

氏名 (本籍)	吉村 政雄 (千葉県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙 第 30 号
学位授与の日付	昭和 45 年 11 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	ニューカッスル病に関する研究一特に 1967 年を中心として最近 3 ケ年間の流行例より分離されたウイルス株の生物学的諸性状について一
論文審査委員	(主審) 教授 今井 信実 (副査) 教授 越智 勇一 教授 斉藤 保二

論文内容の要旨

NDVは鶏に与える病原性が変化に富んでいる事と、他の生物学的性状も多様性を有する事が知られている。NDVが初めて認められたのは、高度に伝播力を有し、かつ極めて致死率の高いアジア型ウイルスによる症例からである。後に鶏の age factor 等によって症状に差を示す中等度のウイルスによる症例がアメリカにおいて見出された。さらに極く軽度の呼吸器症状を示した例から分離された殆ど病原性をかくウイルスの存在が血清学的調査によって知られるに至った。この種々な病原性について分別が試みられ、現在では3つの型に分けられている。すなわち、velogenic type, mesogenic type および lentogenic type である。この病原性の他に、NDVは鶏赤血球を凝集する性状を有し、さらに、この凝集能は他種動物の赤血球に対しても認められ、この性状は 56°C 加温によって、その消長が左右されることが知られている。

NDVは、CKおよびCEにブラックを産生するとみられる。CEブラック集団には形態およびサイズに多様性があり、CEのブラック集団のサイズにウイルスの病原性を相対的に関連づける傾向がある事が知られている。ただし、この性状は絶対的ではない様である。

NDが認定されてより、日本における本病に関する知見は多い。その知られている各NDの症例から、中村の佐藤株(1933)から、清水らの石井株(1964)にみられる様にすでに3種の病原性を示すNDVの存在が認められている。

本論文は1967年を中心として最近3ケ年の流行例より分離した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知見の概要を報告したものである。

9株は局地的な比較的軽度な流行例より分離された1株(I₍₁₎株)、強度な病勢を示して、連続して発生した諸例より分離された8株(I₍₂₎-I₍₉₎株)から各々成っている。尚I₍₈₎株はウズラでの発生例より分離された株である。

各分離株について、感受性鶏に対する病原性試験の結果および鶏胎児に対する致死性から病原指数を求め、それらによって各株の病原性を分別した。すなわち2日令雛の脳内接種によって得られたICPI、8週令および30週令鶏の静脈内接種によって得られたIVPI、および鶏胎児にみられたMDTから分離ウイルスは、mesogenic type 1株(I₍₁₎株)およびvelogenic type 8株(I₍₂₎-I₍₉₎株)に分けられた。この両タイプ・ウイルスの鶏に対する態度は本質的に異なる相がみとめられた。すなわち、I₍₁₎株の病原性

は鶏の age factor および接種ルートによって著明に左右されたが、I₍₂₎₋₍₉₎ 株の病原性は、この様な諸因子にかかわらず、常にその強度な病原性は不変であったことである。ウズラより分離されたI₍₆₎ 株の鶏に示した病原指数は他の諸株I₍₂₎₋₍₉₎ 株、および佐藤株とほぼ同様の値を示した。各分離株の鶏胎児に対する病原性はMLD 6.0~7.0 (Log₁₀) におけるMTDによって判定された。得られた値による分離株の鶏胎児に対する病原性は、鶏に示した病原性にほぼ比例した。

しかし乍ら、各分離株について対照ウイルスも含めて行なった Hr および mam HA の性状は各々の病原性とは全く比例しなかった。I₍₇₎ 株が Hr⁽⁺⁾ および mam HA⁽⁺⁾ を示したのみで他株は全て Hr⁽⁻⁾ および mam HA⁽⁻⁾ であった。反面、用いた対照ウイルスについて、弱毒石井株のみが Hr⁽⁺⁾ および mam HA⁽⁺⁾ を示し、B₁ および佐藤株は Hr. mam HA とともに (-) であった。この様な知見から、Hr および mam HA は病原性とは比例せず、I₍₂₎₋₍₉₎ 株の如き同程度の病原性を示す株間でもNDVの株固有性とおもわれる多様性の存在が認められ、疫学的に同一と思われる時期にも性質の異なるウイルスの存在がうかがわれた。

各分離株はCEにブラックを産生する。その得られたブラック集団には広範囲な Size-variation がみられ、その集団の中から最少ブラック (S) および最大ブラック (L) の各々1個を対象としてクローニングを行なった。クローン・ウイルスによって産生されるブラック集団は、優勢的にその由来するサイズが産生され、これらについての統計学的検索では有意差がみとめられた。

