

氏名(本籍)	五十嵐 義輝 (東京都)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙 第 11 号
学位授与の日付	昭和 42 年 12 月 20 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	EXPERIMENTAL STUDIES ON NEWCASTLE DISEASE VACCINE—The Effect of Vaccine Prepared from the Virus Inactivated with Beta-propiolactone and Adsorbed on Aluminium Phosphate Gel (ニューカッスル病ワクチンに関する研究—特に Beta-propiolactone 不活化ならびに磷酸 アルミニウムゲル添加による ワクチンの効力について)
論文審査委員	(主査) 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

ニューカッスル病ワクチンに関しては、本病が1つの独立した疾病として認められて以来、生ワクチン、不活化ワクチンともほぼ同時期に開発され、今日まで種々研究れされている。両者の長短を比較するにはまだ数多くの難点があるが、従来生ワクチンの長所と云われてきた点は、免疫力が強く持続性の長いこと、投与法に容易さのあること、および米国やその他の諸国で長年余に亘って使用されてきているので有効であるらしい、などの点である。しかし生ワクチンの免疫力の強さや持続性の長いことは、病原性の mild なウイルス株 (lentogenic strain) から作成された場合にのみあてはまり、逆にこのような mild な株ではワクチン接種それ自身で発病するものがみられたり、他のニワトリへ病気を伝播することが知られている。また投与法についても、飲水法やエロゾール法のように水に溶かして投与する場合、ニワトリ個体による投与法の不確実性など、使用に際して最大の注意が払われなければならないし、このような方法で投与された場合、ワクチンウイルスの気道感染によって CRD (Chronic respiratory disease) など、他の呼吸器疾患を誘発する可能性もある。さらに生ワクチンの場合、ワクチン材料中に迷入した他の病原体をワクチン自身が伝播する危険性もある。またニューカッスル病ウイルスは元来、変異性の顕著なるものであるため、生ワクチンに用いられている弱毒ウイルスがその病原性を復帰しえないと云う保証がない。以上の点を不活化ワクチンの場合にあてはめてみると、不活化ワクチンでも使用法が適切であれば、差がみられないし、何よりも安全であると云う点である。すなわちニワトリの age に関係なく使用でき、接種によってワクチンそれ自身による感染を起したり、その感染を他のニワトリに伝播させる危険性もないし、ワクチン材料中に含まれる可能性のある他の病原体を伝播することもない。さらに不活化ワクチンは個体別に接種されるため、接種量が厳格に規定でき、また筋肉内注射によることが多いため、CRD その他の気道感染症を誘発することもない。

不活化ニューカッスル病ワクチンについては、本病が独立した疾病であることが認められて以来、種々研

究され、いろいろなタイプのワクチンが作成されている。不活化剤としては、クリスタル・ビオレット、紫外線の照射、ホルマリンなどが主として用いられてきたが、1955年 Hartman らによって β -Propiolactone にウイルス不活化作用が報告されて以来、種々のウイルスの不活化に応用され、ニューカッスル病ワクチンでは、Mack および Chotisen (1955) によって始めて応用され、以来多くの研究者によって BPL によるニューカッスル病ウイルスの不活化について検討されてきている。BPL は短時間で完全な不活化ができること、不活化は広い PH 域内で行うことができ、さらに残余 BPL はすみやかに加水分解して β -oxy-Propionic acid となり不活化作用が失われるため、残余 BPL による抗原性の損失を防ぐことができる。などの利点があり、これらの点はすべて不活化ウイルスワクチン作成のために好適である。また BPL は、ホルマリンや石炭酸のごとき蛋白変性剤とは異り、ウイルス粒子の外被蛋白に対する作用が弱いため、抗原性蛋白はほとんど変化のないままに保持され、高度の抗原性を有するワクチンの作成が可能であると云われている。日本に於ては不活化ワクチンの作成に不活化剤として BPL を使用した報告は少く、わずかに狂犬病ワクチンの試作および日本脳炎ワクチンの不活化実験にホルマリンなどとの比較実験に使用されているにすぎず、いずれもまだ実用の域に達していない。

著者は不活化剤として BPL を使用し、アジュバントとして、磷酸アルミニウムゲルを使用したワクチンを作成して、以下のごとき種々の実験を試みた。

すなわちニューカッスル病ウイルス (NDV) 佐藤株に感染した鶏胎児の 30% PBS 乳剤にその感染漿尿液を加えて遠心した上清をウイルス材料とした。これに対する BPL の不活化作用をしらべるとともに、アジュバントとしての磷酸アルミニウムゲルの作用を検討し、さらにこのようにして作成されたワクチンの抗原性、ニワトリに接種した場合の免疫原性、免疫の持続期間、安全性、およびこのワクチンの保存性について検討した。

