参考文献

1) BERGER, J. and FRANCIS, J.: *Vet. Rec.*, 63, 283~293 (1951). 2) BURT, A. W.: *J. Dairy Res.*, 24, 283~288 (1957). 3) HOLMES, W.: *J. Dairy Res.*, 23, 1~8 (1956). 4) HOLMES, W.: *J. Dairy Res.*, 27, 91~195 (1960). 5) 飯塚三喜, 米村寿男: *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*, 4, 229~236 (1964). 6) 中村良一: 日獣会誌, 10, 280~289 (1957). 7) 野口一郎, 牛見忠蔵, 臼井和哉, 三村弘行, 青木正義, 池田清作, 北沢昭三郎: 日獣会誌, 11, 75~78 (1958). 8) 太田義夫, 伊藤時哉: 日獣会誌, 10, 526~529 (1957). 9) 柴田 真: 獣畜新報, 438, 9~12 (1967). 10) SHAW, J.C.: *J. Dairy*

Sci., 39, 402~434 (1956).

11) 津郷友吉, 谷口宏吉: 乳業技術講座 1, pp. 1~20, 東京, 朝倉書店 (1969). 12) 渡辺文男, 野本貞夫, 井上 勇: 日獣会誌, 20, 80~85 (1967). 13) 米村寿男, 須川章夫, 本間惣太, 新林恒一, 板底茂男, 小倉幸子, 飯塚三喜, 牛見忠蔵, 小華和 忠, 志賀鑑時: 家畜栄養に関する研究 (3) 139~226, 農林水産技術会議事務局 (1964). 14) 吉田信行, 柴野正雄, 齊藤成美, 長坂隆, 杉浦邦紀, 松原利光, 飯塚三喜, 元井霞子, 頭本昭夫, 橋本裕吉, 中戸川 淳, 小池将夫, 間野君子, 桐沢統, 佐藤二三: 獣畜新報 518, 461~474 (1970). 15) 吉田信行, 飯塚三喜: 畜産の研究, 12, 205~212 (1958).

鶏伝染性喉頭気管炎ウイルスの組織培養

1. ウイルスの減毒および 2, 3 の性状

幸田祐一* 山田進二* 市原 強* 市原鶴雄*

(昭和 46 年 12 月 27 日受付)

Experiment on Infectious Laryngotracheitis (ILT) Virus in Tissue Culture

1. Modification and Some Properties of ILT Virus

Y. KODA, S. YAMADA, T. ICHIHARA and T. ICHIHARA

(Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto 860)

SUMMARY

The NS-175, 1185, and 1358 strains of virulent ILT virus were adapted to monolayers of primary chicken kidney cell cultures. Cultures of chicken embryo fibroblasts, bovine swine and canine kidney cells, and TC, PS and BHK-21 cell (line) were resistant to the cytopathic effect of the 11th passage of the NS-175 strain. The peak titer of the NS-175, 1185, and 1358 strains was $10^{3.5-6.5}$, $10^{3.5-5.5}$, and $10^{3.5-4.7}$ TCID₅₀/0.1ml, respectively in chicken kidney cell

cultures.

Systematic passage of the NS-175 strain in cell cultures resulted in changes in virus characteristics, which were manifested by a significantly decreased virulence of the virus for susceptible chickens. When inoculated ocularly and intranasally, vaccines prepared from the modified virus (99th to 124th passage levels) provided good protection against challenge with virulent virus.

