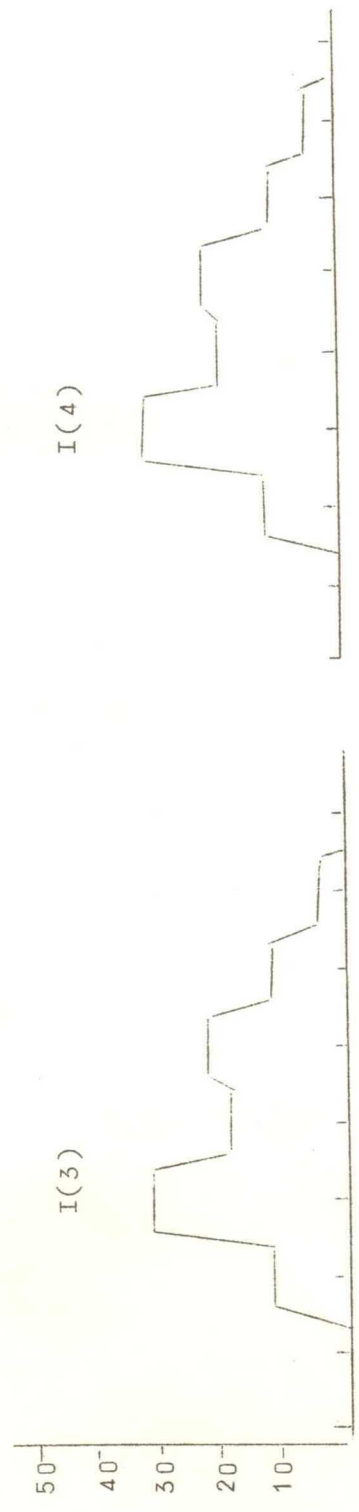
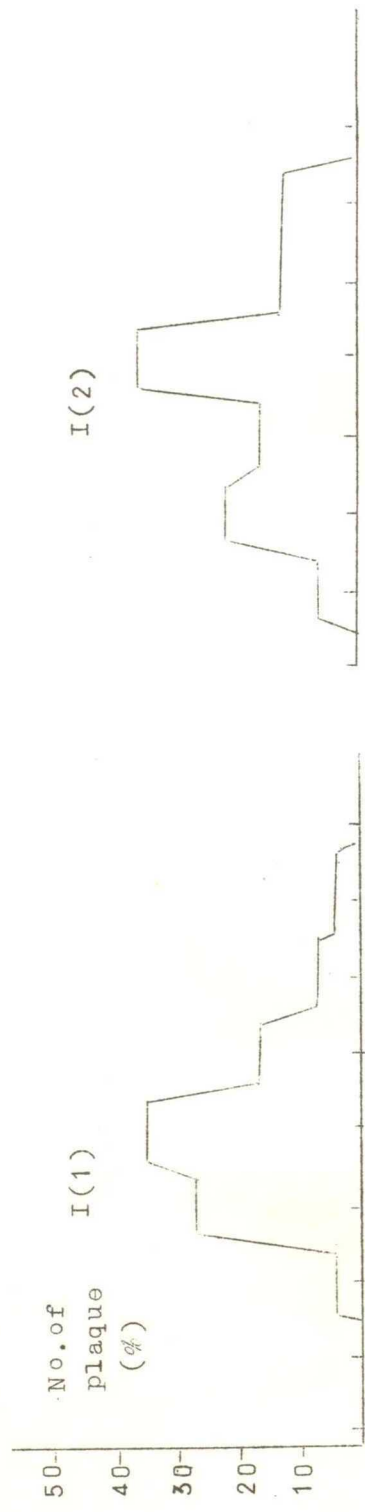
各供試ウイルスによつて產生されたブラック集団の中の小型(S-plaque)および大型(L-plaque)グループに属するブラックの中から1ヶを対象としてcloningを行なった。cloningはGranoff(1959)の方法によつた。すなわちS-およびL-ブラックを選択採取し、CEに播いて再び產生されたブラックから、S由来のものはS-plaqueを、L由来のものはL-plaqueを採取し、これをCE上で3回くり返し、いわゆるブラック継代3代を行なった。かくして得られた最終採取ブラックを、9日孵化鶏卵内で増殖させてクローン・ウイルスとした。

II 研究成績

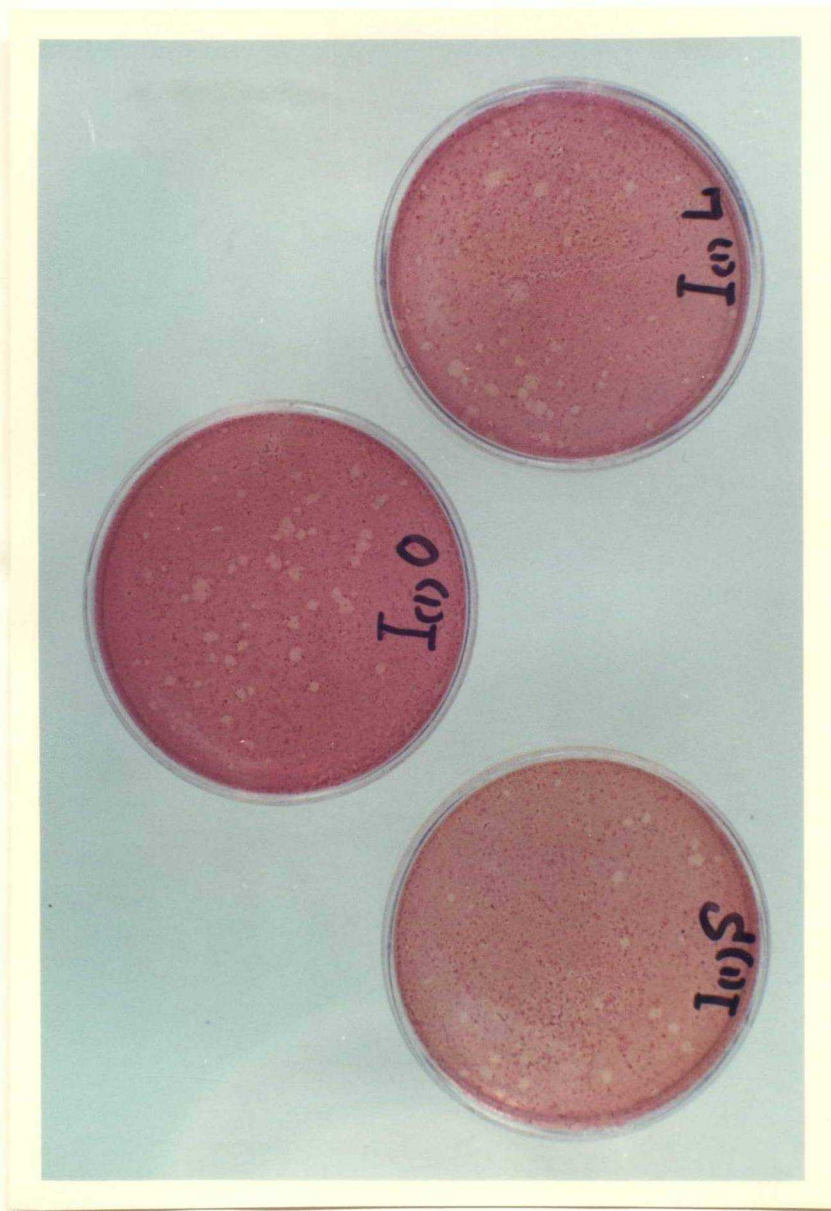
1. 供試ウイルスおよびクローン・ウイルスのブラック相

分離株は全て、CEおよびCKにブラックを產生し、そのブラック相は両培養細胞上にある variation を示した。(Figure 6)(Photograph - 2 ~ 5)

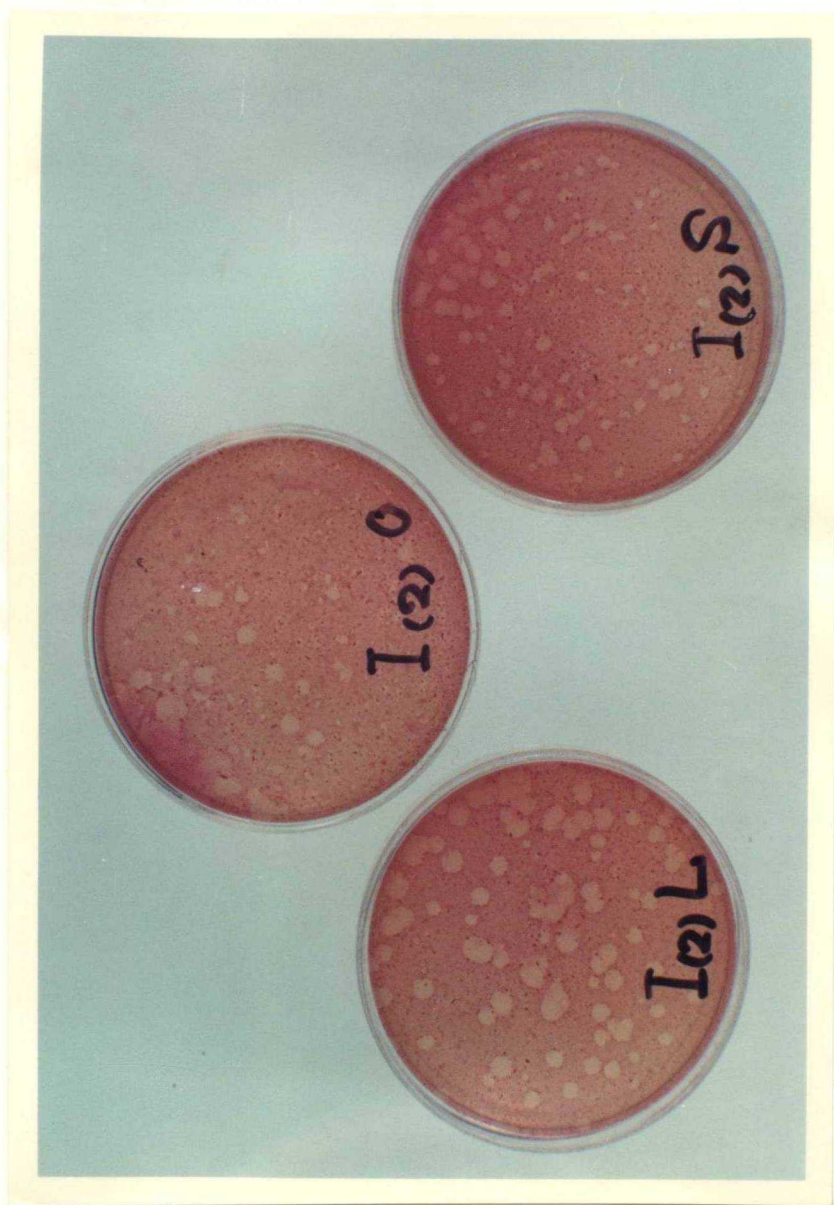
I(1)株による、CEにみられたブラックのSize variationは直径0.5から3.0 mmにわたる事がみられ、1.0から2.0 mm直径のブラックが最も多く、平均はほぼ1.5 mmであつた。I(2)株はCEにおいて殆ど直径1.0 mm以上のブラックを產生し1.5 mm~2.5 mmのブラックは約70%を占め、本株によるブラックの平均サイズは1.85 mmであつた。I(6)株はCE上におけるSize variationが最も大きいようであつた。すなわちサイズは直径0.5~3.5 mmにわたり、1.0 mm以下の小型ブラックは約35%である。しかし最も多い分布は、1.5~2.5 mmのブラックによつて占められ、約50%のブラックは



