数種のマレック病生ウイルス予防液の発病防御効果の比較

稲見芳治* 小島明広* 土井邦雄* 八十島 昭* 佐久間貞重* 岡庭 梓*

高久慶典** 高延壮男** 吉田 巖** 加藤四郎***

(昭和 48 年 1 月 31 日受付)

Comparison of Effect of Preventing Clinical Infection among Several Marek's Disease

Live Virus Vaccines

YOSHIHARU INAMI, A. KOJIMA, K. DOI, A. YASOSHIMA, S. SAKUMA, A. OKANIWA, *Y. TAKAHISA,

*M. TAKANOBU, *I. YOSHIDA and *S. KATO (Biological Laboratory, Tanabe

Pharmaceutical Co., Ltd., Toda, Saitama 335, and *Osaka University)

SUMMARY

Effect of preventing clinical Marek's disease (MD) was compared among frozen vaccine prepared from the low virulent C2 strain originated from MD herpes virus (MDHV) developed by the Osaka University Microbiological Disease Laboratory, frozen and freeze-dried vaccines prepared from the O1 strain of HV of turkey (HVT), and frozen vaccine tentatively prepared from HVT originated from some overseas laboratory.

Commercial White Leghorn chicks were used. When examined by the indirect fluorescent antibody technique, they had an anti-MDHV FA titer of 1:1590 and an anti-HVT FA titer of 1:470. They were in-

oculated intraperitoneally with vaccine at one day of age and challenged by the same route at 3 weeks of age. Chicks inoculated with the same vaccine were held in the same house separately from chicks inoculated with any other vaccine. Results were judged histopathologically in all the birds at about 20 weeks of age. In conclusion, there were no differences in the effect of prevention among the four vaccines. Besides, it was confirmed that a freeze-dried vaccine prepared from cell-free HVT showed a satisfactory effect even when inoculated into chicks possessing a rather high level of maternal antibody.

鶏マレック病 (以下MD) が一種の Herpes Virus (以下MDHV) の感染によって起こることが、BIGGS ら (1968)¹⁾、WITTER ら (1969)¹²⁾ により明らかにされ、また、WITTER ら (1970)¹³⁾ によって七面鳥から分離されたヘルペス型ウイルスをヒナに接種するとMDの発病を防御できるということが知られて以来種々のMD予防液 (以下MDワクチン) が開発された。そのMD発病防御効果については、すでに多くの実験室内あるいは野外試験が行なわれ、その評価が定まっていると考えられる^{2, 3, 9, ~11)}。われわれは今回、由来の異なった種ウイルスから製造され、また、凍結あるいは凍結乾燥のような異なった製品形態の4種の生ワクチンについて、同一の実験系のもとで、実験室内試験による発病防御効果の比較を実施したので、その成績を報告する。

材料および方法

供試ワクチン：試験に用いたワクチンは、大阪大学微生物学研究所 (阪大微研) で開発された3種、すなわち鶏由来MDHVの「弱毒C2株で作った凍結ワクチン」⁶⁾、

* 田辺製薬株式会社生物研究所 (埼玉県戸田市川岸2-2-50) ** 大阪大学微生物病研究会観音寺研究所 (香川県観音寺市八幡町乙17) *** 大阪大学微生物病研究会 (大阪府吹田市大字山田上)

七面鳥由来の「HVT O1株で作った凍結ワクチン」⁷⁾、同じく「HVT O1株の cell-free ウイルスで作った凍結乾燥ワクチン」⁷⁾と外国某研究所由来の「HVTで作った試作凍結ワクチン」の4種である。

ワクチン接種は供試ヒナの1日齢時に腹腔内注射により実施した。

供試ヒナ：試験に用いたヒナは白色レグホン系のもので、国内某孵卵場由来の種卵をわれわれの実験室で孵化させた、いわゆる通常市販ヒナに相当するものである。孵化後のヒナは雄雌の別を問わず無作為に抽出し、1群を約50羽とし、ワクチン試験群4群および対照群2群に分けた。さらに20羽の群を設け、1日齢で強毒株による攻撃をおこなう陽性対照群とした。供試ヒナは群別に同一構造の独立した隔離飼育舎に収容し飼育観察した。

試験群の構成は表1に示したが、すべての試験ヒナについて通常のワクチネーションプログラムに従い鶏痘予防液とニューカッスル病予防液を接種した。

攻撃用強毒株MDHV：攻撃感染に用いた強毒株MDHVはカナダ国農務省より分与を受けたBC-1株⁵⁾で、本試験に際しあらかじめSPFヒナで連続3代3週間隔で血液継代した。この3代目ヒナの3週齢時へパリン加血液を攻撃材料とし、その0.2mlずつを、21日齢時の

