

牛疫ウイルス変異株（鶏胎化ウイルス）に関する研究

農林省家畜衛生試験場（場長：石井進博士）

古 谷 武

（昭和35年12月7日受付）

内 容 目 次

- Ⅰ. 緒言
- Ⅱ. 実験材料
 - 1. ウイルス
 - A. 牛疫ウイルス—釜山株
 - B. 鶏胎化牛疫ウイルス—YS株
 - C. 鶏胎化牛疫ウイルス—IV株
 - D. 家兎化牛疫ウイルス
 - E. 家兎化—鶏胎化牛疫ウイルス
 - 2. 牛
 - 3. 家兎
 - 4. 発育鶏卵
- Ⅲ. 実験方法
 - 1. ウイルスの希釈液
 - 2. 発育鶏卵に対するウイルスの接種と培養期間
 - A. 静脈内接種方法
 - B. 卵黄のう内接種方法
 - 3. ウイルスの継代方法
 - 4. 鶏胎児に対する最小感染量の測定方法
 - 5. 牛に対する最小感染量の測定方法
 - 6. ウイルス接種牛の臨床観察
 - 7. 補体結合反応
 - A. 可検材料の補体結合抗原証明
 - B. 牛血清の補体結合抗体証明
 - 8. 中和試験
 - 9. 感染牛のウイレミー証明方法
- Ⅳ. 試験成績
 - 1. 鶏胎児に対する感染性
 - 2. 鶏胎児に対する病原性
 - A. 感染鶏胎児の脾の病変
 - B. 感染鶏胎児の死亡率
 - 3. 鶏胎児におけるウイルスの増殖態度
 - 4. 鶏胎児と牛に対する最小感染量の比較
 - 5. 牛に対する病原性
 - 6. 牛体内におけるウイルスの消長
 - 7. 牛系ウイルスおよび各変異株感染牛のウイレミーの比較
 - 8. 補体結合抗体の産生
 - 9. 凍結乾燥および保存試験
 - A. 凍結乾燥
 - B. 乾燥ウイルスの保存試験
 - 10. IV株の牛系ウイルスに対する感染防禦能発現時期
 - 11. 牛に対する免疫原性
- Ⅴ. 総括および考察
- Ⅵ. 結 論
- 参考文献

緒 言

牛疫はドイツ語の *Rinderpest* の訳であるが、英語でも *Rinderpest* と称している。牛の最も激烈な急性伝染病であつて、その原因は、牛疫ウイルスである。牛疫ウイルスが経口的に牛の体内に入ると高熱と激烈な下痢で、そのほとんどが死亡するので、損害の大きなことは、他の家畜伝染病にその比を見ない。この牛疫を予防するために獣医の教育がフランスで始められ、日本も同様な理由で、明治初年に獣医教育が始められた。かように恐ろしい伝染病であるので、各国ともその予防液の研究に力を注いできた。

予防液の研究は常に日本が世界をリードしてきた。昔は、感染牛の分泌物や胆汁の注射あるいは、ウイルスと免疫血清との共同注射を行なつたが、蛸崎¹⁾はグリセリン不活化予防液をつくつたので、接種損失は皆無に近くなつた。これはウイルス死毒予防液として、世界最初のものであり、その後、人獣を通じてウイルスの死毒予防液が他

のウイルスでも作られるようになった。

蛸崎の死毒予防液は、予防期間がやや短かいので、さらに強力な予防液をつくるために弱毒変異ウイルスの研究が行なわれた。

中村ら^{2)~9)}が家兎に順化させた変異ウイルス、いわゆる家兎化ウイルスの作出に成功するに及んで、予防液の研究は一段落したかに見えた。すなわち、戦前においては、鮮満国境、蒙古、満州などにおいて、予防接種にこの株が用いられ、戦後には国際連合の斡旋によりアフリカや東南アジアにおいて応用せられた。