NDV の不活化に必要な BPL の最少有効濃度は 37°C および 4°C 24 時間の不活化で、いずれの場合にも 0.025% であった。4°C 不活化の場合最少濃度が 0.1% 以下であれば赤血球凝集素に対する影響はみられなかった。このような不活化はウイルス材料の pH が 6.0~8.0 の範囲内であれば、37°C、4°C の場合とも、ほとんど差がみられなかったが、用いるウイルス材料により差がみられた。すなわち 30% ニワトリ胎児乳剤、それに漿尿液を加えたもの、および精製ウイルスの場合には不活化が容易に行われるが、漿尿液のみの場合、0.1% 以下の BPL 濃度では不完全であった。なお、0.25% 以上の BPL 濃度では抗原性が損われるため、安全な濃度域は 0.05~0.1% と考えられる。

ウイルスの磷酸アルミニウムゲルの吸着は、ゲル濃度に比例して高まり、ゲル濃度が 10~20% では 50%、30% では 75%、40~60% では 87.5%、および 70% 以上では 100% のウイルスが吸着することが認められ、ワクチンの免疫能を増強することが解った。さらにホルマリン不活化したウイルス材料と BPL 不活化したウイルス材料について、磷酸アルミニウムゲルを添加したものと、添加しないものとをニワトリに接種して、その感染防禦能を比較したところ、BPL 不活化—磷酸アルミニウムゲル添加ワクチンを接種した場合には 100%、ホルマリン不活化—磷酸アルミニウムゲル添加ワクチンでは 80% の防禦率がみられた。それに対し、ゲルを添加しなかった場合にはいずれも 60% の防禦率を示した。このことから BPL 不活化の場合でも、ホルマリン不活化の場合でも、磷酸アルミニウムゲルのアジュバント効果が認められた。さらにこの結果から BPL 不活化の方が、ホルマリン不活化したものよりも免疫原性の強いことが認められた。

また磷酸アルミニウムゲルは、水酸化アルミニウムゲルよりもアジュバント効果が強く、油性アジュバント (Freund の不完全アジュバント) とはほぼ同程度であった。

上記のごとく BPL で不活化し、アジュバントとして磷酸アルミニウムゲルを添加したニューカッスル病ワクチンの免疫発現時期はヒナでは 10 日前後、成鶏では 2 週間前後であり、このワクチンの 1 回接種によって、少なくとも 7 ヶ月間の感染防禦能が認められ、中和抗体は少なくとも 9 ヶ月間残存した。

100 ml づつバイアルびんに分注して 4°C および 37°C 保存したワクチンをふ化 3 ヶ月令のニワトリに接種したところ、4°C で 14 ヶ月保存したものでは 100% の防禦率が認められ、17 ヶ月保存したものではわずかに抗原性が損われたが、防禦能は充分認められた。37°C 保存したものでは少なくとも 21 日間は感染防禦能が認められた。また磷酸アルミニウムゲルを添加しないワクチンでは 37°C で 1 週間の保存でも効力が認められなかったところから、磷酸アルミニウムゲルはアジュバント効果のみならず、保存中の抗原性の保護作用のあることも認められた。

このワクチンをニワトリに接種し、臨床所見を観察したが、何らの異常を認めなかった。また産卵中の雌鶏に接種して 1 ヶ月産卵率を観察したが、ワクチン接種によると思われるような産卵に対する影響は認められなかった。

以上の結果から、0.05% BPL で、30% 感染鶏胎児乳剤およびその漿尿液の遠心上清を不活化し、50% に磷酸アルミニウムゲルを添加したワクチンは、安全であり、保存有効期間も長く、良好な免疫力を賦与するワクチンであることが証明された。

論文審査の結果の要旨

近年、養鶏業の急激な振興に伴なって本邦における鶏に各種伝染病、特にニューカッスル病 (Newcastle disease) の発生が増加の一途をたどり、これが防疫対策に関しては政府、民間を挙げて鋭意考究中であり、その一つとして有効な予防液 (ワクチン) による予防接種の実施に待つこと今日ほど緊急な事態に立ち至ったことはないと言っても過言ではない。著者はこの点に思いを致し、もっとも安全にして、しかも強固な長期免疫を賦与するためには、生ウイルス (弱毒化せる) ワクチンと不活化ワクチンとの 2 種類のうち、接種方法の確実性、抗原の吸収性、ワクチンの保存耐久力などの観点からむしろ後者を第一義的なものと思われ、主題のような研究に着手し、極めて優秀なワクチンの創製に成功したものである。