表1 試験群の構成

試験群	処置	試験羽数	観察期間
V ₁ 弱毒MDHV C2株 凍結ワクチン	1日齢ワクチン・21日齢強毒株MDHV 1,000PFU 撃感染	54	140日
V ₂ HVT O1株 凍結ワクチン	1,000PFU	55	〃
V ₃ HVT O1株 凍結乾燥ワクチン	1,800PFU	54	〃
V ₄ HVT 外国系 試作凍結ワクチン	1,580PFU	55	〃
P.C.(1) 陽性対照 (1)	21日齢強毒株MDHV 腹腔内攻撃感染	53	〃
P.C.(2) 陽性対照 (2)	1日齢強毒株MDHV 腹腔内攻撃感染	20	〃
N.C. 陰性対照	無処置	48	〃

各試験ヒナの腹腔内に接種した。

効果判定および比較の基準：観察期間おおむね 140 日
にわたる臨床観察所見をもとに各個体および試験群につ
いて、以下の項目について検討した。

a) 発育：各週ごとに全試験ヒナについて体重測定を
行ない週間増体量の平均値を累積して比較した。

b) 発症死亡率：観察期間中に発症後死亡もしくは瀕
死期殺した例について、週を追って累積死亡率として比
較した。

c) 病理解剖学的および病理組織学的検索：観察期間
中の死亡（瀕死期殺も含め）例も含めた全試験鶏につ
いて実施し、肉眼的MD病変陽性率および組織学的MD病
変陽性率としてまとめた。病理組織学的診断の基準はす
でに報告したものに準拠した⁴⁾。

d) 血清学的試験：1日齢攻撃感染対照群を除く他の
6群について、各群20羽ずつ個体別に経日的に採血し、そ
の血清について間接蛍光抗体法⁶⁾による抗HVT・FA
価および抗MDHV・FA価の推移を検討した。

以上の項目を総合的に判断することにより効果の判定
および比較を行なった。

成 績

a) 発育成績：図1、2に示すように雄雌ともに4種
のワクチン群と無処置陰性対照群との間には全く差がな
く全期間経過した。いっぽう陽性対照群は9~10週齢頃
より次第に発育低下が目立ち、以後週を追って他の群と
の差が拡がり、観察終了時ワクチン群との発育差は雄で
200~250g(11~14%減)、雌で 100~150g(8~11%減)。

図1 発 育 曲 線 (♂)

数種のマレック病生ウイルス予防液の発病防御効果の比較

図2 発 育 曲 線 (♀)

図3 臨床経過および剖検所見

○：殺例 △：瀕死期殺例 □：死亡例

試験群	No.	W	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V1 弱毒MDHV C 2株 凍結	♂ 24												○	○	○	○	○
	♀ 30		▲						△		△		■	○	○	○	○
V2 HVT O 1株 凍結	♂ 20							▲	▲	■			▲	○	○	○	○
	♀ 35												▲	○	○	○	○
V3 HVT O 1株 凍結乾燥	♂ 24								▲				○	○	○	○	○
	♀ 30											■	○	○	○	○	○
V4 HVT 外国系 試作 凍結	♂ 26				■			▲					▲	○	○	○	○
	♀ 29							▲					▲	○	○	○	○
P.C. 陽性対照 (1)	♂ 31			▲	▲			▲	▲	▲	▲		▲	○	○	○	○
	♀ 22		▲	▲	▲			▲	■	▲			▲	○	○	○	○
P.C. 陽性対照 (2)	♂ 12	▲	■			▲			▲	▲	▲		▲	○	○	○	○
	♀ 8	▲	■	▲				■	▲	▲			▲	○	○	○	○
N.C. 陰性対照	♂ 27												○	○	○	○	○
	♀ 21												○	○	○	○	○

となった。

b) 発症死亡率：攻撃感染実施後発症し死に至った例（含瀕死期殺例）も含めた全試験例についての臨床経過

は図3に、また、死亡率を週を追って累積したものは図4に示したとおりである。ワクチン群の中で最初に死亡した例は、7週齢時のV1群の1例で、以後は9週齢時

にV₄群で1例、11週齢時にV₂群で1例、V₄群で2例と散発する程度で、全期間を通じて合計しても各群4～9例(7.4～16.4%)と少数であった。陽性対照群のP.C.(1)群では、7週齢時の2例に始まり、8週齢および9週齢では各1例と少数であったが11週齢時以降は急激に増加し、全期間を通じ合計24例(45.3%)とワクチン群の3～6倍に達した。また、供試ヒナのMD感受性確認のために設けたP.C.(2)群では、4週齢時に初発し、以後15週までに、20例中13例(65%)が発症後死に至った。

c) 病理解剖学的および病理組織学的検査成績：図3の各個体別臨床経過において黒塗りで示してあるのが病理解剖学的検査におけるMD陽性例である。病理組織学的検査成績は発症死亡率および肉眼的MD陽性率と対比させて表2に示した。