鶏の伝染性喉頭気管炎 (以下 ILT と略) は, 現在世界各国で発生が報告されている^{4,10,11,13,14,15)}。わが国においても, 近畿, 東海, 関東および四国地方で発生が認められた^{8,9)}。

諸外国において, ILT の防疫には生ウイルスワクチンが使用されている。しかしわが国では, これまで本病に対するワクチンの開発はなされておらず, また, 外国製ワクチンはその病原性の強過ぎることにより使用を禁じられていた。

著者らはわが国において使用可能なILT生ウイルスワクチン株の作出を試み, 組織培養法によって弱毒ウイルスを得ることができた。本報告では, ILTウイルスの減毒の経過および継代過程のウイルスの 2, 3 の性状につ

いて報告する。

材料および方法

ウイルス: 家畜衛生試験場より分与されたNS-175株, 大阪家禽試験場より分与された 1,185 および 1,358 株を用いた。

組織培養法: 初代培養細胞として鶏腎 (CK), 鶏胎児 (CE), 牛腎 (BK), 豚腎 (SK) および犬腎 (DK) 細胞, 継代細胞として PS (豚腎由来), TC (鶏胎児由来) および BHK-21 (ハムスター腎由来) 細胞を用いた。培地は増殖用には 10~20% 牛血清加 YL Hanks 液および YL Earle 液, 維持用には 3% 牛血清加 YL Earle 液を用いた。培地にはいずれにもペニシリン 100 u/ml およびストレプトマイシン 100 μg/ml を添加した。

ウイルスの継代および感染価の測定: ウイルスはCK

* 化学及血清療法研究所 (熊本市古京町3-1)

細胞に接種し、2～6日間培養後次代へ継代した。感染価の測定には3～4本のCK細胞を用い、判定はウイルス接種後5～7日目に行なった。感染価 (TCID₅₀) の計算には Reed and Muench 法を用いた。

鶏：1～120日齢の白色レグホン種を用い、接種および対照鶏はそれぞれ独立した鶏舎の育雛器およびケージで飼育した。

ウイルスの接種方法：接種は注射針および点滴器具を用いて、鶏の鼻腔(i.n.)、眼 (i.o.) および気管 (i.t.)内にウイルス液 0.02～0.03 ml 宛滴下、および注射器を用い眼窩下洞 (i.s.)内に 0.1～0.2 ml 宛注射した。1羽当たりのウイルス接種量は $10^{2.7-5.7}$ TCID₅₀ である。接種反応の有無は、10日間毎日観察し、鼻汁、流涙、眼窩下洞の腫脹、奇声および開口呼吸を指標として判定した。

成 績

1. **ILT ウイルスに対する感受性細胞の検討：**ILT ウイルスを諸種の培養細胞に継代するため NS-175 株 CK 細胞継代 11 代ウイルス $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1 ml (以下 $10^{5.5}$ と略) を CE, TC, BK, SK, DK, PS および BHK-21細胞に接種して CPE 出現およびウイルスの増殖の有無について検討した。ウイルス接種初代においては、接種後5～7日目まで CPE はいずれの細胞にも出現しなかった。ウイルス接種後各細胞培養液を経時的にとり出し、ウイルスの存否を確かめたところ、BK 細胞を除く他の細胞培養液には5～7日間接種ウイルスが生存していた。また、ウイルス接種後 CE および DK 細胞の培養液についてウイルス量を測定したところ、CE 細胞では2～6日目 $10^{2.2-3.2}$ 、DK細胞では3～5日目に $10^{2.0-3.2}$ 、の感染価を示したが、ウイルスの増殖は認められなかった。なお、維持用培地に対照として加えられたウイルスは2日目から完全に不活化された。

2. **継代ウイルスの感染価：**ILT ウイルスがCK細胞でのみ増殖することがわかったので減毒のための継代はCK 細胞を用いて行なった。NS-175, 1185 および1358 株の各継代ウイルスは 10～20 代おきに感染価を測定した。その感染価は NS-175 株の3～124代ウイルスでは $10^{3.5-6.5}$ 、1185 株の8～106代では $10^{3.5-5.5}$ および1358 株の3～102代では $10^{3.5-4.74}$ を示した。各株の各継代時の感染価には若干ばらつきが認められた。また、継代を進めることにより、とくに感染価が上昇する傾向は認められなかった。しかし、感染価は株間では若干差があり NS-175 株では 1358 株より高い価が得られた。

