ニューカッスル病，伝染性気管支炎不活化混合ワクチンについて

内布洋一* 山田進二* 藤川英雄* 幸田祐一*

(昭和 47 年 5 月 15 日受付)

Newcastle Disease-Infectious Bronchitis Inactivated Combined Vaccine

Y. UCHINUNO, S. YAMADA, H. FUJIKAWA and Y. KODA

(Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Inc. Kumamoto)

SUMMARY

Immunogenicity and safety of Newcastle disease (ND) infectious bronchitis (IB) inactivated combined vaccine (the combined vaccine for short) were studied in chickens 4 to 40 days old. ND hemagglutination-inhibition (HI) titer was 16 to 50 in a group of birds inoculated with the combined vaccine. It was 32 to 56 in a group of birds inoculated with ND vaccine. Namely, there was no difference in titer between the two groups.

IB neutralization (NT) titers were 3.0 to 4.0 in a group inoculated with the combined vaccine and a group inoculated with IB vaccine. There was no difference in titer between the two groups.

In the groups inoculated with the combined vaccine, ND HI titer reached a maximum approximately 4 weeks postvaccination and then dropped, but IB NT titer maintained a high level until 8 weeks postvaccination.

A rise in ND HI titer and IB NT titer was insufficient in birds 4 to 10 days old because of the presence of maternal antibodies.

In these trials, no death or any noticeable clinical symptom occurred to the birds inoculated with the combined vaccine. Both ND HI titer and IB NT titer showed a satisfactory rise.

近年わが国においては家禽疾病の予防のため多種類のワクチンが開発，実用化されている。そのため鶏は短い一生の期間に頻回ワクチンの接種をうけている。従って現在用いられているワクチンの中には混合接種しても免疫効果に影響をうけなければ最初から混合ワクチンにした方がより経済的および省力的で，また鶏に与えるストレスの回数を軽減できる。この点から著者らはニューカッスル病（以下NDと略す）および鶏伝染性気管支炎（以下IBと略す）の混合ワクチンについて検討を加えた。すでに山田¹²⁾はワクチンウイルスであるNDウイルス B₁ 株およびIB弱毒ウイルス練馬株を用いて生ウイルス同志の干渉作用の有無について検討している。その結果発育鶏卵および鶏に同時に両ウイルスを接種した場合，接種ウイルスの量的な関係によって両ウイルスともにその増殖が抑制され，また，ひなの抗体産生にも悪い影響を与える成績が得られた。このことから両ウイルス株を用いたND-IB混合生ウイルスワクチンは若干問題があると考えられた。今回は不活化したND-IB混合ワクチン（以下混合ワクチンと略す）について検討を加えたので報告する。

実験材料および方法

混合ワクチン：混合ワクチンはNDワクチン原液およ

びIBワクチン原液を等量混合し，硫酸アルミニウムカリウム (AlK(SO₄)₂·12H₂O) 水溶液を1%の割合に添加したのち苛性ソーダ (NaOH) 水溶液で pH を 7.0 に修正して作製した。

単味ワクチン：ND単味ワクチンはNDウイルス佐藤株を石田⁴⁾の方法で不活化調製して作製した。すなわちNDワクチンの材料は発育鶏卵を用い，ウイルスの増殖極期に尿腔液および胎児を採集し，それに等量の磷酸緩衝液を加えて乳剤にした。この乳剤に0.2%ホルマリンを添加し，37℃で3日間不活化した。この原液に硫酸アルミニウムカリウム水溶液を1.5%加えて調製した。IB単味ワクチンはIBウイルス練馬株を山田¹³⁾の方法で作製したが，その方法は不活化温度は4℃で行ない，硫酸アルミニウムカリウムの濃度が1.0%である以外NDワクチンの作製方法と同一である。