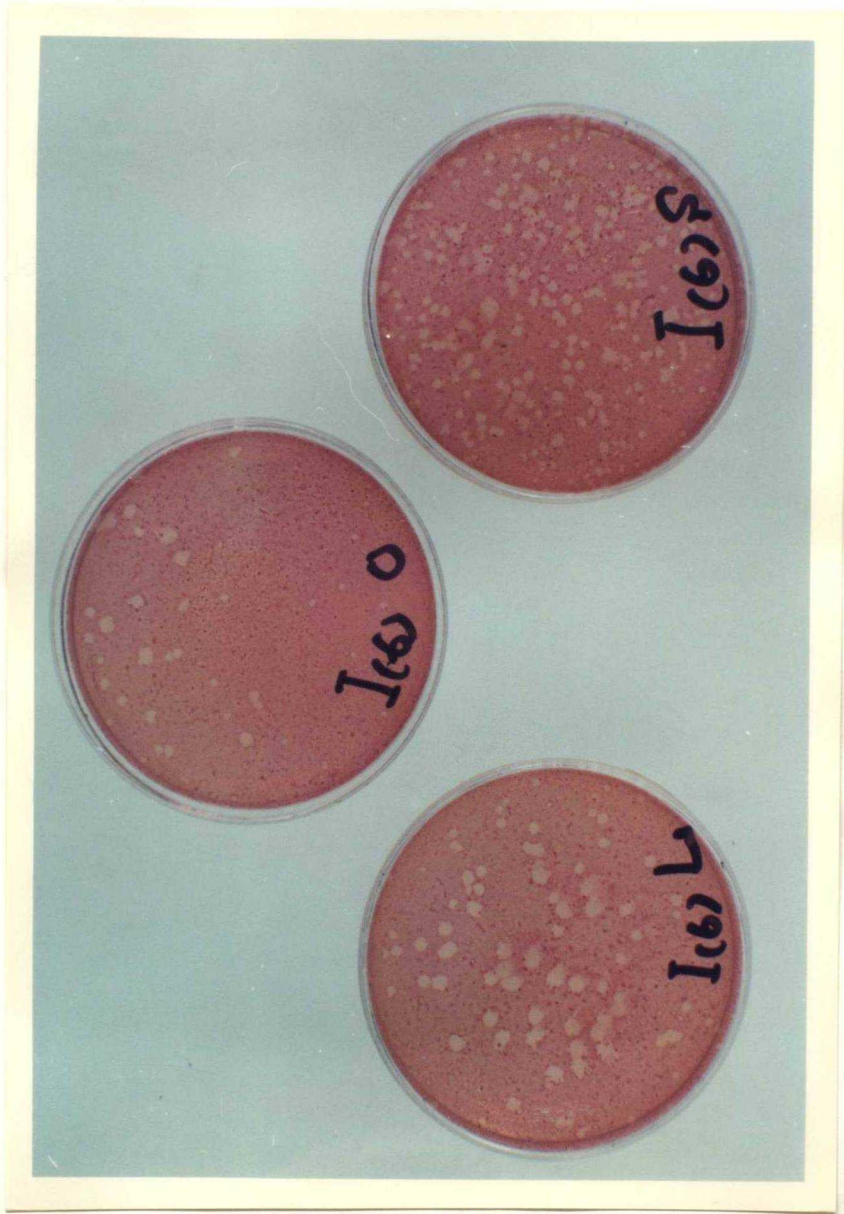
Size Variation of Plaques on Chicken Embryo Monolayer Produced by Isolates and Strain Sato of NDV



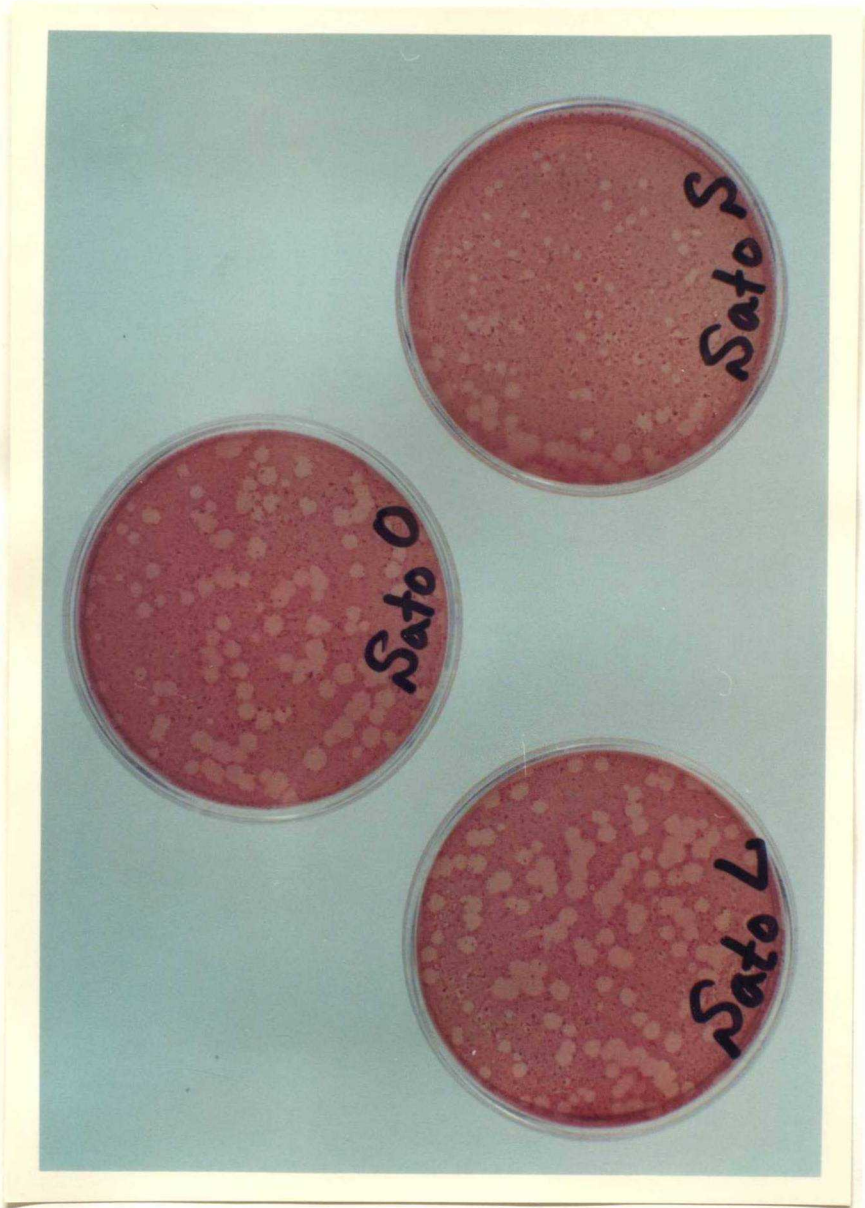
Photograph - 2 Comparison between each Plaque Phase on Chicken Embryo Monolayer Cultures produced by I(1) S-Cloned, I(1) L-Cloned, and I(1) Original Viruses



Photograph - 3 Comparison between each Plaque Phase on Chicken Embryo Monolayer Cultures produced by I(2) S-Cloned, I(2) L-Cloned, and I(2) Original Viruses



Photograph - 4 Comparison between each Plaque Phase on
Chicken Embryo Monolayer Cultures
produced by I(6) S-Cloned, I(6) L- Cloned,
and I(6) Original Viruses



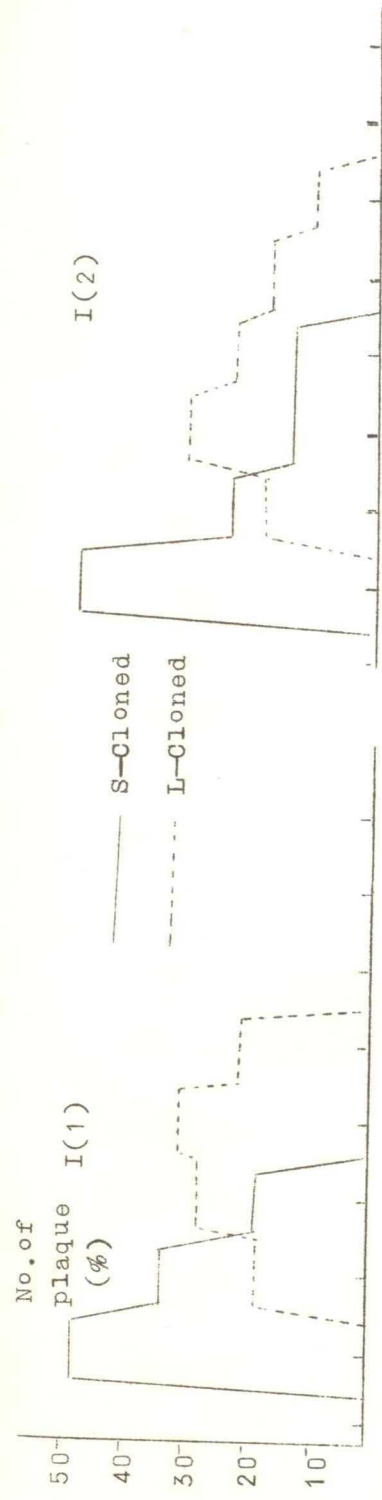
Photograph - 5 Comparison between each Plaque Phase on Chicken Embryo Monolayer Cultures produced by Sato S-Cloned, Sato L-Cloned, and Sato-Original Viruses