各分離株よりクローン・ウイルスについてICPI, IVPI, MDT, Hr および mam HA を検索した。

クローン・ウイルスのICPIは各々の原株の病原性によって異なる価を示した。すなわち、mesogenic type よりのLクローン・ウイルスではI₍₁₎ 原株と等しいランクに入る価を示したが、I₍₁₎ S-クローン・ウイルスは極度に病原性が低下し、lentogenic type に入る性状であった。さらにIVPIでも同様でI₍₁₎ L-クローン・ウイルスは中間毒型のレベルに位置する事を示し、反面I₍₁₎ S-クローン・ウイルスは全く病原性を消失しており、比較的感受性の高い8週令鶏へ、IN投与しても全く症状を発現する事なく、2週間後には高度に抗体産生をみた。この事からI₍₁₎ Sの生ワクチン・ウイルスとしての可能性も見出しうる様であった。

強毒分離株であるI₍₂₎₋₍₉₎ 株のクローン・ウイルスは、S-クローン・ウイルスもL-クローン・ウイルスもともにICPI および IVPI は全く差が認められず各々の原株と変りない値を示した。各原株においてICPI および IVPI とほぼ比例した値がみられたMDTについて、I₍₂₎₋₍₉₎ 株からの各クローン・ウイルスにみられた値は、殆ど原株と変りなくクローンに伴う病原性の減少は認められなかった。I₍₁₎ S-クローン・ウイルスのMDTはMLD 4.7 で80時間を要し、この面からも病原性の衰退が強調された。

クローンに伴って病原性に著変のみられたI₍₁₎ S-クローン・ウイルスと、原株と差のみられなかったI₍₂₎ S-クローン・ウイルスとを用いて、鶏体内での分布試験を試みた。I₍₁₎ S-クローン・ウイルスは、各臓器に極めて一過性に認められるのみであったが、I₍₂₎ S-クローン・ウイルスでは、その原株と殆ど変りない消長を示した。

各クローン・ウイルスについて Hr および mam HA を測定した。I₍₇₎ 原株でみられた Hr⁽⁺⁾ および mam HA⁽⁺⁾ は比較上病原性の劣るI₍₇₎ S-クローン・ウイルスに保持されていた。I₍₇₎ L-クローン・ウイルスの Hr 性は加温5分で消失し、mam HA も全供試赤血球について (-) であった。

I₍₁₎ S および L-クロン・ウイルスも含めて、他の I₍₂₎₋₍₉₎ 株よりのクロン・ウイルスの Hr および mam HA は原株と等しい性状であって、ともに (-) の性状を示した。

以上を要するに今回、野外の流行時に分離し得たウイルス株を、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、夫々の分離株よりクローニングによっ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おい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うち、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変化があり、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ウイルスの流行が優勢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った。尚病原性とその他の生物学的性状、例えばブラック・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も明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

ニューカッスル病 (Newcastle disease) は鶏その他近縁の家禽に対して異常な伝染力を発揮し、時に不測の大害を与える関係上養鶏業にとっては最も警戒すべき伝染病の一つと見られる。すでに 1927 年本病が英国の Doyle により報告されて以来、世界各国においてその発生に関する報告が相次いで見受けられ、本病の原因、診断、免疫、予防などに関する事項は徹底的に研究されて今日に至った。その結果病原ウイルスの性状の解明と共にワクチン創製についても極めて精確、かつ有効な情報を提供しつつある次第である。著者は、たまたま本病が 1967 年を中心としてその前後 3 年間に突発的に本邦において大流行するのに遭遇し、その病原として 9 株のウイルスを分離検出し、これらにつきその病原性の程度、或いはその他の主要な生物学的性状を比較検討し、新発見に相当する業績を報告することになった。

本研究における手法の要点は次の通りである。

1. 供試ウイルスの由来

本病の流行における感染鶏や感染ウズラの剖検時にウイルスを分離する手段として、発育卵 (鶏胎児) への可検材料接種に着手した。このようにして得たウイルス株を 9 株とし、ほかに在来の保存株を比較対照の目的に供試した。これら全供試ウイルスの名称は次の通りである。

分離株: I₍₁₎, I₍₂₎, I₍₃₎, I₍₄₎, I₍₅₎, I₍₆₎, I₍₇₎, I₍₈₎, I₍₉₎ (I は Isolate の略号)

対照株: 佐藤, 石井, B₁, TCND.