供試鶏：実験室内および野外試験に用いた鶏は白色レグホン種およびその交配系で，その日齢は4，10，30および40日齢のものを使用した。

ワクチン接種方法：接種部位はすべて大腿部筋肉内に行ない，接種量は4および10日齢ひなでは0.5 ml，30および40日齢ひなでは1.0 mlである。

抗体価の測定：ワクチン接種前後の抗体価の測定はNDでは赤血球凝集抑制（以下HIと略す）反応⁴⁾およびIBでは中和試験（以下NTと略す）¹³⁾により行なった。

* 化学及血清療法研究所（熊本市古京町3番1号）

実験成績

1) 安全性

試作混合ワクチンを4日齢ひな100羽、10日齢ひな25羽および30日齢ひな115羽に接種し、その安全性を検討した。その結果ワクチン接種後臨床的に異状を呈するものおよび死亡するものは1例も認められなかった。

2) 抗原性

イ) 接種量：鶏が免疫を獲得するのに必要な混合ワクチンの量を30日齢ひなを用いて検討した。各群7～8羽宛4群のひなにそれぞれ0.1、0.5、1.0および3.0mlのワクチンを2週間隔で2回接種し、抗体価の測定を行なった。その成績は図1に示した。ワクチン接種後のND-HIおよびIB-NT両抗体は0.1mlの接種群では両抗体価の上昇が極めて悪く、また0.5、1.0および3.0mlの接種群では相互に大差なく、ND-HI価で10～25、

IB-NT価で3.5～3.9の抗体価が得られた。

ロ) 再接種までの期間の検討：試験には30日齢ひなを用い、ひなを7～8羽宛5群に分け、初回接種のみおよび1、2、4、6週目に混合ワクチンを再接種した群の両抗体価の平均値を比較した。その成績は図2に示しておりである。ND-HI価は各群ともにその上昇に大差を認めなかったが、両接種までの期間の長い群(4および6週間隔)では再接種後2週目に最高値を示した。また、IB-NT価は1回接種のみでは8週目に1.8の上昇がみられたのみで抗体産生が不十分であったが、再接種を行なうと急速に上昇し、抗体価2.5以上に上昇した。そしてその上昇は再接種の期間の長い群ほど遅れる傾向がみられた。

3) 日齢別抗体産生

イ) 4日齢ひな：移行抗体を保有する4日齢ひなに混合ワクチンを接種した。接種前後の抗体価の動きは図3

図1 接種量による抗体の産生

供試ひな日齢：30日 接種部位：筋肉内 抗体価：7～8羽の平均値
*接種量は ml, 2週後に同量再接種

図2 混合ワクチンの再接種までの期間による抗体の産生

接種量：1.0 ml, 筋肉内 抗体価：7～8羽の平均値 * 接再種までの期間(週)
点線は初回接種のみ C：不接種対照

に示すとおりである。

ND-HI および IB-NT の両抗体価はともに日齢の進むにしたがい下降した。とくに ND-HI 価はワクチン接種群および対照群の間にほとんど差がなく、ワクチン接種による抗体価の上昇も認められなかった。IB-NT 価はワクチン接種群と対照群の間に 20 日齢ごろから若干の差がみられ、30 日齢以後では明らかに接種群が高い値を示した。

ロ) 10 日齢ひな：各群 7~10 羽の 10 日齢ひなに混合ワクチンおよび対照として各ワクチンを接種し、その後 2 週目にそれぞれの組合せで再接種した成績は表 1 に示すとおりである。混合ワクチン接種群の ND-HI 価は 4 週目に最も高い値を示し、その後若干下降した。しかし 12 週目まで 2.3 の抗体価が維持された。また、IB-NT 価では IB 単味および混合ワクチン接種群は 12 週目に 3.0 ないしそれ以上の値が得られた。

ハ) 30 日齢ひな：各群 7~10 羽の 30 日齢ひなに混合ワクチンおよび各ワクチンを接種した場合の ND-HI 価および IB-NT 価の変動は表 1 に示すとおりである。ND-HI 価では ND 単味および混合ワクチン接種群が同様な抗体価の変動を示した。IB-NT 価は IB 単味接種群の 1 群が 8 週目に 2.0 と低かった。その他の 3 群は IB 単味および混合ワクチン接種群ともに 8 週目には 3.0 以上に上昇し、両者間の抗体価に差を認めなかった。