本研究の骨子としては、ニューカッスル病ウイルス (以下 NDV と略記) の不活化剤として Beta-Propiolactone (以下 BPL と略記) を使用し、ウイルス材料としては感染鶏胚ならびに漿尿液を供し、さらにアジュバントとして磷酸アルミニウムゲル (以下 AIPO₄ ゲルと略記) を使用して、その結果安定性を有する強力な免疫効果を発揮するニューカッスル病ワクチンの製法を確立し、本ワクチンの実地応用価値を主張したものである。以下、研究計画を記載する。

I BPL による NDV 不活化に関する試験

1. NDV 不活化に要する BPL 濃度決定
2. BPL 不活化作用に及ぼす pH の影響
3. HA 価 (ウイルスの鶏赤血球凝集価) に及ぼす BPL の影響
4. BPL 不活化作用に及ぼす NDV 材料の影響

II AIPO₄ ゲルによる NDV 吸着ならびにアジュバント作用に関する試験

1. AIPO₄ ゲルによる NDV 吸着試験
2. AIPO₄ ゲルのアジュバント作用の試験

III BPL 不活化ならびに AIPO₄ ゲル添加ワクチンの効力検定に関する試験

1. NDV の抗原性維持に要する BPL の濃度決定
2. ワクチンの含有するウイルス容量と免疫原性との関係
3. 免疫成立に要する期間ならびに免疫持続期間
4. ワクチンの効力保存期間
5. ワクチンの安全性

以上の実験計画を遂行するためには次の通りの材料ならびに試験方法を考案した。

◎供試ウイルス (NDV)：ニューカッスル病ウイルス (NDV) の佐藤株を鶏胚 (chick embryo) に感染継代したもの。すなわち種子ウイルス (seed virus) としては感染鶏胚の尿液 (allantoic fluid) を -70°C に保存しといたもの。

◎Beta-Propiolactone (BPL)：市販の BPL (東京化成工業会社製) を -20°C に保存しといたもの。使用に際しては毎常この原液を -4°C の冷却滅菌蒸溜水で 10 倍に希釈し、直ちにウイルス材料に添加した。

◎磷酸アルミニウムゲル (AIPO₄ ゲル)：10% 塩化アルミニウム溶液 560 ml に蒸溜水 2,790 ml を添加し、混和後その混合液に徐々に 15.75% 磷酸ソーダ溶液 560 ml を添加し、この 3 者混合液に更に磷酸アルミニウム溶液 560 ml を添加して遠心沈澱させる。かくして全混合液中の AIPO₄ 含有量を算出し、結局 30~40 mg/ml の AIPO₄ ゲル浮遊液を得る。

◎ワクチンの製法：11 日令の發育鶏卵の尿膜腔内に上記 NDV 佐藤株を 10,000 EID₅₀ の量として 0.2 ml 接種し、48~72 時間孵卵器内に保存し、その結果胚の死亡したものを開殻し、胚と尿液とを即刻または 1 夜 4°C の保存後に採取する。のち胚と尿液とを 1 夜凍結しておき、胚のみを 30% 乳剤となし、これに尿液を添加する。ついでこの材料を遠心沈澱させて粗塊を除去し、上清を採取しその中のウイルスを BPL 添加のもとに 4°C において不活化させる。のちこの上清に 50% に AIPO₄ ゲルを添加してワクチンとなす。

◎NDV 含量算定法：前記製剤の有効量の測定には、その 10 進法各稀釈液 1.0 ml をそれぞれ 3 ヶ月令の白色レグホーン鶏に筋肉内接種し、以後 10 日間の観察中に死または生の転帰を認める方法を用いた。また發育鶏卵でのウイルス価 (感染価) 測定には、11 日令の發育中の鶏卵に上記製剤の 10 倍液を尿膜腔内接種し、 36°C の孵卵器に 48 時間保存する方法を取った。すなわち 48 時間後に各卵から尿液を採取し、感染の有無に拘わらずその HA 価を測定した。またその際 50% 感染量を算出した。