この位置にみられた。他の velogenic source より分離された各株の C E に示したブラック相は、I (2)株の分布に近く I (6)株の分布相も最多頻度の位置が類似であることを示している。強毒対照ウイルス佐藤株の C E に示すブラック相は、直径 1.0 mm 以下のブラックはごく少ないこと、1.0 ~ 4.5 mm に到るほど variation range が広いことである。このうち直径 3.0 mm のブラックが最も多く、約 20%、2.0 ~ 3.5 mm のブラックが 50% を占めて、平均サイズは 3.0 mm である。弱毒対照ウイルスの B₁ 株は本実験中、C E には少なくとも、接種後 4 日間では可視ブラックを産生することはなかった。

C K においても、供試ウイルスによるブラックの size variation がみられた。ほぼ C E にみられたと同様であり、I (6)株の広がりも同様であった。各株が C K に産生したブラックの size は C E にみられたブラックより全体的に大きい。弱毒対照ウイルスの B₁ 株も C K には容易にブラックを産生するが、佐藤株によつて C K に産生されたブラックの size より小さい。

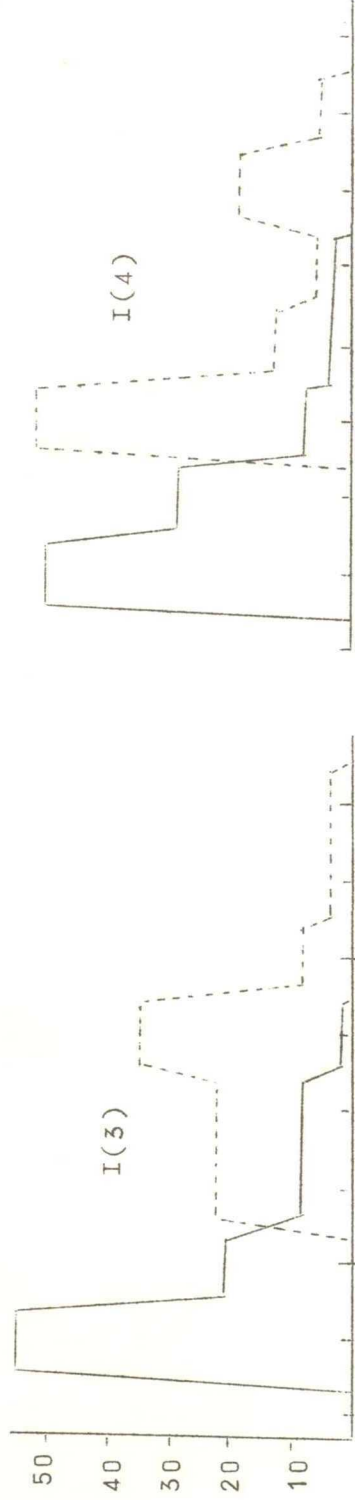
2. C E におけるクローン・ウイルスのブラック相

C E に 3 代ブラック継代を行なつて、各分離株の小型ブラック (S) および大型ブラック (L) から S-クローン、および L-クロンを得た。I (1)~(9) および対照ウイルス佐藤株から得られた S、および L-クローン・ウイルスのブラック・サイズの分布およびこのブラック集団について統計学的な演算を行なつた結果は Figure-7 および Table-7 に示した (Photograph-2~5)。すなわち各分離株より得られた S-および L-クローン・ウイルスが C E に示すブラック集団の様相は各々の由来するブラック・サイズを Predominant に産生する特性を示すものと見られた。しかし乍ら、Figure-7 ならびに Table-7 に図示される如く、S-クローン・ウイルスによるブラック集団にも、比較的大型のブラックを少ない割合いではあるが産生しまた L-クローン・ウイルスによるブラック集団にも小型ブラックの産生がみられる。このように示された各々のクローン・ウイルスのブラック集団の平均

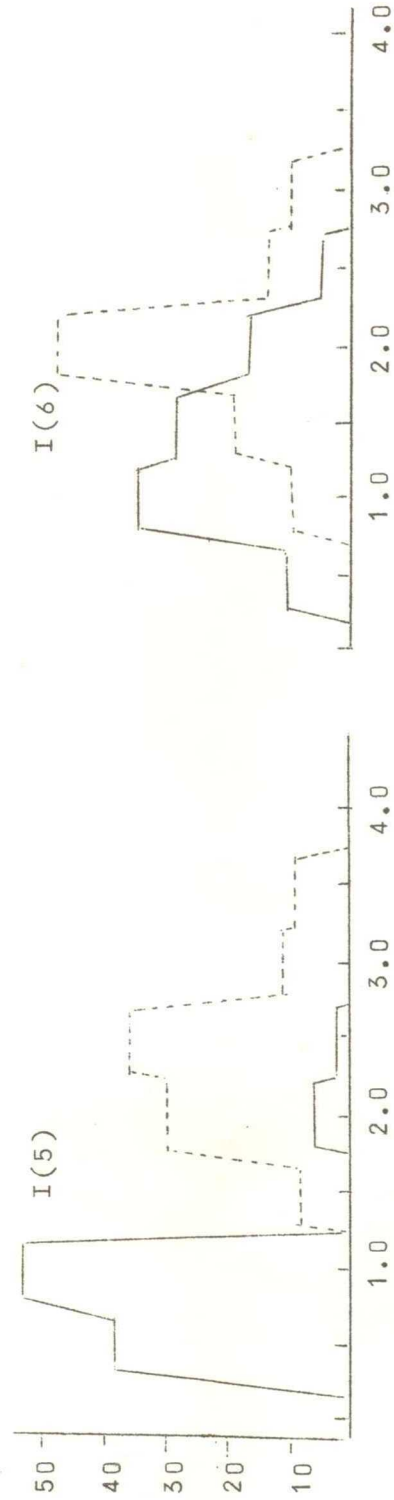


I(2)

S-Cloned
L-Cloned

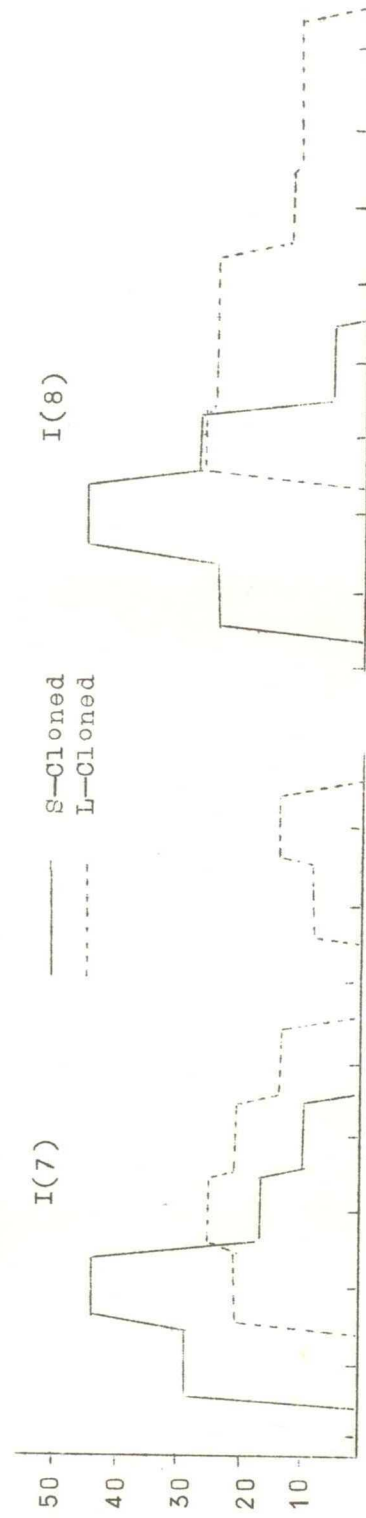


I(3)



I(5)

44



I(7)

S-Cloned
L-Cloned

I(8)



I(9)

Sato

Comparison of Size Variation of Plaques of Cloned Virus from Isolates and Sato Strain of NDV

Table-7 Comparison between Size Variations of Plaques produced by Cloned viruses and their Original Viruses by Statistical Analysis

Viruses	No. of Plaques	\bar{y}	S	V	F	t
I(1)	O	1.49				
	S	0.83	3.00	0.167		
	L	2.25	4.48	0.040	2.44	9.34**
I(2)	O	1.85				
	S	0.78	17.53	0.410		
	L	2.90	68.14	0.681	1.04	4.52**
I(3)	O	1.95				
	S	0.91	15.85	0.720		
	L	2.32	18.50	0.841	1.16	8.50**
I(4)	O	1.97				
	S	0.89	12.85	1.48		
	L	2.05	14.86	2.00	1.91	6.10**
I(5)	O	1.97				
	S	0.86	9.27	0.61		
	L	2.50	26.01	1.33	2.10	14.0**
I(6)	O	1.77				
	S	1.53	6.15	0.27		
	L	2.00	11.65	0.28	1.18	2.78**
I(7)	O	1.87				
	S	1.06	7.95	0.92		
	L	2.10	47.00	4.10	4.4	5.0**
I(8)	O	0.95				
	S	0.53	17.30	0.82		
	L	1.15	30.50	1.22	1.47	6.4**
I(9)	O	1.70				
	S	0.95	9.10	1.12		
	L	2.37	5.40	2.70	2.4	6.12**
Sato	O	2.14				
	S	1.40	16.10	0.462		
	L	3.00	75.21	0.753	1.40	9.10**

\bar{y} = mean of plaques, S = Sum of squares, V = Unbiased estimate of population variance,

値から、統計学的な算定結果は、クロンに伴うブラック・サイズの偏向性に有意な差が認められることを指示している。各クロンウイルスの最頻ブラック・サイズは、例えば、I(1)-S 0.5 μm , I(1)-L 2.0 μm 強毒型の例として I(2)-S 0.5 μm , I(2)-L 1.5 ~ 2.0 μm でありまた I(6)-S 1.0 μm , I(6)-L 2.0 μm であつた。さらに強毒対照ウイルス、佐藤株についても同様に、S-S 1.0 μm , S-L 2.0 ~ 3.0 μm であつた。これら各クロン・ウイルスの最頻ブラック・サイズと各々の原株が示したブラック集団の最頻ブラック・サイズとを比較すれば、例えば、I(1)-0 1.5 μm , I(2)-0 2.0 μm および I(6)-0 2.0 μm であること、および強毒対照ウイルス佐藤株のそれが 2.0 ~ 3.5 μm であることから、各クロン・ウイルスのクロンに伴うブラック集団のサイズ偏向性はとくに各々のS-クロン・ウイルスに著差があることが示された。