ニ) 40 日齢ひな：40 日齢ひなに混合ワクチンおよび

図 3 移行抗体保有ひな接種後の抗体の動き

○—○ 不接種 □—□ ND ワクチン
△—△ IB ワクチン ×—× 混合ワクチン
抗体価：5~6 羽の平均値
ワクチン接種量：0.3 ml 筋肉内

表 1 日 齢 別 抗 体 産 生

供試ひな日齢	ワクチンの種類	ND-HI 価 (log ²)						IB-NT 価					
		前	2	4	6	8	12 ²⁾	前	2	4	6	8	12
10	混—混 ¹⁾	3	2	3.8	2.7	3	3	1.4	0	2.4	2.6	2.8	3.0
	混—ND	2	2.6	3	3	3	3	1.2	0.2	1.4	2.0		1.8
	混—IB	4.9	2.4	4.8	3	3	3	0.5	0.5	2.7	3.0	2.5	3.3
	ND—ND	4.9	2.4	3.6	3.7	3.6	3.5	0.7	0.3	0.7	0.9	0.8	0.9
	IB—IB	2.7	2.4	2	1.6	1.6	2	0.5	0.5	2.8	2.8		3.8
30	混—混	0	3	4	3.6	2.7		1.4	0.9	2.5	3.3	3.4	
	混—IB							0.6	0.6	2.8	2.8	3.2	
	IB—IB	0	0	0	0	0		0.3	0	2.2	2.6	2.0	
	IB—IB	0	0	0	0	0		1.2	0.7	2.6	3.2	3.8	
	ND—ND	1	3	5	4	2.7		0.3	0.3	0.3	0.5	0.6	
40	混—混	2	3.7	5.5	5.3	3.9		0.3	0.3	1.5	2.4	3.5	
	混—IB	2.6	3.3	3.6	3.6	2.6		0.2	0.6	1.0	3.0	3.7	
	ND—ND	1.6	4.8	5.8	5.6	3.8		0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	

1) 混—混 初回接種混合ワクチン、再接種、混合ワクチン、再接種までの期間は 2 週間

2) ワクチン接種後週数 各日齢とも 1 群 7~10 羽 HI 価は log² の指数で示す。

表2 混合ワクチンの野外応用試験

群	ワクチン	供試羽数	接種量	接種後の反応	抗体の種類	ワクチン接種後週数		
						前	2	6
A	Lot 1	300	1.0 ml/im 2 週後追加免疫	—	I B NT	1.4(0.7~2.4) ¹⁾	1.5(0.7~2.0)	2.9(1.7~4.0)
					ND HI	1.7 (0~0) ²⁾	3 (0~6)	4.7 (3~6)
B	Lot 1	10	1.0 ml/im 1 回のみ	—	I B NT	1.1(0.3~2.3)	1.2(0.7~1.8)	2.4(2.3~2.7)
					ND HI	2.6 (1~3)	4 (4)	3.6 (3~4)
C		20	不接種	—	I B NT	0.5 (0~1.0)	1.1(0.7~2.0)	0.8(0.7~1.0)
					ND HI	1.6 (0~3)	1.4 (0~3)	1.4 (1~2)

試験地：熊本県菊池郡沓水町 鶏：デカルブ雌 30日齢

1) 数字は 10 羽の平均値 () 内はばらつき 2) HI 価は log 2 の指数で表わす。

単味ワクチンを接種し 2 週後に再接種した場合の抗体価の変動は表 1 に示すとおりで、30 日齢ひなの場合とほぼ同様の成績であった。ND および I B 単味ワクチンならびに混合ワクチン接種群の間に抗体価の差を認めず、ND-HI 価で 2^{5-6} 、I B-NT 価で 3.0~4.0 の価が得られた。