しかしながら、その後の研究によつて、牛の品種によつて家兎化ウイルスに対する感受性が異なることがわかり、この生ウイルスを予防液として使用する場合には、品種によつては反応が強すぎるということがわかつた。ここにおいて、中村ら¹⁰⁾¹¹⁾および著者ら¹²⁾¹³⁾は、家兎化ウイルスを発育鶏卵の漿尿膜の血管内に接種して継代し、さらに毒力が弱くて、しかも有効な鶏胎化ウイルスをつくる研究を行なつて、それに成功した。すなわち、家兎化ウイルスを発育鶏卵を連続通過させることにより、反応がさらに弱くて有効な変異株家兎化鶏胎化ウイルスを作出した。

一方、米国においては、第2次世界大戦中に、米国の獣医学研究者のみならず医学研究者を動員して、牛疫予防液の研究を強力に進め、牛系ウイルスの原株から鶏胎化株をつくることに成功し、Shopeら¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、およびJenkinsら¹⁷⁾は、その成績を報告している。著者の同僚石井ら¹⁸⁾も同様に、牛系の原株ウイルスを、発育鶏卵の漿尿膜上接種で継代して鶏胎化し、さらに卵黄のう内接種で継代して、YS株をつくつた。同僚の磯貝ら¹⁹⁾は、YS株をさらに発育鶏卵の静脈内接種で継代してIV株をつくつた。著者は、このIV株の病原性が非常に弱く、しかも有効であるので、生ウイルス予防液として、最も感受性の高い和牛にも、そのまま使用できることを実験的に証明した。

一般に人獣を通じて、生ウイルスを予防液として用いる場合には、その病原性が確実に減弱して

全く安全であること、宿主を通過しても病原性が復帰しないこと、および有効であることが必要条件である。安全性を検定する場合に、ウイルスを宿主に接種してその反応のいかんによつて安全であるかどうかを判定するより他に方法がないが、著者はこの方法のほかに、別の指標によつて、ウイルスが減毒していることを証明することができた。生ウイルス予防液は、接種されたのち宿主体内で増殖するために、死毒ウイルス予防液より強固の免疫を与えるので、ウイルスの増殖することは生ウイルス予防液の宿命であるが、このためにいろいろの反応がおきる。この反応の程度を臨床所見のみによつて比較するほかに、著者は、宿主体内におけるウイルスの増殖の程度を測定して、毒力の減弱を知ることができた。

生体内でのウイルスの増殖をみるには、分泌物や排泄物の中に排泄されるウイルス量を測定する方法もあるが、ウイレミーを起すものでは、ウイレミーを検査する方法が、最も簡単でしかも確実である。牛系ウイルスおよび変異牛疫ウイルスをそれぞれ牛に接種した場合に、病原性の強弱に比例してウイレミーの期間に長短のあることを知つた。また、鶏胎化ウイルスでも、YS株とIV株とでウイレミーの出現頻度に差のあることを知つた。この検査法は、ウイルスの減毒したことを、客観的に証明する1方法であることを知つた。人獣を通じて、生ウイルスを予防液として使用する場合には、そのウイルスが確実に減毒していることを検査する1方法として考慮に値すると思われる。また、ウイレミーも臨床症状も示さない接種牛が、補体結合抗体の証明によつて、免疫されていることを証明できた。一般には、中和抗体の証明によつて、免疫性を測るが、補体結合抗体の証明によつて、免疫性が測れるのは、きわめて興味深い。

また、同じ鶏胎化ウイルスでも、その継代経路によつて、すなわち、静脈内接種株と卵黄のう内接種株とによつて、牛に対する反応性のみならず、発育鶏卵に対する反応性の異なることを知つた。換言すれば、YS株とIV株とは、牛や発育