3. **ウイルスの増殖曲線：**継代により増殖曲線に差が生ずるか否かを NS-175 株の7および124代継代ウイルスを用いて検討した。各ウイルスを CK 細胞培養試験管当たり $10^{4.3-4.5}$ 接種し、37℃ 1時間吸着後 Hanks 液で3回洗浄した後、維持培地を加えて回転培養した。回転

培養後4～8時間間隔で接種試験管を2～3本宛とり出し、そのまま-50℃で保存した。材料が全部そろってからこれを融解し感染価の測定を行なった。その成績は図1に示す通りである。7代ウイルスは接種後8時間、124代ウイルスは12時間目まで感染価に変動はなかったが、接種後12～16時間目からいずれも急激に感染価が上昇し48時間目に最高に達した。7および124代ウイルスは同じ曲線を描いて増殖し、最高感染価にもほとんど差がなかった。

図1 ウイルスの増殖曲線 (NS-175 株)

4. **ウイルスの耐熱および保存性：**継代に伴って耐熱および保存性に差が生ずるか否かを検討した。NS-175 株の7, 57 および124代ウイルスの組織培養液を2ml 宛分注し、37, 22, 4-20 および -50℃に保存し、その後経時的にこれを取り出しCK 細胞を用いて感染価を測定した。その成績は図2に示すとおりである。37℃ 5

図2 耐熱および保存試験

表1 CK細胞継代による病原性の低下

(NS-175 株)

継代数	ウイルス接種		供試鶏		接種反応					発症率 ²⁾
	部 位	量 ¹⁾	日 齢	数	死亡	開口呼吸	眼窩下洞の腫脹	流涙	鼻汁	
5-10	鼻	4.5~5.0	14~35	33	0	9	22	15	26	87.9
	眼	4.3~5.5	10~30	10	0	0	6	6	NT	70.0
	眼窩下洞	4.5~5.7	10~35	10	0	0	9	7	10	100.0
	気管	4.4~5.5	30~150	319	58	279	4	0	14	89.0
54-80	眼	4.3	45	3	0	0	0	0	0	0
	眼窩下洞	5.0~5.5	45	7	0	0	4	1	6	85.7
	気管	5.0~5.5	45	5	0	0	0	0	0	0
99-125	鼻	4.0~5.3	4~84	365	0	1	2	2	18	4.9
	眼窩下洞	4.2~5.1	4~150	76	0	0	2	3	3	5.3
	気管	4.0~5.4	30~45	20	0	2	0	0	0	10.0

1) 感染価 2) 接種反応の認められたものを発症とした。

日間保存で7代ウイルス $10^{1.74}$, 57 および 124 代ウイルス $10^{2.0}$, 22°C 20 日間保存で7代ウイルス $10^{3.0}$, 57 代ウイルス $10^{1.74}$, 124 代ウイルス $10^{2.24}$, 4°C 30~32 日間保存で7代ウイルス $10^{1.0}$, 57 代ウイルス $10^{1.74}$, 124 代ウイルス $10^{2.74}$, -20°C 40 日間保存で7代ウイルス $10^{2.0}$ および 124 代ウイルス $10^{1.24}$ のウイルスが不活化された。 -50°C 48~60 日間保存ではいずれの継代ウイルスにも感染価の低下は認められなかった。

5. 継代ウイルスの病原性および免疫原性: NS-175 株ウイルスの各継代時に各けるお鶏に対する病原性を検討した成績は表1のとおりである。5~10代ウイルス接種鶏には 70~100%, 99~124 代ウイルス接種鶏には 4.9~10%の発症鶏が観察された。また, NS-175 株 5~10 代ウイルス接種により死亡鶏が 16%, 開口呼吸が 77%, 眼窩下洞の腫脹が 11%, 99~124代ウイルス接種により死亡鶏が 0%, 開口呼吸が 0.6%, 眼窩下洞の腫脹が 0.8% のものに認められた。継代が進むに従い, NS-175 株ウイルスの病原性は低下してきた。