2. 各ウイルスの病原性 (毒力) の判定法

2 日令びなにおける脳内接種病原指数 (ICPI), 8 週令鶏および 30 週令鶏における静脈内接種病原指数 (IVPI) を測定し、さらに発育卵 (9~11 日令) への接種によって平均死亡時間 (MDT) を測定した。ただし何れの場合にも接種材料は感染鶏胎児材料であって、特に MDT の測定は $MLD = 6.0 \sim 7.0$ ($-\log_{10}$ 値) における MDT を求めている。なお鶏はもっぱら白色レグホン系のものである。ウイルス材料の保存法は一般に行われている通りである。

3. 感染鶏体内における接種ウイルスの分布の検索には、蛍光抗体法を応用した。

4. 分離ウイルス株の赤血球凝集能の検定法、および耐熱性の測定法。

NDV (ニューカッスル病ウイルス) は一般に赤血球凝集能を有するが、特に今回の分離株のうちに、鶏赤血球のほかにも哺乳動物赤血球凝集能 (mam HA) を有するものが発見されるのではないかを目的として、各動物の血液を供試していわゆる HA test を実施した。一方、耐熱性は 56°C 加熱などにおけるウイルス不活化の時間の測定によりその程度を判定した。

5. 分離ウイルス株の組織培養法

培養細胞の種類は鶏胎児細胞 (CE) 或いは鶏腎細胞 (CK) を意味するが、CE を使用する場合が多かった。

6. 分離ウイルス株のブラック (plaque) 形成能の観察

いわゆるブラック法によって發育したブラックの大きさ、色調などの観察を行なった。その結果、直径の大なる L ブラックと小なる S ブラックとを検出できる。

7. 分離ウイルス株のクローニング (cloning)

クローニングによって得た L-, S-両クローンウイルスにつき、改めて原株との間における病原性、その他の諸性状を比較観察した。

以上、各項における実験材料および手技を応用して得た実験成績は次の通りである。

I 分離ウイルス各株の病原性の程度

前記の病原性 (毒力) の測定法によって判明した所見として今回の NDV 各分離株には次のような種別を見た。

I₍₁₎ 株……中間毒型 (mesogenic type) に相当する。

I₍₂₎ から I₍₉₎ までの計 8 株……強毒型 (velogenic type) に相当する。

しかもこの差異の意味するところは、これら両毒型の NDV 各株が鶏に対して本質的に異なる態度を示すという事実であった。すなわち I₍₁₎ 株の病原性は鶏の age factor ならびにウイルス接種部位 (経鼻または筋肉内) によって著明に左右されたが、I₍₂₎~I₍₉₎ の各株は、このような諸因子にかかわらず常にその強度な病原性を不変に維持していたことである。なお強毒型ウイルスのうちで、ウズラ由来の I₍₆₎ 株の鶏に示した病原指数は他の強毒型株および対照の佐藤株とほぼ同程度の値を示した。また一般に何れのウイルス株も、鶏胎児に対する毒力と鶏に対する毒力とがほぼ比例することを示していた。

II 分離ウイルス各株の熱抵抗性 (Hr) および哺乳動物赤血球凝集能 (mam HA)

各分離株につき、対照株と共に試験した Hr および mam HA は各株の病原性とは決して比例してはいなかった。すなわち I₍₇₎ 株のみが Hr⁽⁺⁾ (耐熱性) および mam HA⁽⁺⁾ (哺乳動物赤血球凝集能あり) を示しただけであり、他の分離株はすべて Hr⁽⁻⁾ および mam HA⁽⁻⁾ であった。反面、対照ウイルス株のうち弱毒型 (lentogenic type) に属する石井株だけが Hr⁽⁺⁾ および mam HA⁽⁺⁾ を示し、B₁ 株 (弱毒型) と佐藤株 (強毒型) とは Hr⁽⁻⁾ および mam HA⁽⁻⁾ であることが判明した。

これらの所見より、Hr と mam HA という 2 つの性状は当該株の病原性には比例しておらず、I₍₂₎~I₍₉₎ の諸株のように同程度 (強毒型) の病原性を示すもの間にも NDV の株固有性と見られる生物学的多様性 (biological multiplicity) の存在が見受けられ、また疫学的には発病の時期が共通していると見られる時期でも、性状を異にするウイルスの存在が確認された。

Ⅲ 分離ウイルス各株のブラック (plaque) 産生能ならびにクロン・ウイルス (cloned virus) の性状について

今回のNDV各分離株はCE (鶏胎児細胞培養) にブラックを産生した。しかもこれらブラック集団の大きさ (size) には広範囲の変動が見られた。これら集団の中から最小ブラック (S) と最大ブラック (L) の各1個を対象としてクローニング (cloning) を試みた。その結果これらクロンウイルスによって産生されるブラック集団では、それぞれその由来するサイズのブラックが優勢に検出され、統計的にも有意の産を示した。そこでこれら各分離原株由来のクロンウイルスについて、改めてICPI, IVP, MDT, Hrおよびmam HAを検討した。その成績は次の通りであった。