鶏卵に対する病原性が異なることを知った。このことは、一般にウイルスの卵予防液を作る場合に将来注目すべきことと思われる。

以上のことについて、ここに報告し、参考に供するとともに批判を仰ぎたい。

II. 実験材料

1. ウイルス

A. 牛疫ウイルス—釜山株

牛疫ウイルス—釜山株（牛系ウイルスと略称）は、元朝鮮総督府家畜衛生研究所（在釜山）において継代され、戦後当场で引き続き継代されている。このウイルスは数十年来、一貫して牛で継代し、和牛に対して、特徴的な牛疫症状と、100%の致死性を示す。本研究においては、主として、供試牛の免疫試験のために攻撃ウイルスとして用い、また、本ウイルス接種牛のウイレミー証明を行った。

B. 鶏胎化牛疫ウイルス—Y S株

牛系ウイルスより出発し、発育鶏卵の漿尿膜上接種で88代継代して後、さらに、卵黄のう内接種で継代して、発育鶏卵に順化させた石井ら¹⁰⁾の鶏胎化牛疫ウイルスである。

C. 鶏胎化牛疫ウイルス—I V株

磯貝ら¹⁰⁾がY S株の207代より出発し、発育12～13日令卵の漿尿膜の静脈内接種で継代を続けて、静脈内経路に適応させたウイルスであり、その162～179代間のウイルスを使用した。

D. 家兎化牛疫ウイルス

中村ら^{2)⑨)}の家兎化牛疫ウイルス中村Ⅲ系で、牛系ウイルスより出発し、家兎に継代することによつて、家兎に順化させたものであり、その1,000代前後のウイルスを試験の対照として使用した。

E. 家兎化-鶏胎化牛疫ウイルス

著者ら¹²⁾¹³⁾により作出された家兎化-鶏胎化牛疫ウイルス赤穂株で、家兎化ウイルスの897代より出発し、その継代当初において、家兎29代を交互に織りまぜて、発育鶏卵の静脈内に連続継代して順化させたもので、試験の対照として用いた。

2. 牛

当才、体重80～150 kgの黒毛和種の仔牛165頭、3才、体重300kg前後の黒毛和種の成牛2頭、および、当才、体重75～100 kgのホルスタイン種の仔牛5頭で、計172頭を使用した。

3. 家兎

牛系ウイルスおよび家兎化ウイルスを接種した牛のウイレミーの証明用に体重1.5～2.5 kg程度の白色日本種を、主として用いた。

4. 発育鶏卵

ウイルスの継代、供試用ウイルス材料の調製、感染牛のウイレミーの証明、ウイルス価の測定などに使用した鶏卵は、白色レグホン種の有精卵で、38℃に孵卵し、各試験の項で示すような所定の発育卵令に達したものをを使用した。

III. 実験方法

1. ウイルスの希釈液

供試用ウイルス材料の調製や希釈には、pH 7.2～7.4の磷酸塩緩衝食塩液（PBSと略記）、または、5～10%健康牛血清加PBSを主として使用し、1 ml当りストレプトマイシン1～5 mg、およびペニシリン100単位を加えた。

2. 発育鶏卵に対するウイルスの接種と培養期間

ウイルスの継代および諸試験には、つぎの2つの経路で接種し、培養した。

A. 静脈内接種法（I V接種と略記）

特別の試験を除いて、発育12～13日令卵を用い、漿尿膜の大きな静脈を選び、その部位において、三角形の小さな卵殻を卵殻膜より剝離し、流動パラフィンで卵殻膜を半透明にし、電光で透視しながら、静脈内にウイルス材料0.05mlを血流に沿つて接種し、固形パラフィンで封じて、38℃に通常4～6日間、主として5日間培養した。

B. 卵黄のう内接種法（Y S接種と略記）

特別に行なつた試験を除いて、発育4～6日令卵、主として5日令卵の気室の先端に開いた小孔から卵黄のう内に、材料0.5mlを接種し、孔を固形パラフィンで封じて、38℃に7～9日間培養した。