4 日齢時に NS-175 株の 99 代ウイルス $10^{4.7}$ /羽を点鼻し, 接種後 4 週目に強毒ウイルス (NS-175 株 8 代) $10^{4.9}$ を点眼したところ接種群 9 羽中 1 羽, 対照群 2 羽中 2 羽に眼窩下洞の腫脹および流涙が観察された。NS-175 株の 99 代ウイルスには 4 日齢時に対して免疫原性が認められた。

考 察

ILT ウイルスが CK, 鶏胎児肝²⁾ および肺¹⁾ならびにウズラ腎⁷⁾ 細胞において初代より CPE を伴って増殖することは報告されている。また, 人由来, 猿由来および CE 細胞においては ILT ウイルスによる CPE は出現しないことを SHARMA⁶⁾ らは報告している。著者らは鶏由来の CE, TC および哺乳動物由来の BK, DK, SK, PS ならびに BHK-21 細胞において初代では ILT ウィ

ルスの CPE を認めず, また, ウイルスの増殖も確認できなかった。これらのことから鳥類由来の細胞は ILT ウイルスに対する感受性を有するものと思われるが, 哺乳動物由来の細胞には感受性は少ないようである。

ILT ウイルスの CK 細胞における増殖曲線については MAYER ら⁵⁾ の報告がある。著者らの NS-175 株ウイルスの 7 および 124 代ウイルスはまったく同じ曲線を描いて増殖し, その成績は MAYER らの成績にも大略一致している。これらのことから ILT ウイルスは株あるいは継代数にかかわらず大略類似した増殖パターンを示すものと考えられる。

継代ウイルスの各継代時の感染価は, いずれの株においてもばらつきが認められた。これは接種ウイルス量, 接種時の CK 細胞の状態あるいは接種後材料採取までの期間などウイルスの培養条件の若干の差によるものと考えられた。しかし, NS-175 株が他の 2 株, とくに 1358 株に比較してその最高感染価が高いのは株固有の性格, CK 細胞内での増殖性の差によるものであろう。

ILT ウイルスの保存性についてはこれまで多くの報告が認められるが, 保存条件あるいは感染価の測定方法などがそれぞれ異なり, 単純な比較は困難である。組織培養ウイルス液を保存し, CK 細胞により感染価を測定する方法を用いた成績は, わずかに SHARMA⁶⁾ らの報告のみである。SHARMA らは 37°C 147 時間保存で 80.5%, 著者らは 144 時間で 99% のウイルスの不活化を認めており, 著者らの成績のほうが若干早く不活化されている。この差は, SHARMA らがウイルス液に牛血清を 10% の割合に加えて保存していたためにおこったものと考えられる。継代数によって保存性に差がどうかを検討したところ, 室温および -20°C 保存で NS-175 株の 7 代ウイルスは 54 および 124 代ウイルスに比べて不活化される速度が若干早く, 継代の進んだウイルスの保存性

が安定しているような成績を得た。しかし、37あるいは4℃保存ではほとんど差が認められなかった。

GELENCZEI ら²⁾は鶏胎児腎および肝の培養細胞を用いて ILT ウイルスを順化継代し 51 代目に弱毒ウイルスを得たと報告している。著者らは CK 細胞で 99~124 代継代した NS-175 株ウイルスを鶏に接種して病原性を調べたところ、接種鶏の 5% に軽い反応を認めたに過ぎず、継代ウイルスの病原性が著しく低下したことを確認した。また、99 代ウイルス接種鶏の 89% は強毒ウイルスの巧撃に対して無症状耐過しており、この継代ウイルスは免疫原性も十分維持しているものと思われる。