A クロンウイルスのICPI, IVP, MDTにて示される病原性の強さ

1. I₍₁₎ 株由来クロンウイルスの毒力

クロンウイルスのICPIは各クロンウイルスの由来する原株の病原性によって異なる値を示した。すなわち中間毒型株からのクロンウイルスでは、I₍₁₎ 原株と等しいランクに入る値を示したが、I₍₁₎ S-クロンウイルスは極度に毒力が低下し、弱毒型に属すべき性状を示した。さらにICPIでも同様な傾向を認め、I₍₁₎ L-クロンウイルスは中間毒型のレベルに位置することがわかり、反面I₍₁₎ のSクロンウイルスは全く病原性を消失しており従って比較的感受性の高い8週令鶏にこのSクロンウイルスを経鼻 (IN) 投与しても全く感染の症状を発現することなく、却って2週間後にはその接種したI₍₁₎ Sクロンウイルスによって高度の抗体産生を招来することが判明した。この事実は、明らかにI₍₁₎ Sクロンウイルスなるものをニューカッスル病の生ワクチン用ウイルスに応用できる可能性を示唆した。

2. I₍₂₎~I₍₉₎ の各分離ウイルス株由来のS-クロンウイルスおよびL-クロンウイルスの毒力

強毒型分離株であるI₍₂₎~I₍₉₎ に由来するそれぞれのS-およびL-クロンウイルスにつきICPIおよびIVPを測定したところ、これらのクロンウイルスの間には全く差は見られず、またこれらクロンウイルスの値は原株のそれとほとんど一致していた。各原株においてICPIおよびIVPとほぼ比例した値を示したMDTについては、I₍₂₎~I₍₉₎ 各原株に由来する各クロンウイルスの示したMDTはほとんど原株と変りなく、従ってクローニングに伴なう病原性の減少は認められなかった。しかるにI₍₁₎ 原株に由来するI₍₁₎ S-クロンウイルスのMDTはMLD=4.7 (-log₁₀ 値) において80時間に相当し、従ってこの面からも明らかに病原性の衰退を示していた。

3. I₍₁₎ 原株とI₍₂₎ 原株とからクローニングによって生じたS-各クロンウイルスを使用して検討したその体内分布

すでに前述の通りクローニングに伴なう病原性に著しい減少を示したI₍₁₎ S-クロンウイルスと、一方では原株との間に病原性の差を示さなかったI₍₂₎ S-クロンウイルスとを使用して、鶏体に感染実験を行ない、その体内でのウイルスの分布状態を観察した結果、I₍₁₎ S-クロンウイルスは各臓器に極めて一過性にしか検出されるに過ぎなかったが、I₍₂₎ S-クロンウイルスはその原株とほとんど変りない消長を示すことがわかった。

B 各クロンウイルスにおける熱抵抗性 (Hr) および哺乳動物赤血球凝集能 (mam HA)

I₍₁₎ 原株の示したHr⁽⁺⁾ (すなわち耐熱性) およびmam HA⁽⁺⁾ (すなわち哺乳動物赤血球凝集能あり) は、I₍₁₎ S-クロンウイルスにも保持されていることが判明した。しかしI₍₁₎ L-クロンウイルスの

方は加温 5 分で Hr を失い、mam HA も全供試赤血球に対して (-) であった。

このような I₍₇₎ 株由来のクロンウイルス以外の I₍₂₎~I₍₉₎ 各原株からのクロンウイルスでは、前述の I₍₁₎ S-クロンウイルスおよび I₍₁₎ L-クロンウイルスと共にそれぞれの Hr および mam HA は原株に一致する傾向が見られ、何れも (-) であった。

以上の所見に徴して、著者の遭遇したニューカッスル病の症例から分離されたウイルス株は、その主要性状としての病原性、ブラック形成能 および哺乳動物赤血球凝集能、耐熱性などの事項について比較検討され、さらにまたそれぞれの分離株からのクローニングによって得られたクロンウイルスの諸性状も比較観察された結果、野外の流行初期の分離株と、それ以後の分離諸株との間には病原性において著明な差異の見られたこと (すなわち中間毒型ウイルスと強毒型ウイルスとの出現の意)、またそれぞれの分離株からクローニングにより得られたクロンウイルスのうち、流行初期の分離株由来のクロンウイルスにおいては、中間毒型株由来のクロンウイルスのうちには小型のブラック形成が見られ、このものは原ウイルスに比して病原性が一層減弱している事実が判明した。

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変化が生じ、流行初期に認められる毒力の比較的弱いものは次第に選択的に減少して強毒型ウイルスの流行が優勢化する傾向を指向し、さらに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が認められ、これらがクローニングによりさらに分離系統化されるという事実を意味している。なお、分離ウイルス各株の病原性と、その他の性状例えばブラックサイズ、耐熱性、哺乳動物赤血球凝集能の有無などとの間には必ずし平行関係のないことも明らかにされた。

斯くして本研究の意義としてはニューカッスル病ウイルスの多様性を強調した点は単に学術上の興味に留まらず、実地上本病の予防免疫の対策樹立の上にも寄与する公算が少なくなく、獣医学博士の学位を受けるに値するものと評する。