第五章 クロン・ウイルスの病原性

I 研究材料および方法

1. クロン・ウイルスの病原性試験

供試ウイルスの病原性(第二章参照)に準ずる

II 研究成績

1. クロン・ウイルスの病原性

各クロン・ウイルスの血清学的考察は佐藤株に対する抗血清を用い、対照原株としてI(1)(2)および(7)の諸株を用いて行なつた (Table 8)。クロン・ウイルスの中和価は佐藤株I(1)(2)および(7)株にみられた各々の価と差はないようであり、各クロン・ウイルスは各分離株より cloning の結果得られたものと認められた。これらクロン・ウイルスの病原性を、2日令雛でのICPI 8週令および30週令鶏でのIVPI さらに9日令孵化鶏卵でのMDTを算定して比較した。各クロン・ウイルスから得られた数値と、各々の原株の値とを比較した時、主として各々供試ウイルスのS-クロン・ウイルスに著差がみとめられた。

a) クロン・ウイルスのICPI

各クロン・ウイルスのICPIは各々の原株の病原性によつて異なる値を示した。(Table - 5)。Mesogenic typeのI(1)より得られたI(1)L-クロン・ウイルスの病原性はICPIではやゝ劣つていたが、尙I(1)Oと同様mesogenicなレベルを維持していた。反面、I(1)S-クロン・ウイルスは極度に病原性が低下し、ICPIはlentogenic virusの範疇に入るものとみられた。一方、強毒型のI(2)~(9)からのクロン・ウイルスは、各々のICPIから、原株と殆ど変らぬ強度な病原性を有するものと思われた。すなわち、S-クロン・ウイルスのICPIはL-クロン・ウ

Table-8 Neutralization Test with Cloned virus from the Isolates and Representative Strain; i.e. I(1), I(2) and I(7) and Strain Sato of NDV and Anti - Sato Immune Serum

Serum	Virus	Neutralization Index (log)
	Sato	3.21
	I (1) O	3.10
	S	3.20
	L	3.27
	I (2) O	3.19
	S	3.23
	L	3.12
	I (3) S	3.34
	L	3.34
Sato	I (4) S	3.16
	L	3.15
	I (5) S	3.44
	L	3.38
	I (6) S	3.17
	L	3.14
	I (7) O	3.20
	S	3.24
	L	3.14
	I (8) S	3.31
	L	3.04
	I (9) S	3.62
	L	3.35

ウイルスのそれと殆ど変わらず、いづれも強度の致死性を示した。わずかに I (6) S および I (7) S に、クロンに伴う病原性の減弱の傾向がうかがえただけであった。

b) クロン・ウイルスの I V P I

各クロン・ウイルスの I V P I は I C P I にみられたと同様な傾向を示し、特に I (1) S の弱毒化が著明であつた (Table -9)。すなわち I (1) L の I V P I は略原株の値に近く、strain typing からも中間毒型のレベルに位置することを示した反面、I (1) S の病原性は全く消失しており、少くとも 8 週令以上は鶏日令にかかわりなく、みかけ上弱毒対照ウイルス B₁ 株を接種された鶏の経過と全く変らないものであつた。

I (6) S および I (7) S の病原性は鶏日令により変化することが見出された。すなわち I (6) S は 8 週令鶏には強い病原性を示し、I V P I も原株と殆ど変らない価を示したが、30 週令鶏に対しては病原性の著明な低下を示し、I V P I の価も極端に低下していた。I (7) S もほぼ同様な傾向がみられた。他の強毒供試ウイルスからのクロン・ウイルスの I V P I は、S-クロン・ウイルスと、L-クロン・ウイルスとの間に病原性に殆ど差のないことを示し、原株とほぼ等しいものであつた。

c) クロン・ウイルスの M D T

10 日令孵化鶏卵に対して、各クロン・ウイルスは全株とも致死性は保持したが、クロンに伴う M D T の変化がみられた例もあつた。(Table-9)、すなわち、I (1) L は M L D の低下 (M L D 4.7, M D T 57 時間) を来したが、特に、I (1) S において著明で M L D 4.7 で M D T 80 時間を要することが見出された。I (1) S の病原性はこの点からも、その衰退が強調されたが、反面、I (1) L の病原性の減退は著しくなく、原株と同様に中間毒型ウイルスとみなされる価を示した。他の強毒例からの分離ウイルスの S-および L-

Table-9 IVPI for Susceptible Chickens and MDT of MLD
for 10-day Chicken Embryos of Cloned Virus from
Isolates and Strain Sato of NDV

Virus		Chicken IVPI		Embryo MDT	
		8-wk-old	30-wk-old	MLD	MDT
I (1)	S	0	0	4.7	80
	L	0.91	0.7	4.7	57
I (2)	S	2.3	2.3	7.0	59
	L	2.4	2.2	7.0	56
I (3)	S	2.1	2.0	N.T.	N.T.
	L	2.0	2.0	N.T.	N.T.
I (4)	S	2.0	2.0	N.T.	N.T.
	L	2.0	2.0	N.T.	N.T.
I (5)	S	2.0	2.0	7.7	56
	L	2.1	2.1	7.7	67
I (6)	S	1.2	0.4	6.7	67
	L	2.1	1.3	6.0	57
I (7)	S	2.0	0.3	6.7	64
	L	1.6	1.6	7.0	61
I (8)	S	1.7	1.9	7.7	64
	L	1.8	2.0	7.7	59
I (9)	S	2.0	1.9	7.7	
	L	2.1	2.0	7.0	
Sato	S	1.9	2.0	6.0	56
	L	2.5	2.0	6.0	49

N.T=Not tested

クロン・ウイルスの鶏胎児におけるM D Tは全てvelogenic virus の範疇に入る値を示し、各々の原株の数値との差はみられなかつた。

2. クロン・ウイルスの鶏体内分布

クロンに伴つて、その病原性に極度の変化がみられたI (1)Sと、I C P I I V P I およびM D Tにおいて原株とほとんど差がみられなかつたI (2)Sとを、8週令および30週令鶏へ接種し、その体内分布を検索しかつ各々の原株と比較した。(Figure 8.9)。

ウイルス接種後の病性の推移は病原指数にみられたと同様であり、また接種ウイルスの体内からの回収も同様であつた。すなわちI (1)Sの体内分布は、鶏日令が8週であつても、30週令であつても極めて限局したものであつたこと、肺、腺胃および肝では2次的なウイルスの増殖がみとめられたが一過性であつたこと及び接種後7~9日を経て抗体産生が認められる頃には全くウイルスは回収できなかつたことが認められた。さらにI (1)S株の免疫原性について少数例ではあるが測定した。(Table 10)

8週令鶏にI N投与し、観察したが、2週間後、強毒佐藤株(1000^{MLD}/ml)による攻撃にも全く異常なく全鶏耐過した。なお接種後のH I抗体は、8日後には検出でき後攻撃時まで図のように高度に産生された。

I (2)Sの鶏体内分布は殆ど全ての器管に48時間には到達していることを示し、侵襲ウイルスの2次的増殖にやゝ、I (2)Oに劣る傾向は示したものの、4~5日以内に鶏の死をもたらすことは変りなかつた。

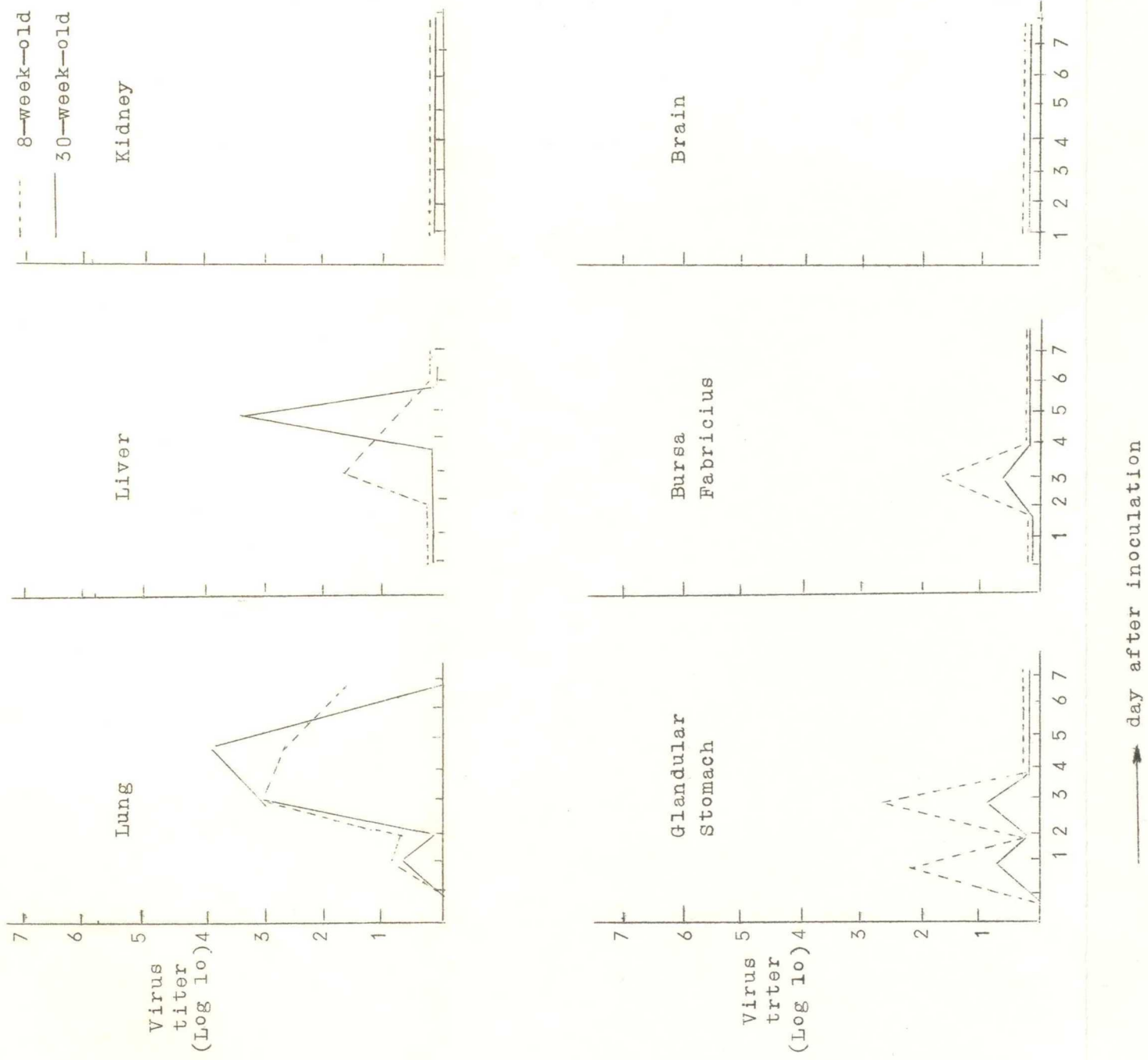


Figure-8 Titer of S-Clond Virus Isolate (1) of NDV in Tissues of Infected Chickens