4) 野外応用試験

野外試験は熊本県内の某養鶏場で行なった。供試鶏は 30 日齢に初回接種後 2 週目に再接種したもの 300 羽 (A 群)、30 日齢時に 1 回接種したもの 10 羽 (B 群) および不接種対照 20 羽 (C 群) を用いた。その成績は表 2 に示すとおりである。混合ワクチンを接種後異状を呈する鶏および斃死する鶏は 1 羽も認めなかった。また、抗体価は C 群では前血清と 6 週後のものに ND-HI および I B-NT の両抗体価とも差がみられなかったが、接種群では両群とも両抗体価が上昇した。抗体価の上昇は 1 回接種群より 2 回接種群が優れていた。

考 察

ND および I B 混合ワクチンは外国では主として生ワクチンが検討、実用化され、これらのワクチンは近年わが国でも一部に使用されている。著者らも混合生ウイルスワクチンについてはすでに検討している¹²⁾。その成績によると ND ウイルス B₁ 株および I B ウイルス練馬株の組織培養弱毒株¹³⁾を用い、両ウイルスを混合して用いた場合の鶏に対する免疫原性は両ウイルスの混合比率の差によって両ウイルス間に干渉現象が起こり、産生された抗体価は単味ワクチンのそれに比較して低い値が得られた。このことから生ウイルス同志の混合ワクチンは実用性に乏しいと考え、今回は混合ワクチンとして不活化ワクチンについて検討した。混合ワクチンは ND および I B 両単味のワクチンを最終段階で等量宛混合して調製した。ND 不活化ワクチンは鶏のワクチンではこれまで最も多く利用されてきたもののひとつであるが、今回の試験に用いた ND 不活化ワクチンは石田⁴⁾の方法に準じ

て作製したものである。このワクチンは昭和 40 年以來わが国で大流行した ND の予防に著しく貢献した。いっぽう I B 不活化ワクチンはわが国で検討されはじめたのが最近^{9,11)}のことで、欧米ではその前からすでに検討されている。それらによるとウイルスの不活化にはホルマリン、β プロピオラクトンおよび紫外線が用いられ、また、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲルなどの加えられたワクチンが作製されている^{1,2,3,8,10)}。著者らの I B 不活化ワクチンに関する実験では I B ウイルス液をホルマリンで不活化したものは免疫原性がほとんどなく、これに硫酸アルミニウムカリウムゲルを添加することにより優れた免疫原性を示すことがわかった。また、このワクチンはこれまでの試験では¹¹⁾1 回の接種では抗体の産生が不十分であるが、追加免疫するとかなり良く抗体の上昇することが判明し、さらに安全性にも問題はなかった。

今回の実験で調製した混合ワクチンの両抗体の産生状況と ND および I B それぞれの単味ワクチンの産生状況とは、ほとんど差が認められなかった。次に混合ワクチンの接種量の検討を行なったところ、0.1 ml では不十分であるが、0.5 ml では両抗体とも産生は良好であった。また 0.5 ml 以上の量を接種した例においても上昇した抗体価に差はみられなかった。このことは著者らが単味ワクチンの接種量を検討した成績に一致し¹¹⁾、鶏に免疫を与えるために必要な量を接種すれば、単味と同様 ND および I B ウイルス相互間に悪い影響がなく、混合ワクチンとして使用できるものと考えられる。出水田⁵⁾は主として ND および I B 不活化ワクチンの混合比による抗体産生の影響を報告しているが、ND の抗原量が I B より多い場合および ND と I B が等量の場合では産生される ND-HI および I B-NT の両抗体は単味および混合ワクチンの間に差がなかったと述べているが、この点著者らの成績と一致している。さきに述べたように I B 不活化ワクチンの場合 1 回接種では I B の抗体産生が不十分

であるが¹¹⁾，このことは混合ワクチンによるI B抗体産生についても同様な成績が得られた。従って高いI B-NT価を得るためには2～6週間隔で2回混合ワクチンの接種を行なうか，あるいはI B単味と混合ワクチンを組み合わせて，前記の間隔で接種する必要がある。