3. ウイルスの継代方法

鶏胎化牛疫ウイルス—IV株： 感染鶏胎児の脾の500~1,000倍乳剤を發育12~13日令卵にIV接種で継代し、継代に際しては、-40°Cに保存したウイルスを、ときどき取り出して継代した。試験には供試前2~3代の連続継代後のものを使用した。鶏胎児の感染の証明は、鶏胎児の脾、または肝の補体結合抗原証明(CF抗原証明と略記)によつた。

鶏胎化牛疫ウイルス—YS株： 感染卵の卵黄のうの100~1,000倍乳剤を發育5日令卵にYS接種で継代し、その継代は、IV株と同じく、ウイルス材料を-40°Cに保存し、ときどき継代した。供試する場合は、前もつて、2~3代連続継代して、ウイルス価の復帰を図つた。継代における鶏胎児の感染診断は、主として卵黄のうのCF抗原証明で行つた。

牛疫ウイルス—釜山株： 継代用ウイルス材料は、感染牛のリンパ節乳剤、または血液であり、-40°Cに保存し、ときどき取り出して、牛体を通過継代した。

家兎化ウイルス： 継代用ウイルス材料は、感染家兎の腸間膜根リンパ節乳剤、または血液であり、-40°Cに保存し、ときどき、家兎の静脈内に接種し、継代した。

家兎化-鶏胎化ウイルス： 継代材料は、感染鶏胎児の脾乳剤であり、-40°Cに保存して、鶏胎化ウイルス—IV株と同じ方法で、發育12~13日令卵にIV接種して継代した。

4. 鶏胎児に対する最小感染量の測定方法

感染鶏胎児諸材料の鶏胎児に対する最小感染量(EMIDと略記)は、つぎの方法で測定した。すなわち、10倍または100倍乳剤の2,500 rpm 15分間の遠心上液を、十進法で希釈し、希釈液ごとに12~13日令卵6~7個を用い、1卵当り0.05 mlをIV接種して、IV接種によるEMIDを測定した。また、希釈液ごとに5日令卵5~7個を用い、1卵当り0.5 mlをYS接種し、7~9日間培養して、YS接種によるEMIDを測定した。EMIDの測定にあたり、胎児の死では判定が不確実なので、両接種法とも、それぞれ所定期

間培養後、開卵して、生存卵のみの脾、肝および卵黄のう、または、そのいずれか1つ、あるいは、2つを接種材料群別に収集して、そのCF抗原の証明を行ない、CF反応陽性を感染とみなした。また、脾の腫脹および潮紅を観察し、感染診断の参考とした。EMIDは上記の方法で陽性と診断された最大希釈「 10^{-x} 」で示した。

なお、IV接種によるEMIDの測定において、鶏胎児材料、とくに脾の濃厚液(10^{-2})を發育鶏卵にIV接種すると、そのほとんどが、事故死をきたすので、通常IV接種によるEMIDの測定は、材料の 10^{-3} 以上の希釈液について行つた。

5. 牛に対する最小感染量の測定方法

感染鶏胎児材料(IV株)の牛に対する最小感染量(BMIDと略記)はEMID測定の場合と同様に調製した可検材料を十進法で希釈し、各希釈液ごとに、1 mlまたは0.5 mlをそれぞれ1頭ずつの牛の背部皮下に接種し、臨床症状の観察、および血中の補体結合抗体(CF抗体と略記)の証明を行なうとともに、一定期日後に牛系ウイルスで攻撃を行ない、反応のないものをIV株による感染陽性とした。攻撃接種に用いた牛系ウイルスは、感染極期の牛のリンパ節20倍乳剤1 mlを主として接種したが、まれには、1,000倍希釈液1 mlを接種した。各試験群ごとに对照牛をおき、攻撃ウイルスの牛に対する毒力を確認した。BMIDは上記の方法で、陽性と診断された可検材料の最大希釈「 10^{-x} 」で示した。