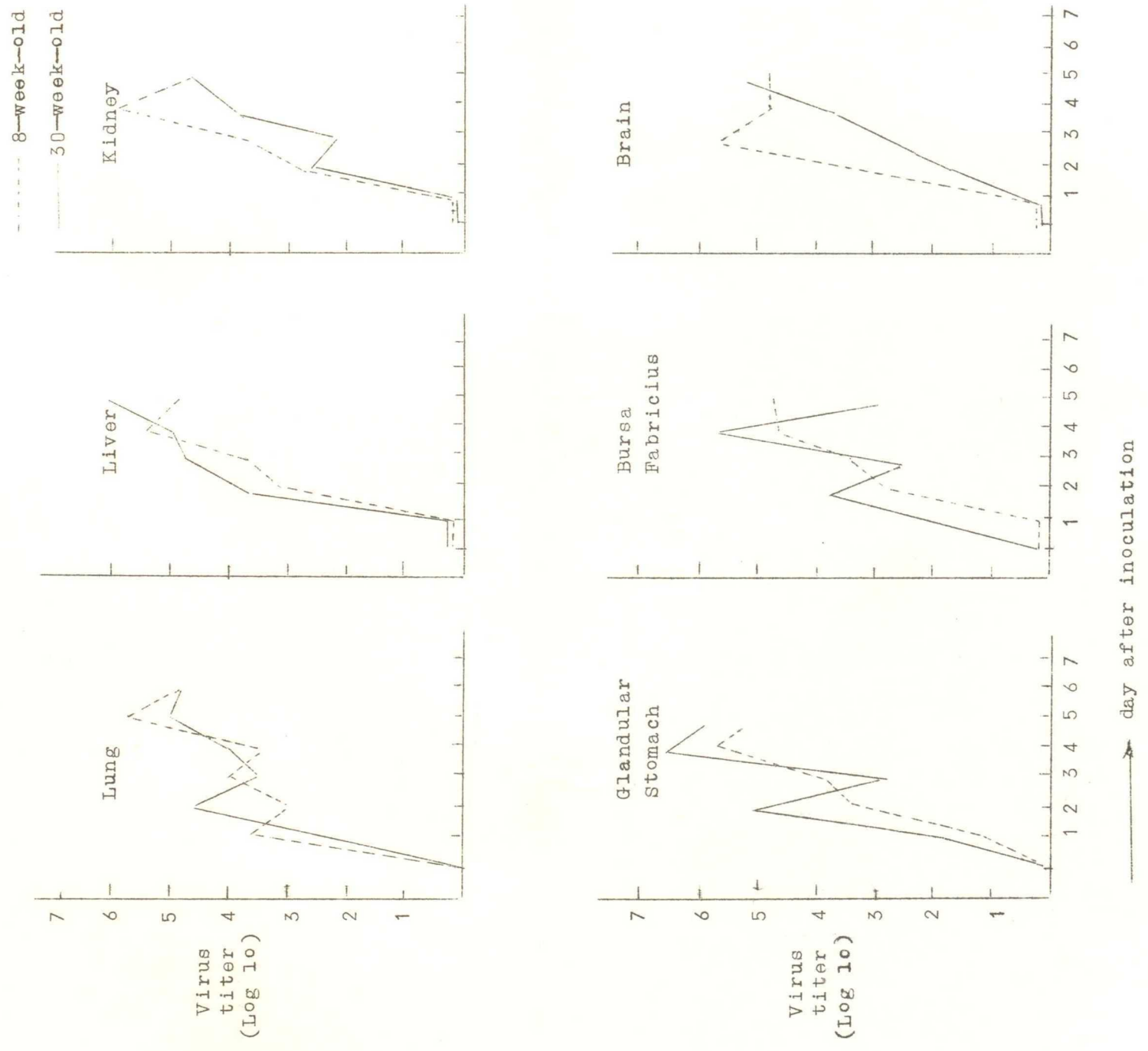


Figure-9 Titer of S-Cloned Virus Isolate (2) of NDV in Tissues of Infected Chickens

Table-10 Antigenicity of S-Cloned Virus of I(1) Strain
of NDV for 8-week-old Chicken

Chicken NO	H I-antibody response days after inoculation							Challenge	Result
	C*	5	6	8	10	12	14		
1003	<5	0	N.T.	10	-	40	80		
1013	<5	0	N.T.	5	10	-	40	Sato's	All, survived
1020	<5	0	N.T.	5	10	-	20	10 ³ MLD/	with no sign
1021	<5	0	N.T.	10	-	20	40		
1029	<5	0	N.T.	10	-	80	80		
Control									
1031									+
1033									+

Virus Inoculation;—Intranasal instillation(10^{5.7}MLD)

NT ;—Not tested

+ ;—Dead on the 3rd and 5th day after challenge

第六章 クロン・ウイルスの赤血球凝集能

I 研究材料および方法

第三章に準ずる。

II 研究成績

1. クロン・ウイルスのHemagglutinin の耐熱性 (Hr)

供試各ウイルス原株のHr性は、I(7)株および弱毒対照ウイルス・石井株の2株がHr⁽⁺⁾を示したのみで、I(1)株を含め全てHr⁽⁻⁾であった。各クロン・ウイルスのHr性は、I(7)よりのクロン・ウイルスをのぞき各々の原株と同じ性状を示した。すなわちI(1)SおよびI(1)LともにHr性に差はなく、56℃加温30分で凝集能は完全に破壊された。この性状は強毒ウイルスであるI(2)~(9)株でも同じであった。反面I(7)OのHr⁽⁺⁾の性状はI(7)Lには保持されず、I(7)LのHr性は、加温後5分で消失してしまうものであった。Hr⁽⁺⁾の性状はI(7)Sに保有せしめられており、その熱抵抗性も全く、I(7)Oと同様で56℃30分では安定であったが60分加温後でも凝集能を維持することはなかつた (Figure 5)。

2. クロン・ウイルスの哺乳動物赤血球凝集能 (mamHA)

各クロン・ウイルスのmamHAは、Hr性にみられたと同様に、I(1)株を含めた他株からのS-クロン、およびL-クロン・ウイルスはともに各々の原株と異なる性状を有することはなかつた。I(7)株のmamHA⁽⁺⁾はHr⁽⁺⁾の性状と同様、病原性の劣ると思われたS-クロン・ウイルスに保持されていた (Table 11)。

Table-11 Hemagglutination of Cloned Virus from Isolates and Sato Strain of NDV for Mammalian Erythrocytes

Virus	Mammalian erythrocytes			
	Horse	Cow	Goat	Sheep
I (1) S	-	-	-	-
L	-	-	-	-
I (2) S	-	-	-	-
L	-	-	-	-
I (3) S	-	-	-	-
L	-	-	-	-
I (4) S	-	-	-	-
L	-	-	-	-
I (5) S	-	-	-	-
L	-	-	-	-
I (6) S	-	-	-	-
L	-	-	-	-
I (7) S	+	+	+	+
L	-	-	-	-
I (8) S	-	-	-	-
L	-	-	-	-
I (9) S	-	-	-	-
L	-	-	-	-
Sato S	-	-	-	-
L	-	-	-	-

S Cloned-virus from small plaque of Isolate
(S-cloned-virus)

L Cloned-virus from large plaque of Isolate
(L-cloned-virus)

日本におけるNDの確認は中村ら(1933)による。中村らは、越智の朝鮮鶏疫ウイルスと日本の家禽ベスト・ウイルス(佐藤株)が免疫学的に同一であり、かつ両ウイルスが、Doyle(1927)のNDウイルスと同一であることを報告した。以後、1945年にかけて家禽ベストとして報告された鶏に強度の病原性を示して数回にわたって流行した伝染性疾患は殆どNDであると云う(宮本・1964)。川島ら(1951)、佐藤ら(1952)および宮入ら(1951)は、1951年にみられたNDの発生例について、病原ウイルスの分離、発生鶏の症状および病理所見から、致死率6~10%の比較的病性の軽度のウイルスによるものであると報告した。

この様に、Doyleの鶏の新らしい疾病としてのNDの確認および病原ウイルスの証明(1927・1935)と相前後して、日本に於ても、その発生がみとめられているようであり、以後の多くの知見からすでに日本には佐藤株のごときveogenic type、川島らのmesogenic typeさらに本実験に弱毒対照ウイルスとして用いられた石井株(清水ら、1966)にみるlentogenic typeとあつてNDウイルスは病原性の上から巾広い種類の存在が知られている。わが国には1966年秋期から1967年春にかけ全国的に、NDの発生があり、その前後にみられたNDの発生には2つ異なるPatternが見られるようである。すなわち：-

1) 発生は限局的で、発生地域の拡大化は余りなく、流行の長期化も少ない。原因ウイルスの病原性も軽度で、感染鶏の日令により病勢が異なる。成鶏では多く異常呼吸に初まり、主徴は産卵異常で致死率は極めて低い。反面、若令鶏には強度な病原性を示し、初発症状は多く元気沈衰、下痢、食欲癱絶を示す。続いて脚麻痺および斜頸等の神経症状が現われ、多くは死に到る。

2) 伝播力は極めて旺盛であり、感染は多く急激な元気沈衰、食欲癱絶によつてみとめられ、症状発現をみてから多く3~5日の経過で嗜眠等を伴つて、罹病鶏は日令を問わず殆ど100%近く死に至る。稀に5日以上生存すれば著明な神経症状を発現して致死する。

いわゆる1) の型はアメリカ型といわれ病原性の上から中間毒型 (mesogenic type) であり、2) の型はアジア型といわれている強毒 (velogenic type) ウイルスによるものである。