表2 試験成績のまとめ

試験群	No.	死亡	肉眼病変	組織病変
弱毒MDHV C 2株	54	5(9.3)*	6(11.1)*	11(20.4)*
V ₁ 凍結ワクチン		(79.5)**	(77.4)**	(65.1)**
V ₂ HVT O 1株	55	9(16.4)*	9(16.4)*	12(21.8)*
V ₂ 凍結ワクチン		(63.8)**	(66.6)**	(62.7)**
V ₃ HVT O 1株	54	4(7.4)*	7(12.9)*	10(18.5)*
V ₃ 凍結乾燥ワクチン		(83.7)**	(73.7)**	(68.4)**
V ₄ HVT 外国系	55	5(9.1)*	9(16.4)*	12(21.8)*
V ₄ 試作凍結ワクチン		(79.9)**	(66.6)**	(62.7)**
P.C.(1) 陽性対照(1)	53	24(45.3)*	26(49.1)*	31(58.5)*
P.C.(2) 陽性対照(2)	20	13(65.0)*	17(85.0)*	18(90.0)*
N.C. 陰性対照	48	0(0)*	0(0)*	0(0)*

*: 死亡率あるいは陽性率 **: 防御率

観察期間中に発症死亡した例の内V₁群の2例およびP.C.(1)群の3例計5例は、肉眼的にはMD陽性と診断できなかったが、他の死亡55例については、いずれも明らかにMD病変を有していた。その他、試験終了時まで無症状で生残した鶏群については、V₁群で49例中

3例、V₃群で50例中3例、V₁群で49例中4例、P.C.(1)群で29例中5例、さらにP.C.(2)群では7例中4例が肉眼的MD陽性と判定された。しかしV₂群の生残鶏については46例中1例も陽性例はなかった。いっぽうN.C.群では全例無症状で生残し、肉眼的にも異常の認められたものはなかった。

表2からも明らかなように、ワクチン4群および陽性対照2群において病理組織学的陽性率はいずれも肉眼病変陽性率に比べ5～10%高くなっている。また、先述の肉眼的に病変の認め難かった5例は、組織学的には明確なMD病変を有していた。もちろんN.C.群は組織学的にも全例MD陰性であった。

d) 血清学的試験成績：初生時、攻撃感染時、7週齢時、9週齢時および試験終了時と経目的に採血した血清について検査成績は図5、図6に示した。

図5 抗HVT・FA価(G.M.)の推移
(Antigen: HVT O 1株)

図6 抗MDHV・FA価(G.M.)の推移
(Antigen: MDHV C 2株)

供試ヒナ初生時の抗HVT・FA値の幾何平均値は1:470、また、抗MDHV・FA値のそれは1:1,590であって相当高い移行抗体を有していたことが証明された。陰性対照群の成績では、3週齢時までは両者とも急激な下降を示し、その後もゆるやかに下降し続けて試験終了時には1:21となっていた。いっぽうワクチン群はワクチン接種後3週に至って、V₁群を除きHVT由来ワクチンのV₂、V₃およびV₄群の抗HVT・FA値

は、それぞれ 1:618, 1:576, および 1:597 と相似た値を示しワクチン接種による順調な抗体上昇を示した。抗体価はその後次第に上昇し、高レベルの FA 値を維持したことがうかがえる。

V₁ 群の FA 値はワクチンの種ウイルスが HVT とは異なるものであることと関係するごとく前 3 群に比べかなり低値であった。いっぽう抗 MDHV・FA 値の推移を見ると、陽性対照群では 3 週齢時 1:102 から次第に上昇し、試験終了時には 1:1,520 と上昇していた。なお、ワクチン 4 群でも FA 値の上昇は陽性対照群に準じたものであった。

考 察

一般に予防液の効果の評価には、小規模な実験室内試験から大規模な野外試験に至るまで種々な段階のものが実施されているが、今回の実験で企図したのは野外とは異なった良好な衛生状態下において、MDHV に高度な感受性を有するヒナと強毒株 MDHV との組み合わせを用い、すなわち他の影響の入ることを防ぎつつ MDHV とヒナの組み合わせの面で相当苛酷な実験条件を作出して予防液の効果を確認することであった。このような目的が達せられたことは、陽性対照群に強毒株 MDHV 接種後早い時期からの発病鶏が続発し、死亡するものが多発したことから明らかである。このような条件下でマレック病生ウイルス予防液がどの程度の発病防御効果を示すかということは最も興味のある点であったが、種ウイルスの異なる、あるいは製品形態の異なる予防液が、いずれも可成り厳格な病理組織学的基準による判定においても 60% 以上の防御率を示すことが明らかにされたことは意義深いことである。