結 論

CK 細胞で継代した鶏伝染性喉頭気管炎ウイルスの病原性、免疫原性および 2, 3 の性状を検討してつぎの成績を得た。

1. NS-175 株の 11 代継代ウイルスは初代では CE, TC, BK, DK, PS および BHK-21 細胞で CPE の出現ならびにウイルスの増殖を認めなかった。
2. NS-175 株 7 および 124 代継代ウイルスは CK 細胞内でほとんど同じ増殖曲線を示した。
3. NS-175 株 7, 57 および 124 代継代ウイルスの 37, 4, -50℃では保存性に差が認められなかった。
4. NS-175 株 3-124 代継代ウイルスでは $10^{3.5-6.5}$, 1185 株 8~106 代では $10^{3.5-5.5}$ および 1358 株 3~102

代では $10^{3.5-4.74}$ の感染価が認められた。

5. NS-175 株の 99~124 代継代ウイルスは鶏に対する病原性を低下させているが免疫原性は十分に維持していた。

本論文の要旨は第 61 および 63 回日本獣医学会の席上発表し上た。

文 献

- 1) ATHERTON, J. G. and W. ANDERSON: *Aust. J. Exptl. Biol. Med.*, 35, 335 (1957).
- 2) GELENCZEI, E. F. and E. W. MARTY: *Avian Dis.*, 8, 105 (1964).
- 3) GOLDBAFT, T.M.: *Avian Dis.*, 5, 196 (1961).
- 4) JORDAN, F.T.W.: *Avian Dis.*, 10, 1 (1966).
- 5) MAYER, V.M., F.M. HETRICK, W. D. KEENUM and H.M. DEVALT: *Am. J. Vet. Res.*, 28, 825 (1967).
- 6) SHARMA, J. M. and L.G. RAGGI: *Avian Dis.*, 13, 268 (1969).
- 7) 吉村, 小田切, 友, 井上: 日獣学誌, 29 (学会号) 88 (1967).
- 8) 吉村, 小田切: 日獣会誌, 17, 489 (1964).
- 9) 吉村, 椿, 山上, 井出, 升: 日獣学誌, 31 (学会号) 170 (1969).
- 10) SALISBURY, R. M.: *New Zealand J. Agric.*, 95, 249 (1957).
- 11) SIMMONS, G.C., J.W. RYLEY and V.M. MADONALD: *Aust. Vet. J.*, 30, 129 (1955).
- 12) RAGGI, L. G. and W.H. ARMSTRONG: *Avian Dis.*, 4, 272 (1960).
- 13) RISLAKKI, V.: *Avian Dis.*, 9, 339 (1965).
- 14) AHMED, A.A.S., and M.A. ELSISI: *Avian Dis.*, 13 (1969).
- 15) BEACH, J.R.: *Science*, 72, 633 (1930).

新 刊 図 書 案 内

日本獣医師会

翻訳図書 猫の内科学・外科学 第4版発刊

さきにアメリカ獣医図書出版社発行の「猫の内科学・外科学」(原著名 *Feline Medicine & Surgery*) の日本語翻訳版を本会より発刊いたし、以来3版を重ね、好評を得てご利用いただきましたが、その後各方面より重ねて版行を要望されるところとなりまして、その要望に応えるため、また斯学の研鑽と発展普及を期するため、諸情勢等を考慮して、下記のとおり第4版を刊行しましたので、ご利用の程お願い申し上げます。

本書は今般も発刊部数に制限がありますので、お申込順に優先配本いたしますので、お早目にお申込みいただきたく、よろしくお願い申し上げます。

1. 図書名 猫の内科学・外科学 (*Feline Medicine & Surgery*)
2. 発行 日本語版 日本獣医師会 (原著発行 American Veterinary Publications Inc)
3. 定 価 6,000 円
4. 送 料 250 円
5. 配 本 昭和 47 年 11 月 10 日より (配本中)
6. 配 本 受付順に優先配本
7. 購入申込案内 所属地方獣医師会または日本獣医師会へ