本実験における各分離株の病原性試験の結果は、各株の野外における態度を反映した。I (1)株は1) の症例から分離され、鶏の日令により致死率を異にする性状、および、I V P I と I C P I の価から mesogenic または American type のウイルスとみなされた。

I (2)~(9)の諸株は2) の症例から分離されたウイルスである。病原性試験でも極めて強烈な性状を示し、鶏体内分布試験では Jungheer (1964) の強毒ウイルスの例にみられると同様に I (2)~(9)の諸株は殆ど全身の器官に、多く48時間以内に到達し、かつその場において2次的に分布ウイルスは増殖を示し、鶏の症状発現を促すことを示し、転帰は殆ど100%致死を示すことから、これら諸株は velogenic type とみられた。尚 I (6)株はウズラの症例から分離され、鶏に示す病原性は I (2)株および強毒対照ウイルス佐藤株とそん色ない値を示している。

ウイルスの *in vivo* における動態から、NDVの病原性を定める因子として、Karzon (1951), Sinha (1952), Prandly (1965) および Vadlamudi and Hanson (1966) は感受成鶏の 1) 日令による感受性の変化、2) ウイルスの鶏体内における増殖比、3) 組織親和性、4) 宿主 barriers を透過する能力の程度および、5) 宿主の抗原刺激に対する感応度の諸点をあげ、また Bang (1953) および Butler (1965) は細胞破壊能もウイルスの virulence に関与するとのべている。

I (1)株と I (2)株の分離時期は強毒ウイルスの発生が初期急激にみられたい

わば疫学的に移行期であつたように思われる。強毒例 I (2) 株について知られていることは、1) Broiler form (約 60,000 羽飼育) に突然に発生し——おそらく導入雛が初発——2) 経過は、元気消費の初発症状をみてから多く 2 日～3 日で致死する例がほとんどであり、3) 連続的に幼雛に感染し初発例の確認後約 2 週間で飼育鶏数の約 60% が斃死した、等である。感受性雛の連続的導入は病原ウイルスの強毒化への一因とされており

(Brandly 1964), 上記のような、I (2) 株の初発流行の形態は、本株の character 形成に重要な因子となつていられる。I (2) 株流行をみてからの各地に頻発した発生は殆ど、I (2) タイプによる例であり、少なくとも以後 1 年間もの間に、I (1) タイプの流行例はみられていないようである。I (1) タイプ・ウイルスと、I (2) タイプ・ウイルスとが自然的条件が比較的相似の場合に宿主が与えられた時、NDV の最も著明な Marker である病原性上から、I (2) タイプ・ウイルスが優勢的な存在であろうと思われるけれど各例における流行ウイルス、特に病原性の異なる幾例かの流行ウイルスの推移は周到な疫学的調査によらなければならない。しかし乍ら、本実験の病原性試験に示した日令の異なる鶏に対する病原性の変化、体内分布域、およびその部位における分布ウイルスの 2 次的増殖の差、さらに CE におけるクロンに伴つて得られた S—および L—両クロン・ウイルスの病原性の相違の有無から各々のウイルス株に潜在的に保持される遺伝的性状の差が、各々のウイルス株の疫学上の態度を決定する諸因子の一部であると思われる。

Liu および Bang (1953) は強毒ウイルスの鶏胎児脳内への到達および増殖が弱毒ウイルスより急激であることから、このような重要器管におけるウイルスの選択的増殖が ND の結末に重要な因子となつていであろうと指摘している。

著者は各供試ウイルスについて最も顕著な性状と云える鶏に対する病原性の他に、鶏胎児に対する病原性 (CEV), Hr および mam HA を検索し、各ウイルスの株回育性を明らかにした。I (1) 株は、他の (I)～(9) と異なり鶏に

に対する病原性は mild であり、また流行時期も異なるものである。各株の C E V は I C P I および I V P I で示された各々の病原性に一致した成績を示している。すなわち、各株の 9 日孵化鶏卵に対する M L D 6.0 ~ 7.0 における M D T は I (1) 株を mesogenic type のウイルスと、また I (2) ~ (9) 株の M D T は多く 60 時間以内であつていづれも velogenic type のウイルスであることを示している。

しかし乍ら、Hr および mam HA の性状は対照ウイルスも含めて病原性と
の比例ないし一致の傾向はみられなかつた。弱毒対照ウイルス B 1 株、強
毒対照ウイルス、佐藤株はともに Hr⁽⁺⁾ mam HA⁽⁺⁾ であり、強毒ウイルス
I (7) 株をのぞいて、I (1) 株も含めた他の全株も同様 Hr⁽⁺⁾ mam HA⁽⁺⁾ の性状
を示し、弱毒対照ウイルス、石井株と強毒分離ウイルス、I (7) 株は Hr⁽⁺⁾ お
よび mam HA⁽⁺⁾ を示した。このような Hr または mam HA の性状は N D ウイ
ルスの病原性と
の共通性は全くないようであり、各株が示した各々の Hr お
よび mam HA は各々の株固有の他の性状であるとみなされた。Kohn ら
(1969) は、病原性の異なる N D ウイルス 8 株を用い、各々のブラック
サイズ、細胞融合性、溶血能、および凝集能と溶血能の耐熱性を調査し、これ
らの性状は各ウイルス株の病原性と
の関連性は全くなく、各々の性状は株固
有性と云えるものであるとしており、上記著者の得た所見と一致する。

Dulbecco (1952) は、C E における西部馬脳炎ウイルスによるブラ
ック産生を見出して動物ウイルスにおけるブラック法を確立し、さらに単一
のブラックを選択してウイルスの Pure line の作出を行ない (Dulbecco
1954) 遺伝的に単一性状のウイルスの分離を可能にした。後、多くのウ
イルスについてブラック法が応用され、これらの観察に伴ない、ウイルスが
示すブラックの形態に多様性が存在することが見出され、かつこれらの種々
の形態が遺伝的な、Marker としての一つの表現型であることが知られた
(Cooper 1967) この遺伝的 Marker としてのブラックの多様性は
同時にある一つのウイルス株は性状を異にするウイルス粒子の集合体である

ことを意味し、このような性状を異にするウイルス粒子、すなわち mutants は物理的刺戟また化学薬剤等により作られた mutant に対して、spontaneous mutants と云われている (Takemoto 1966)。

N D ウイルスに関するブラック変異と、病原性も含めた生物学的性状との関連性についての研究は極めて多い。Granoff (1961)、および Thiry (1964) は chemical mutagen として亜硝酸を用いて、誘発した小型ブラック mutant について病原性が大型ブラック産生ウイルスに劣ることを見出している。N D ウイルスは、selection pressure の比較的ひくい鶏胎児等で維持されている、研究所等における保存株も含めて本質的に mixed population (Heterogeneity) であることが認められており、(Granoff 1964, Schloer 1968. b) N D ウイルスの spontaneous mutant の多様性がみとめられている。これら mutant は C E に産生するブラックに多様性を示すことと、この種々な Plaque variants が同時に病原性をふくめた種々な生物学的性状に極めて variation を示すことが認められている。C E にみられるブラックの variation には、size variation と morphological variation がある。Granoff (1959, 1961) は N D ウイルスが C E に示したブラックから size を指標としてクロンを行なつて、このクロン・ウイルスの病原性を追求し、S-クロン・ウイルスは、L-クロン・ウイルスより鶏胎児に対し病原性が劣ることを見出し、Schloer (1964, 1968. a) および Thiry (1964) も同様な知見を得ている。また Baron (1964) は N D ウイルスの病原性の強弱に比例し、ブラックの大きさに差があること、および弱毒ウイルスは C E に対するブラック産生能が極めて弱いことを示している。さらに、ある N D ウイルス株は red plaque を産生し (Thiry 1963) さらに、clear および turbid plaque を産生し (Granoff 1959, 1962), これら clear および turbid plaque は培養条件によりまた経時的に変化する (Schloer 1968. b)。

本実験においては、強毒対照ウイルス、佐藤株も含めて各供試ウイルス I (1)~(9)株について、ブラック・サイズによるクロンを行なった。得られた各クロン・ウイルスはブラック継代3代の後、9日孵化鶏卵に増殖せしめたものである。各クロン・ウイルスについて、そのC₅₀に産生するブラック集団のサイズ偏向性を含めた生物学的諸性状を追求し、得られた結果、およびそれらの性状を各々の原株にみられた性状と比較した結果、病原性を含めた諸性状に法則性は全くないことが認められた。各々のS-およびL-クロン・ウイルスのC₅₀に示すブラック集団のサイズに関する統計学的考察では、クロン・ウイルス全てのブラック・サイズについてS-クロン・ウイルスとL-クロン・ウイルスとの間に有意差の有することがみられている。これら各クロン・ウイルスの病原性試験および鶏体内分布試験の結果を各々の原株の示した値と比較した時、極めて興味ある結果を示した。中間毒型ウイルス、I (1)株よりのクロン・ウイルスは全く相反した病原指数を示し、すなわち、特にI (1)Sが著明に病原性を失っていたことが見出され、I (1)Lがなを原株と相似の値を示したのに対し甚しい対照を示した。他の強毒ウイルスI (2)~(9)株からの、S-クロン・ウイルスの病原指数は全く各々の原株と変わらず、また各々のウイルス株のL-クロン・ウイルスもほぼ同様であつてクロンに伴う病原性の分別は殆どみられていない。わづかに、I (6)SおよびI (7)Sが30週令鶏に示した病原指数から、病原性減退の相がみられたのみである。しかし乍ら、I (7)株が示したHr⁽⁺⁾ およびmam HA⁽⁺⁾ の性状はI (7)Sにみられた特異な性状であつてI (7)LはHr および、mam HA はともに(-)であることが、クロンに伴つて明確に分別されて認められた。

NDウイルスのブラック・サイズと病原性との関連性については、Granoff (1961), Schloer (1964, 1968. a), Thiry (1964) およびBang (1964)の知見があるが、反面、NDウイルスの病原性に関する討論の場でBang, およびSchloer (1964)はブラック・サイズと病原性との関連性について例外の存することに同意している。さらに、

Poliovirus について大型ブラック産生ウイルスは相対的に強い病原性を有するが、この関係は絶対的ではなく、例外も認められ、かつこのことは、病原性と他の marker にもあてはまるものであると云われている (Take-moto, 1966)。