6. ウイルス接種牛の臨床観察

諸種の目的をもつて、感染鶏胎児の脾、または、全胎児の乳剤、あるいは、その乾燥ウイルスを接種した牛についての臨床所見としては、体温は毎日朝夕2回測定し、感染反応としての発熱の程度を表わすには、中村ら²⁰⁾²¹⁾の方法に準じて、発熱量を計算した。すなわち、著者の試験牛の大多数が仔牛であるため、39.5°C以上の体温上昇を発熱とみなし、0.1°C上昇ごとに1点を算えて、発熱期間中の点数和をもつて発熱量とした。しかし、発熱量は、 ≤ 10 を±、11~40を+、41~70

を卍, 71~100を卍, >100を卍として記録した。その他, 食欲の不振, 鼻漏, 眼瞼, 口腔内変状, 下痢など牛疫感染牛特有の症候に注意して観察した。

7. 補体結合反応

A. 可検材料の補体結合抗原証明

ウイルスの継代, 感染牛材料のウイルス証明, 鶏胎に対する最小感染量の測定などに用いた鶏胎材料のCF抗原証明は, 卵黄のうち, エーテル処理抗原について, 石井ら²⁰の方法に従がい, また, 肝, 脾では, デシケーターによる減圧乾燥抗原について, また, 感染牛のウイレミー証明に用いた家兎のリンパ節は, 煮沸抗原として, それぞれ中村²⁰の方法に従がい, 補体希釈法による80%結合価を求めて, <10を陰性, 11~20を疑陽性, >21を陽性として判定した。また, 牛のリンパ節では, 煮沸抗原について, 抗原希釈法で行ない, 中村²⁰の基準に従がつて判定した。

B. 牛の血清の補体結合抗体証明

供試牛のウイルス接種前および接種後, 各試験に示した期日に, それぞれ採血した血清について, 無加熱で10倍に希釈し, 中村²⁰の術式にしたがい, 補体希釈法によつて, その80%結合価を求め, <10を一, 11~20を±, 21~40を+, 41~60を++, 61~90を卍, >91を卍として記録した。

8. 中和試験

牛の血清中の中和抗体の証明方法については, 発育鶏卵を用いて, 中村ら²⁰および著者ら²⁰の方法に基づいて行なつた。すなわち, 血清をPBSで5倍に希釈し, IV株ウイルスを十進法で10倍希釈して, 両者を試験管内で等量に混合し, 2~4°Cで, 60分間ときどき振盪して感作させ, 発育12日令卵にIV接種して, 38°Cに5日間培養した。その鶏胎児の感染診断は, 鶏胎児脾のCF抗原を証明することによつて行なつた。中和価は, 可検血清混合ウイルスと対照の正常血清混合ウイルスの最小感染価の指数の差をもつて示した。

9. 感染牛のウイレミーの証明方法

牛系ウイルスおよび家兎化ウイルス接種牛群のウイレミー証明は, 家兎を用いて行なつた。すな

わち, 牛系ウイルス接種牛群では, 所定期日に採血した脱せん血の原液を, 2匹ずつの家兎を用い, その1~2mlを静脈内に接種し, およそ2週間後に家兎化ウイルスの攻撃を行なつて, 反応のないものを, 可検牛血中のウイルスによる感染陽性とした。また, 家兎化ウイルス接種牛群でも同様な方法で, 血液を家兎に接種して行なつた。家兎の感染診断は, 熱反応を示したものは, 攻撃接種を行なわず, 剖検所見のみで判定し, 無熱反応, または熱反応の疑わしいものにあつては, さらに家兎化ウイルスの攻撃接種の結果によつて判定した。

家兎化-鶏胎化ウイルスおよび鶏胎化ウイルスのIV株, または, YS株接種牛群のウイレミー証明は, 発育鶏卵を用いて行なつた。すなわち, 前述と同じように, 脱せん血液原液を, 発育4~5日令卵5~6個を一群として, 1卵あたり0.5mlずつ, 卵黄のう内に接種し, 38°Cに7日間培養した。その感染診断は, 脾, 肝, または, 卵黄のうをCF抗原証明を行なつて, CF陽性を発育鶏卵が可検血中のウイルスに感染したとみなした。