◎NDV の不活化が完全か否かの判定方法；上記製剤 0.5 ml を發育鶏卵の尿膜腔内に接種し、 36°C 、72 時間保存後に尿液における HA の出現により判定した。また場合によっては、鶏胚細胞培養に接種して細胞変性効果 (CPE) または細胞液における HA 出現を確認する方法も行なうことにした。

◎ワクチンの効力検定方法：白色レグホーン鶏を 2 週令、3 ヶ月令、5 ヶ月令の 3 群に区別して、各群に 5~10 羽を配し、ワクチン接種後 10~14 日後に NDV の 1,000~10,000 CID₅₀ の量を攻撃し、その後 10~14 日の期間に鶏の生死の程度を確認し、ワクチンの免疫効力の程度を判定することにした。

以上のような材料ならびに試験術式の応用により得られた試験成績として著者は次のように結論づけてい

る。

1. NDV の不活化に必要な BPL の最少有効濃度は、37°C および 4°C に 24 時間の不活化にはいずれの場合にも 0.0025% であった。4°C 不活化の場合最少濃度が 0.1% 以下ならば、赤血球凝集素に対する影響は見られなかった。このような不活化はウイルスの pH が 6.0~8.0 の範囲であれば、37°C と 4°C との場合とも殆ど差が見られなかったが、用いるウイルス材料により差が見られた。すなわち 30% 鶏胚乳剤、それに漿尿液を加えたもの、および精製ウイルスの場合には、不活化が容易に行われるが、漿尿液の場合に 0.1% 以下の BPL 濃度では不活化は不完全であった。なお 0.25% 以上の BPL 濃度では抗原性が損われるため、安全な濃度域は 0.05~0.1% と推定される。

2. NDV への AlPO_4 ゲルの吸着は、ゲル濃度に比例して高まりゲル濃度が 10~20% では 50% 程度に、30% では 75% 程度に、40~60% では 87.5% 程度に、および濃度 70% 以上では 100% のウイルスが吸着することを認め、ワクチンの免疫能を増強することが判明した。またホルマリンにて不活化したウイルス材料と BPL 不活化したウイルス材料とについて、 AlPO_4 ゲル添加したものと添加しないものとの鶏に接種して、その感染防禦能を比較したところ、BPL 不活化ならびに AlPO_4 ゲル添加ワクチンを接種した場合には 100%、ホルマリン不活化ならびに AlPO_4 ゲル添加ワクチンでは 80% の防禦率が見られた。これに反して、ゲルを添加しない場合には何れも 60% の防禦率を示した。この事実から BPL 不活化の場合でも、ホルマリン不活化の場合でも、 AlPO_4 ゲルのアジュバント効果が認められた。さらにこの結果から BPL 不活化の方がホルマリン不活化のワクチンよりも免疫原性の強いことを知った。

3. 上記のように BPL で不活化し、アジュバントとして AlPO_4 ゲルを添加したニューカッスル病ワクチンの免疫発現時期は、「ひな」では 10 日前後、成鶏では 2 週間前後であり、このワクチンの 1 回接種によって少くとも 7 ヶ月間の感染防禦能が認められ、中和抗体は少くとも 9 ヶ月間残存した。

4. 本ワクチンの保存期間決定試験としては、100 ml づつバイアル瓶に分注して 4°C ならびに 37°C に保存した 2 つのワクチンをそれぞれ 3 ヶ月令の鶏に接種したところ、4°C で 14 ヶ月保存したものでは 100% の感染防禦力を発揮し、17 ヶ月保存したものでは僅かに抗原性が失われたが防禦能は充分認められた。なお AlPO_4 ゲルを添加しないワクチンでは 37°C 1 週間の保存でも効力が認められなかったことから、 AlPO_4 ゲルは単にアジュバント効果のみならず保存中の抗原性の保護作用を有することも認められた。

5. 本ワクチンは鶏に接種した場合臨床的には何らの異常を与えずまた産卵中のものに接種しても、1 ヶ月間の産卵率にはワクチン接種によると思われるような産卵に対する影響は認められなかった。

以上の成績を要約すれば、30% 感染鶏胚乳剤およびその漿尿液の遠心上清を 0.05% BPL にて不活化し、50% AlPO_4 ゲルを添加したワクチンは安全であり、保存有効期間も長く、強固な免疫力を賦与するワクチンであることが証明された。

このような極めて綿密周到な試験計画のもとに精細な観察をもって遂行した著者のニューカッスル病ワクチンの開発に関する研究は学術的興味と共に本病防遏への実施応用上に裨益すること頗る大なるものと思われ、獣医学博士の学位を受けるのに充分値いするものと思える。