本実験における、I (1)株のクロンに伴う弱毒ウイルス、I (1)S 株の作出と、I (2)~(9)株にみられた両クロン・ウイルスの病原性に変化のみられなかつたことは各々のウイルスの野外における態度および本実験の成績から示唆されるように思われる。すなわち I (1)株の病原性は、鶏日令によつて変化を示し、一方 I (2)~(9)株はこの鶏の age factor に関与することなく強度な病原性を示したことである。換言すれば、各分離株の性状は野外での selection pressure により影響を受けた結果であると云えるようであり、I (2)~(9)株は病原性が強調された集団に移行したウイルス株であろうと思われた。尚、I (1)S 株の病原性は、鶏胎児に対する致死性がやや高いことをのぞいて、I C P I も含めた病原指数は弱毒ウイルス Lasota (Poultry Disease Subcommittee, 1963) にほぼ一致する。また体内分布が一過性であり、かつ極めて限局していることから I (1)S 株のワクチン・ウイルスとしての可能性も示唆されるようである。しかし乍らこの I (1)S 株がワクチン・ウイルスとしての適否は、さらに back - mutation に関して周到な調査が行なわれてから決定されねばならない。

I (7)株の Hr⁽⁺⁾ および mam HA⁽⁺⁾ は強毒流行ウイルスの多様性を思わせるが、他の Hr⁽⁻⁾ および mam HA⁽⁻⁾ の性状と同様に各々の病原性に附随した性状であろうと思われた。各供試ウイルスのブラック産生能と病原性との関連性は他の性状と同様に、また各株からのクロン・ウイルスの諸性状も、野外流行時の或る時点におけるそのウイルス株が所有する遺伝子の表現型であつて、各々の株固有の性状であるように思われた。これを要するに今回、野外の流行時に分離し得た Virus 株を、その病原性、ブラック形成能および血球凝集能などの生物学的性状の観点から比較し、更に夫々の分離株よりのクロ

ーニングによつて得られたウイルスについての諸性状を比較したところ、野外の流行初期の分離株とそれ以後の諸株との間には病原性に於て明確な差のあること、夫々の分離株からクローニングにより得られた株の中、流行初期の分離株のそれに、ブラック形成が小型で病原性が一層減弱したものであることが認められた。すなわちこれらの 事実 は 野外における流行の時期により、ウイルスの病原性に推移があり、流行初期に認められた病原性の弱いものは次第に撰択的に減少して強毒化される傾向を示し、又一時期に分離されたウイルスの中にも性質の異なるウイルスの混在を認め、これらがクローニングにより更に分離されることがわかつた。尙病原性とその他の生物学的性状例えはブラック・サイズ、血球凝集能などの間には必ずしも平行関係のないことが明らかにされた。

1967年を中心に最近3ヶ年間に亘つて野外発生例より分離されたNDウイルス9株について病原性を含めた2・3の生物学的性状を追求した。鶏胎児培養細胞に、これら9株によつて産生されるブラックは、ひろい size variation がみられた。このブラック集団から小型(S)および大型(L)のブラックを選択してcloningを行ない、得られたクローン・ウイルスについても原株と同様、病原性および他の性状を追求した。クローン・ウイルスの性状と、各々の原株の性状と比較検討し、分離9株の株特異性を調査した。

各分離株はIVPI, ICPI およびMDTから病原性について、二種ある事がみられた。すなわち、I(1)株は中間毒型に、他のI(2)~(9)株は強毒ウイルスの範疇に入る。

各分離株のHr およびmam HA 測定の結果、強毒ウイルスの中にも多様性がみられた。すなわち、I(7)株はHr およびmam HA ともに(+)であつたが他の強毒ウイルスI(2)~(9)は全て(-)であつた。I(1)株もHr⁽⁺⁾ およびmam HA⁽⁺⁾ であつた。対照ウイルスの成績は佐藤株(強毒)Hr⁽⁺⁾ mam HA⁽⁺⁾ B1株(弱毒)Hr⁽⁺⁾ mam HA⁽⁺⁾ および石井株(弱毒)Hr⁽⁺⁾ mam HA⁽⁺⁾ であつた。すなわちNDVのHA活性は病原性に關連しない性状であると思われた。クローン・ウイルスによつてCEに産生されるブラック集団には各々の由来するサイズが優勢的に産生されS-およびL-クローン・ウイルスの産生するブラック集団の間の統計的解析でも差がみられた。

クローン・ウイルスの病原性は各々の原株のそれによつて、影響される。すなわち、クローン・ウイルスのIVPI およびICPIの結果からI(1)-S-クローン・ウイルスは極度に病原性の低下が、そして、I(1)-L-クローン・ウイルスの病原性はその原株の値とほぼ等しいことが認められた。さらに、I(2)~(9)からの各々のクローン・ウイルスは殆ど原株と変らない値がみとめられた。

クローン・ウイルスの Hr および mam HA の性状は各々の原株と、変らない性状を示したが I (7)株の Hr⁽⁺⁾ および mam HA⁽⁺⁾ の性状は I (7)S-クローン・ウイルスが保持し、L-クローン・ウイルスは(-)であった。

NDV のブラック・サイズと病原性との関連性については小型ブラック産生ウイルスは比較的病原性の弱い傾向はあるが必ずしも比例しない。すなわち、I (1)株は日令の様な鶏の生理的条件によつて病原性が異なってくる。反面、I (2)~(9)株は日令にかかわらず強い病原性を示した。いづれも野外の selection pressure により生じた異なつた性状であらうと思われた。これらの他に Hr および mam HA 性も各々の株の病原性に伴つた性状であらうと思われた。すなわち各分離株にみられた性状は、その時点におけるウイルス株の所有する遺伝形質の表現型であり、いづれも株特異性と、云える様である。

稿を終るにのぞみ、越智学長に敬意を表し懇切なる御指導、及び御交閲を賜つた齊藤保二教授並びに今井信実教授に衷心より感謝をいたします。

REFERENCES

- 1) 五十嵐義輝, 長峯 隆, 浅原哲夫, 吉村政雄, 升 茂, 1964.
Betapropiolactone で不活化した Newcastle Disease Virus Vaccine に関する研究。第58回(昭和39年)日本獣医学会。
- 2) 川島秀雄, 佐藤多津雄, 花木琢麿, 吉田 孝, 1951。昭和26年埼玉県入間郡に発生せるND並びにこれに類似する鶏の疾患について。第31回 日本獣医学会。
- 3) 宮入一雄, 望月 宏, 須川章夫, 1951。昭和26年度埼玉県入間郡に発生したNDの病理所見。第31回 日本獣医学会。
- 4) 宮本 猛, 1964。ニューカッスル病ウイルス, 獣医微生物学。平戸勝七編。546~551。
- 5) 佐藤多津雄, 川島秀雄, 花木琢麿, 高橋 勇, 1951。昭和26年埼玉県入間郡において分離せるNDVの性状並びに耐過鶏血清のHI反応について。第31回 日本獣医学会。
- 6) 清水文康, 川村 斉, 椿原彦吉, 1966。野外からのニューカッスル病ウイルス弱毒株の分離とその性状。農林省家畜衛生試験場研究報告。№52, 1~9。

- 7) Asplin, F. D., 1952. Immunization against Newcastle disease with a virus of low virulence (strain F) and observation on sub-clinical infection in partially resistant fowls. *Vet. Record.* 64:245-249.
- 8) Bang, F. B., and G. M. Schloer., 1964. Discussion in Newcastle disease virus. In *Newcastle disease virus: An evolving pathogen.* Edited by R. P. Hanson. Univ. Wisconsin Press. Madison. 273-276.
- 9) Bankowski, R. A., 1958. A tissue culture modified Newcastle disease virus; I. Modification and propagation of Newcastle disease virus in tissue culture. *Avian Disease.* 2:197-209.
- 10) Bankowski, R. A., 1964. Pathogenicity of Newcastle disease virus. In *Newcastle disease virus. An evolving pathogen.* Edited by R. P. Hanson. Univ. Wisconsin Press. Madison. 229-246.
- 11) Bandowski, R. A., and Corstvet, R. E., 1962. Nature of immunity to Newcastle disease in vaccinated chickens. I. Influence of residual resistance upon the level and duration of immunity following revaccination. *Avian Disease.* 6:333-348.
- 12) Bankowski, R. A., and J. Hyde., 1957. Cultivation and cytopathogenicity of Newcastle disease virus in Hela and bovine kidney cell culture. *Am. J. Vet. Res.* 18:743-746.

- 13) Bang, F. B., 1953. The development of NDV in cells of the Chorio-allantoic membrane as Studied by thin sections. Bull. Johns. Hopkins Hosp. 92:309-329.
- 14) Baron, S., 1964. Relationship of interferon and temperature to virulence of Newcastle disease virus. In Newcastle Disease Virus: An evolving pathogen. Edited by R. P. Hanson. Univ. Wisconsin Press. Madison. 205-220.
- 15) Beach, J. R., 1944. The neutralization in vitro of Avian pneumoencephalitis virus by Newcastle disease immune serum. Science, 100:361-362.
- 16) Beaudette, F. R., J. A. Bivino, and B. R. Miller., 1949. Newcastle disease immunization with live virus. Cornell Vet. 39:302-333.
- 17) Bouer, R. K., 1958. Studies on Newcastle disease virus by the plaque method. J. Bact., 75:496-498.
- 18) Brandly, C. A., 1964. Recognition of Newcastle disease as a new disease. In Newcastle Disease Virus: An evolving pathogen. Edited by R. P. Hanson. Univ. Wisconsin Press. Madison. 53-64.
- 19) Brandly, C. A., and R. P. Hanson., 1965. Newcastle disease. Disease of poultry. Fifth edition. 633-674.

- 20) Brandly, C. A., H. E. Moss., E. L. Jungherr., and E. E. Jones., 1946. The isolation and identification of Newcastle disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 7:289-306.
- 21) Brandt, C. D., 1958. Inclusion body formation with Newcastle disease and Mumps viruses in culture of chicken embryo cells. *Virology* 5:177-191.
- 22) Burnet, F. M., 1942. The affinity of Newcastle disease virus to the influenza virus group. *Aust. J. Exptl. Biol. Med. Sci.* 20:81-88.
- 23) Butler, M. P., 1965. Avian viruses in adult cells in vitro: A comparison of Fowlpox, Bronchitis, Laryngotrachitis, and Newcastle disease viruses in tissue culture of embryonic and adult fowl cells. *Virology.* 25:454-468.
- 24) Churchill, A. E., 1965. The use of chicken kidney tissue culture in the study of the avian viruses of Newcastle disease, Infectious Laryngotracheitis and Infectious bronchitis. *Res. Vet. Sci.* 6:162-169.
- 25) Clancy, C. F., H. R. Cox, and C. A. Bottorff., 1949. Laboratory experiments with living Newcastle disease vaccine. *Poult, Sci.* 28:58-62.
- 26) Clark, E., and F. P. O. Nagler., 1943. Hemagglutination by viruses. The range of susceptible cells with special reference to agglutination by vaccinia virus. *Aust. J. Exptl. Biol. Med. Sci.* 21:103-105.