以上の方法によつて, 家兎または鶏胎児の感染が証明されたものを, 可検牛のウイレミー陽性とした。

IV. 試験成績

1. 鶏胎児に対する感染性

IV株の167, 170, 172代, および対照としてのYS株の334, 340代の感染鶏胎脾について, それぞれIVおよびYS両接種法で, EMIDを比較測定した(第1表)。

第1表に示すように, YS株を用いて行なつた2回の対照試験では, その本来の継代経路である発育5日令卵にYS接種で測定したEMIDが, 発育12日令卵にIV接種で測定したEMIDより2ケタ以上高い価を示した。しかるに, IV株を用いて行なつた3回の試験では, 両接種による測定値が, 同価か, またはIV接種によるEMIDが, YS接種によるEMIDよりも, 1ケタ高いウイルス価を示した。

IV接種でEMIDを測定した場合, IVとY

第1表 静脈内および卵黄のう内の両接種法で測定した鶏胎児に対する最小感染量の比較

ウイルス		鶏胎児に対する 最小感染量*	
株別	累代数	静脈内接種 による測定	卵黄のう内接種 による測定
I V株	167	10^{-5}	10^{-5}
	170	10^{-6}	10^{-5}
	172	10^{-5}	10^{-4}
Y S株	334	10^{-3}	10^{-4}
	340	10^{-3}	10^{-5}

* 10^{-3} は 10^{-3} 希釈液に感染が証明されない

Sの両株間に、このような成績の差ができたことは、I V株が、Y S株より出発し、I V接種で継代されたことによつて、I V接種でもよく感染するようになったことを意味する。しかし、一方、Y S接種でEMIDを測定した場合、両株間に差異がみられなかつたことは、鶏胎児に対するY S接種での感染性が、I V接種継代されても、変らなかつたことを示している。

2. 鶏胎児に対する病原性

A. 感染鶏胎児の脾の病変

I V接種による感染群について： I V株をI V接種で感染させた鶏胎児脾は、特徴的な病変を示す。すなわち、I V株 167~179代の感染鶏胎児脾乳剤の500~1,000倍希釈液を、発育12日令卵にI V接種したのち、5~6日(17~18日令卵)後に開卵してしらべた脾の重量、Y S株 339代および341代の感染卵黄のう乳剤の500倍希釈液を12日令卵にI V接種したのち、6日目(18日令卵)に開卵した脾の重量、また、健康鶏胎児の脾乳剤の500倍希釈液を接種した同令卵、および無処置で孵卵した同令卵の脾の重量とを比較してみると、第2表のようである。

I V株に感染した鶏胎児脾の平均重量は、26.7mgであつて、感染脾個々についてみると50mgを越えるものもあり、その腫脹および色調は、まちまちである。これらの色調は橙色、あるいは暗赤色を呈し、脾質は脆弱である。Y S株に感染した鶏胎児の脾の平均重量は16.9mgであり、I V株にくらべて、腫脹および潮紅も軽度であつた。しか

第2表 静脈内接種による感染鶏胎児と健康鶏胎児との胎脾重量の比較

試験別	接種材料		鶏胎児脾	
	株別	累代数および材料	検査数	平均重量(mg)
感染群	I V株	167~179, 胎脾乳剤	280	26.7
	Y S株	339, 341, 卵黄のう乳剤	26	16.9
対照群	健康鶏胎児の脾乳剤		38	8.9
	(接種しない)		33	8.4

し、健康脾乳剤を接種した対照群および無処置の発育鶏胎児の脾には、この種の腫脹および潮紅がみられなかつたので、これらの病変は、感染による特異的なものと考えられる。

Y S接種による感染群について： I V株およびY S株の感染材料を5日令卵にY S接種し、7日間培養した感染鶏卵(12日令卵)の胎児脾の病変は、両者の間に差異が認められない。しかし、健康卵の脾にくらべて、3~4倍程度の腫脹および潮紅がみられる。