今回の実験では供試ヒナの抗 MDHV あるいは抗 HVT 蛍光抗体価の経日的測定によって移行抗体の推移あるいは接種したワクチンウイルスあるいは強毒株ウイルスに対する反応の追跡をおこなった。予防液は野外で用いられ、従って当然移行抗体の影響を考慮しなくてはならず、実験室内試験においてこの面の知見を得ておくことがぜひ必要と考えられたからである。今回供試した 4 種の予防液には細胞結合性ウイルスと細胞非結合性ウイルスの両者を含んでおり、両者の抗体保有ヒナに示す効果、とくに細胞非結合性ウイルスによる予防液の効果が問題とされた。その結果、細胞結合性ウイルスで作られた予防液、細胞を含まないウイルスで作られた予防液、あるいは HVT および弱毒 MDHV の差などにかかわらず供試予防液はいずれも優れた MD 発病防御効果を示した。今回得られた成績は、MD の発病防御に際し、供試したような各種の予防液がかなり高い移行抗体価を有するヒナにも有効に応用し得ることを示している。いっぽう MD 予防液の発病防御の機構と関連し、移行抗体保有

ヒナについて得られた今回の知見は興味深いものがある。

結 論

MDHV 由来弱毒 C 2 株で作った凍結予防液、HVT の O 1 株で作った凍結予防液および凍結乾燥予防液ならびに外国某研究所由来の HVT で作った試作凍結予防液の 4 者について発病防御効果を比較した。これらはいずれも苛酷な実験条件下において優れた効果を示し、甲乙をつけ難い結果を得た。また、いずれの予防液も高レベルの移行抗体保有ヒナにおいて十分に効果を発揮することが示された。

終わりに本研究の実施にあたり終始ご鞭撻を賜った田辺製薬株式会社生物研究所所長阿部久二博士に敬意を表し、また、研究室員各位のご協力に厚くお礼申し上げます。

本報告の要旨は第 74 回日本獣医学会（帯広、1972）において発表した。

文 献

- 1) BIGGS, P. M., et al.: *Perspectives in Virology* 6, 211~237(1968).
- 2) BIGGS, P. M., et al.: *Vet. Rec.*, 87, 704~707 (1970).
- 3) CHURCHILL, A. E., et al.: *Nature* 221, 744~747 (1969).
- 4) 土井邦雄, ほか: 日獣学誌, 34 (学会号) (1972).
- 5) GRUNDER, A. A., et al.: *Poultry Sci.* 48, 1608~1611 (1969).
- 6) 高延壮男, ほか: 日獣学誌, 32 (学会号) 166~167 (1970).
- 7) 高延壮男, ほか: 日獣学誌, (投稿中) (1973).
- 8) NAITO, M., et al.: *Biken J.* 13, 205~212 (1970).
- 9) OKAZAKI, W. et al.: *Avian Dis.* 14, 413~429 (1970).
- 10) PAT RASCU, I. V., et al.: *Avian Dis.* 16, 80~93 (1972).
- 11) PURCHASE, H. G., et al.: *Poultry Sci.* 50, 775~783 (1971).
- 12) WITTER, R. L., et al.: *Arian Dis.* 13, 171 184 (1969).
- 13) WITTER, R. L., et al.: *Am. J. Vet. Res.* 31, 525~538 (1970).

日本獣医師会発刊図書紹介

昭和48年度家畜衛生指導事業研修用テキスト発刊計画（2月中旬より3月末まで全巻発刊予定）

Ⅱ-6-15 飼料作物の品種と特性	美沢育雄 (中央畜産会)
Ⅱ-7-8 家畜のトキソプラズマ病	大島 慧 (田辺製薬生物研)
Ⅲ-7-9 放牧衛生管理	松下維浄 (中央畜産会)
Ⅲ-1-7 最近における牛の主要疾患 I (伝染性疾患)	大森常良 (農林省家衛試)
Ⅲ-4-10 肥育用素牛を中心とした牛の疾患	五十嵐幸男 (日本獣医師会)
Ⅲ-5-9 豚の消化器疾患、とくに胃潰瘍	山口真俊 (グリーコ畜産)
Ⅱ-7-10 養鶏経営に利用される機械・器具	藤岡勝次 (中央畜産会)

予定価 1 部 200 円、送料 55 円。30 部以上一括送付の場合は送料本会負担。