- 27) Cooper, P. D., 1967. The plaque assay of animal viruses. *Method in virol.* 3:243-311.
- 28) Doyle, T. M., 1927. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter passing virus. *J. Comp. Pathol. Therap.*, 40:144-169.
- 29) Doyle, T. M., 1935. Newcastle disease of fowls. *J. Comp. Pathol. Therap.* 48:1-20.
- 30) Dulbecco, R., 1952. Production of plaques in monolayer tissue culture by single particle of an animal virus, *Proc. nat. Acad. Sci. U. S.* 38:747-752.
- 31) Dulbecco, R., and M. Vogt., 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exptl. Med.* 99:167-182.
- 32) Durand, D. P., and A. Eisenstark., 1962. Influence of host cell type on certain properties of Newcastle disease virus in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* 23:338-342.
- 33) Gelenczei, E., and D. Bordt., 1960. Studies of Newcastle disease virus strains in various cell culture. *Am. J. Vet. Res.* 21:987-992.
- 34) Gill, E., Sullivan, J. E., Stone, H. D., and Hundemann, A. S., 1959. Role of adjuvants in immunogenicity of killed Newcastle disease vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 20:357- 365

- 35) Granoff, A., 1959. Studies on mixed infection with Newcastle disease virus; I. Isolation of Newcastle disease virus mutants and tests for genetic recombination between them. *Virology*. 9:636-648.
- 36) Granoff, A., 1961. Induction of Newcastle disease virus mutants with nitrous acid. *Virology*. 3:402-408.
- 37) Granoff, A., 1962. Heterozygosis and phenotypic mixing with Newcastle disease virus. *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 17:319-326.
- 38) Granoff, A., 1964. Nature of the Newcastle disease virus population. In *Newcastle disease virus: An evolving pathogen*. Edited by R. P. Hanson. Univ. Wisconsin Press. Madison. 107-118.
- 39) Haig, D. A., Dankin, D., and Wimmill, A., 1962. Studies on an adjuvant Newcastle disease vaccine. *Res. Vet. Sci.* 3:236-244.
- 40) Hanson, R. P., and Brandly, C. A., 1955. Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. *Science* 122:156-157.
- 41) Hanson, R. P., E. Upton., G. A. Brandly., and N. S. Winslow., 1949. Heat stability of hemagglutinin of various strains of Newcastle disease virus. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 70:283-287.

- 42) Hirst, G. K., 1941. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*. 94:22-23.
- 43) Hirst, G. K., and E. G. Pickels., 1942. A method for the titration of influenza hemagglutininations and influenza antibodies with the aid of a Photoeffective densitometer. *J. Immunol.* 45:273-280.
- 44) Hitchner, S. B., and E. P. Johnson., 1948; A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease (Avian Pneumoencephalitis). *Vet. Med.* 43:525-530.
- 45) Hofstad, M. S., Picken, J. C., Collins, K. E. and Yoder, H. W. Jr., 1963. Immunogenicity of inactivated Newcastle disease virus preparation. *Avian disease.* 7:435-445.
- 46) Johnson, C. F., and A. D. Scott., 1964. Cytological studies of Newcastle disease virus (NDV) in HEp-2 cells. *Proc. Soc. Exptl. Biol. N. Y.* 115:281-286.
- 47) Jungherr, E. L., 1964. Pathogenicity of Newcastle disease virus for chicken. In *Newcastle disease virus: An evolving pathogen.* Edited by R. P. Hanson. Univ. Wisconsin Press, Madison. 257-276.
- 48) Jungherr, E. L., and F. S. Markham., 1962. Relationship between a Puerto Rican epizootic and the B-1 strain of Newcastle disease virus. *Poult. Sci.* 41:522-528.

- 49) Jungherr, E. L., E. E. Tyzzer, C. A. Brandly, and H. E. Moses., 1946. The comparative pathology of fowl plaque and Newcastle disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 7:250-288.
- 50) Karzon, D. T., and F. B. Bang., 1951. The pathogenesis of infection with a virulent (CG 179) and an avirulent (B) strain of Newcastle disease virus in the chicken. *J. Exptl. Med.* 93:267-284.
- 51) Kawamura, A., 1966. Fluorescent antibody technique. *Protein Nucleicacid and Enzyme.* 11:1621-1634.
- 52) Kawamura, H., S. Isogai., and H. Tsubahara., 1961. Propagation of avian infectious bronchitis virus in chicken kidney tissue culture. *Nat. Inst. Anim. Health. Quart.* 1:190-198.
- 53) Keeble, S. A., and Coid, C. R., 1962. Duration of immunity against Newcastle disease in chicks vaccinated with Betapropiolactone inactivated vaccine. *Vet. Rec.* 74:1112.
- 54) Kohn. A., and P. Fuchs., 1969. Cell fusion by various strains of Newcastle disease virus and their virulence. *J. Virology.* 3:539-540.
- 55) Komorou, A., and L. Goldsmit., 1947. The use of live viruses in Palestine for the vaccination of poultry against Newcastle disease. *Cornell Vet.* 37:368-372.

56. Lancaster, J. E., 1964. Newcastle disease-control by vaccination. *Vet. Bullentin.* 34:57-76.
- 57) Levine, E. E., 1964. World dissemination of Newcastle disease. In *Newcastle disease virus: An evolving pathogen.* Edited by R. P. Hanson. Univ. Wisconsin. Press. Madison. 65-69.
- 58) Liu, C., and F.B. Bang., 1953. An analysis of the difference between a destructive and a vaccine strain of NDV(Newcastle disease virus)in the chick embryo *J. Immunol.*, 70:538-548
- 59) LoGrippo, G. A., and Hartman, F. W., 1955. Antigenicity of Betapropiolactone inactivated virus vaccine. *J. Immunol.* 75:123-128.
- 60) Minard, E. L., and E. L. Jungherr., 1949. Neutralization test with avian pneumoencephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 5:154-157.
- 61) Nakamura, J., S. Oyama., K. Fukusho, and N. Tomonaga., 1933. Vergleichende immunbiologische Untersuchungen des Korea-Hiihnerseuchenvirus und des zapanischen Gefliigel-pestvirus. Zugleich iiber die Beziehung Zum. *J. Japan. Soc. Vet. Sci.* 12:135-145.
- 62) Oh, J. O., 1961. Newcastle disease virus (NDV) in tissue cultures of rabbit corneal endothelium: Viral multiplication and cytopathogenicity. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 42:424-432.

- 63) Piercy, S. E., Macleod, A. J., and Blaxland, J. D., 1964. Duration of immunity trials with Betapropiolactone inactivated Newcastle disease virus vaccines. Vet. Rec. 76:1084-1088.
- 64) Poultry Disease Subcommittee., 1963. Methods of the examination of poultry biologics. 2nd Edition, National Academy Sciences, Washington, D.C. 35-59.
- 65) Prince, A. M., and H. S. Ginsberg., 1957. Immunohistochemical studies on the interaction between Ehrlich Ascites Tumor Cells and Newcastle disease virus. J. Exptl. Med. 105:177-189.
- 66) Rodriguez, J. E., and W. Henle., 1964. Studies on persistent infections of tissue cultures. V. The initial stages of infection of L(MCN) cells by Newcastle disease virus. J. Exptl. Med. 119:895-923.
- 67) Sainte-Marie, G., 1962. A paraffin embedding technique for study of immunofluorescence. J. Histchem. and Cytochem. 10:250-256.
- 68) Schloer, G. M., and R. P. Hanson., 1968a. Relationship of plaque size and virulence for chicken of 14 representative Newcastle disease virus strains. J. Virology. 2:40-47.
- 69) Schloer, G., and R. P. Hanson., 1968b. Plaque morphology of Newcastle disease virus as influenced by cell type and environmental factors. Am. J. Vet. Res. 29:883-895.

- 70) Schloer, G. M., 1964. Characteristics of 2 plaque type of Herts strain of Newcastle disease virus. Bact. Proc. 122.
- 71) Sinha, S. K., R. P. Hanson., and C. A. Brandly., 1952. Comparison of the tropisms of six strains of Newcastle disease virus in chicken following aerosol infection. J. Infectious Disease. 91:276-282.
- 72) Stover, D. E., 1942. A filterable virus, the cause of a respiratory-nervous disorder of chicken. Am. J. Vet. Res. 3:207-213.
- 73) Takemoto, K. K., 1966. Plaques mutants of animal viruses. Progr. Med. Virol. 8:314-348.
- 74) Tanaka, N., H. Yamaguchi., and M. Kobayashi., 1959. Histochemical studies on Newcastle disease virus (NDV) by fluorescent antibody technique. I. The virus antigen formation in cultured human cells. Japan. J. Microb. 3:345-353.
- 75) Thiry, L., 1963. Chemical mutagenesis of Newcastle disease virus. Virology. 19:225-236.
- 76) Thiry, L., 1964. Some properties of chemically induced small-plaque mutant of Newcastle disease virus. Virology 24:146-154.

- 77) Thompson, O. H., Jr. and Osteen, O. L., 1952.
Immunological and Pathological findings on a highly virulent strain of Newcastle disease virus from Mexico. *Am. J. Vet. Res.* 13:407-416.
- 78) Vadlamudi, S., and R. P. Hanson., 1966. Invasion of the brain of chicken by Newcastle disease virus. *Avian Disease.* 10:122-127.
- 79) VanRockel, H., F. G. Spering, K. L. Bulls., and O. M. Olesiuk., 1948. Immuization of chicken against Newcastle disease. *J.A.V.M.A.*, 112:131-132.
- 80) Wheelock, E. F., and I. Tamm., 1961. Enumeration of cell-infecting particles of Newcastle disease virus by the fluorescent antibody technique. *J. Exptl. Med.* 113:301-317.
- 81) Winslow, N. S., R. P. Hanson., E. Upton., and C. A. Brandly., 1950. Agglutination of mammalian erythrocytes by Newcastle disease virus. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 74:174-178.