ま と め

NDおよびI B混合不活化ワクチンを試作し，4～40日齢の鶏を用いて免疫原性を検討した。30～40日齢ひなではND-HI価は混合ワクチンおよびND単味群に差を認めなかった。また，I B-NT価においてもI B単味および混合群の間に差がみられず高い抗体価が得られた。ワクチン接種後の抗体価の変動はND-HI価では4週目ごろを最高に，その後は低下したが，I B-NT価では8週目まで上昇を続けた。4～10日齢の抗体保有ひなの混合ワクチン接種による抗体価の上昇は両抗体とも不十分であった。野外試験において混合ワクチンの接種鶏は異状を呈したものと死亡したものは全くみられ

ず，両抗体価も良く上昇した。

本論文の要旨は第70回日本獣医学会で報告した。

文 献

- 1) BERRY, D. M.: *J. Comp. Path. Therap.*, 75, 409 (1965)
- 2) BOX, P.G. & J. M. BARNES: *Vet. Rec.*, 80, 73 (1966).
- 3) CHRISTIAN, R.T. & W. MACK: *Poult. Scie.*, 36, 1177 (1957).
- 4) 石田：熊本医学会雑誌，35, 780 (1961).
- 5) 出水田，中井，佐々木：日獣学誌，32 (学会号) (1970).
- 6) LUGINBUHL, R.E., E.L. JUNGHER & T. W. CHOMIAK: *Poult. Scie.*, 34, 6 (1955).
- 7) MARKHAM, F.S., A. H. HAMMER, P. GINGER & H.R. COX: *Poult. Scie.*, 33, 1069 (1954).
- 8) McMARTIN, D. A.: *Brit. Vet. J.*, 124, 36 (1968).
- 9) 佐々木，出水田，長藤，林，野木，山口：日獣学誌，30 (学会号) (1968).
- 10) WINTERFIELD, R. W.: *Avian Dis.*, 11, 446 (1967).
- 11) 山田，内布，藤川，池田，市原：家畜保健衛生技術研究会報，18, 17 (1970).
- 12) 山田，藤川，幸田：日獣会誌，25, 29 (1972).
- 13) 山田，藤川，内布，幸田：日獣会誌，24, 126 (1971).

基 礎

鶏のマレック氏病の皮膚病変について

田島正典* 板橋正文* 木谷真三*

(昭和47年5月1日受付)

Pathology of Skin Lesions Associated with Marek's Disease of Chickens

M. TAJIMA, M. ITABASHI and S. KITANI

(Nippon Institute for Biological Science, Tachikawa, Tokyo)

SUMMARY

The skin was examined pathologically in 18 field cases and 1 experimental case of Marek's disease of chickens. Grossly visible skin tumors were detected in 6 cases (31.6%). Only two of these 6 birds had more than 10 skin tumors, whereas the other four had 1 to 10 tumors. In cutaneous sections, neoplastic lymphoid aggregates were observed in 11 cases (37.9%). Most of them were present adjacent to feather follicles. They frequently coalesced and expanded into interfollicular or subcutaneous tissues. Dermal nerves were usually infiltrated with lymphoid cells.

In stained preparations of nine of 15 cases examined, eosinophilic intranuclear and cytoplasmic inclusions were demonstrated in the feather-follicle epithelium. Numerous naked capsids and enveloped particles of

herpes-type virus were easily detected in the superficial layers of the follicular epithelium of all 3 birds examined by the electron microscopic technique of thin sectioning.

In four of 6 cases examined by the agar gel precipitin test, specific precipitating antigens were detected in extracts prepared from the skin. There was an apparently positive relationship between the cutaneous neoplastic lymphoid lesion and either inclusions or precipitating antigens. In a few cases, however, no cutaneous tumorous changes could be observed despite the presence of inclusions or viral particles in the feather-follicle epithelium. These observations suggest the possibility that infectious Marek's disease virus might be produced in and released from the skin, independently of cutaneous tumor.

鶏のマレック氏病（以下MDと略記）はヘルペス群に

* 日本生物科学研究所（東京都立川市曙町3-28-19）

属するMDウイルス（以下MDVと略記）を原因とする

伝染病で，全身の各種器官・組織におけるリンパ様細胞