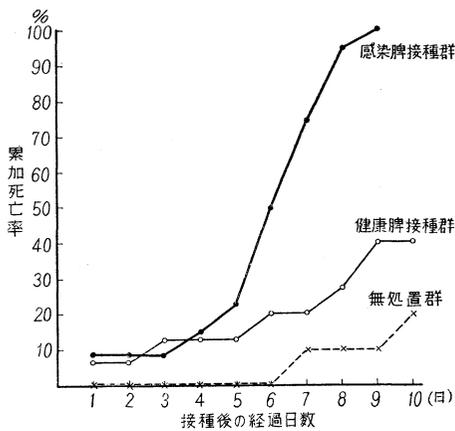
B. 感染鶏胎児の死亡率

I V株の168代(I V接種によるEMID, 10^{-5})、172代(同, 10^{-5})、および175代(同, 10^{-6})での感染鶏胎児脾の乳剤の500倍希釈を、発育12日令卵に、それぞれI V接種し、毎日検卵して、その死亡状態を観察した。供試卵数は各試験とも30個であつた。また、各試験群の培養5日目の生存卵のI V接種によるEMIDを、それぞれ測定した。対照として、健康鶏胎児の脾乳剤の500倍希釈液接種群(30個)、ならびに無処置孵卵群(10個)も同様に観察した。なお、死亡卵については、細菌検査を行なつて、無菌であることを証明するとともに、脾の特異的な病変により、ウイルスによる感染死なることを確認した。

感染脾接種群の死亡状態は、3群ともほぼ同一傾向を示したので、その平均死亡率および対照としての健康脾接種群、無処置群の死亡率を経日的に累加計算し、百分率をもつて、第1図に示した。

感染脾接種群および健康脾接種群の第1日目の

第1図 脈管内接種による感染鶏胎児の死亡率



検卵において、それぞれ 8.4% および 6.4% の死亡を示しているが、これらは接種損失（主として、出血死）とみなした。培養歴日の死亡状態は、感染群では、接種後 6 日目より急速に増加し、9 日目には 100% に達した。対照試験の健康脾接種群では、日令が進むにつれて緩慢に増加し、孵化直前に、ややすみやかに上昇して 40% に達し、60% が孵化した。また、無処置群では試験開始より 10 日目、すなわち、卵令 22 日目に 20% に達し、他は孵化した。

なお、感染脾を接種した 3 群の接種 5 日目の生存卵の脾における I V 接種による EM I D は、それぞれ 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-5} を示し、死亡卵の細菌検査は、いずれも陰性、および脾の特異病変のあったことから、各群とも、死亡したものは、本ウイルスによる感染によると思われる。

I V 株の Y S 接種による感染鶏胎児の死亡については、特別な試験を行なわなかったが、他の目的で行なった試験において、培養 8 日目におよそ 20~30% に達し、以後、急速に増大する傾向がみられ、磯貝ら²⁰⁾が報じている Y S 株の Y S 接種による感染卵の死亡状態と大差ないように思われた。

3. 鶏胎児におけるウイルスの増殖態度

試験 1 では、I V 株 168 代感染鶏胎児脾 (I V 接種による EM I D, 10^{-5}) の乳剤の 500 倍希釈液を、10 日、12 日、15 日令卵に、それぞれ I V

接種し、一方、5 日、7 日、9 日令卵に、それぞれ Y S 接種し、経日的に 3~5 個の生存卵を開いて、その脾の I V 接種による EM I D を測定した。試験 2 では、I V 株 172 代の感染鶏胎児脾 (I V 接種による EM I D, 10^{-5}) の乳剤の 500 倍希釈を、12 日令卵に I V 接種し、また、5 日令卵に Y S 接種して、経日的に 3~5 個の生存卵の脾および胎児体 (頭、翼、肢を除く) の I V 接種による EM I D を測定した。また、I V 接種群では、培養 7 日目、Y S 接種群では、培養 9 日目の死亡卵について、同様な方法で、I V 接種による EM I D を測定した。その成績は、第 3 表で示すように、つぎの 5 つのことがわかった。

(1) 接種卵の卵令とウイルス増殖との関係について

I V 接種群における胎脾の最高ウイルス価は、10 日令卵では 10^{-6} 、12 日令卵では 10^{-5} であり、15 日令卵は著しく低く、 10^{-3} であつた。また、Y S 接種群においては、5 日令卵および 7 日令卵が 10^{-5} であり、9 日令卵は 10^{-4} であつた。すなわち、両接種群とも卵令の若いものに、高い価が得られる傾向が明らかである。なお、I V 接種群では 10 日令卵、Y S 接種群では 5 日令卵が最もよい成績を示した。これらの成績から、これよりさらに若い卵を用いたとき、なお一層高い価が得られるのではなからうかと想像されるが、著者の経験によると、10 日令より若い卵に I V 接種し、また、1~3 日令卵に Y S 接種することは、技術的に卵の損失が多いので、ウイルスの増殖のいかにかわらず、実用的価値は薄い。

(2) 接種の経路とウイルスの増殖との関係について

I V と Y S の両接種群について最高のウイルス価をくらべてみた。I V 接種群においては、試験 1 の 10 日令卵では最高価 10^{-6} 、12 日令卵では 10^{-5} 、試験 2 の 12 日令卵では 10^{-5} を示した。Y S 接種群では、試験 1 の 5 日、および 7 日令卵、試験 2 の 5 日令卵を用いたとき、いずれも 10^{-5} を示した。すなわち、I V 株の増殖に関しては、ウイルス価が最高に達したときをみれば、I V、Y S

第3表 発育鶏卵内におけるIV株ウィルスの増殖

試験別	ウィルスの接種		可検組織	接種後の培養期間別のウイルス価*				
	方法	卵の日令		3日	5日	7日	9日	11日
1	静脈内	10	胎児脾	10^{-5}	10^{-6}	10^{-6}	NT	NT
		12		10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	NT	NT
		15		10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	NT	NT
	卵黄のう内	5	胎児脾	NT	NT	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}
		7		NT	NT	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}
		9		NT	NT	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}
2	静脈内	12	胎児脾	10^{-4}	10^{-5}	10^{-5} (10^{-3})	NT	NT
			全胎児体	10^{-3}	10^{-4}	10^{-4} (10^{-3})	NT	NT
	卵黄のう内	5	胎児脾	NT	NT	10^{-4}	10^{-5} (10^{-3})	10^{-5}
			全胎児体	NT	10^{-3}	10^{-4}	10^{-4} (10^{-3})	10^{-3}

* 10^{-3} : 10^{-3} 稀釈液に感染が証明されない。
 (10^{-3}), (10^{-3}) : 死亡鶏胎材料のウイルス価。
 NT : 試験しなかつた。

両接種経路による差は、ほとんど認められなかつた。

(3) ウィルスの増殖と培養期間との関係について

IV接種群について、試験1では10日令卵を用いたとき、接種後5日目および7日目の測定に最高価 10^{-6} を示し、12日令卵を用いたときは、接種後3日目より 10^{-5} を示したが、その後の上昇はみられなかつた。また、試験2では、5日目および7日目に、それぞれ最高価 10^{-5} を示している。一方、YS接種群についてみると、試験1では、各令卵群とも、7日目の測定にすでに最高価を示し、11日目、または9日目まで、それぞれ持続している。試験2では7日目、または9日目に至つて、最高価に達した。既述のごとく、発育卵の感染による死亡が、IV接種では6日目より、また、YS接種では8日目頃より、それぞれ急速に増大することをあわせ考えると、予防液などのようにウイルスを大量に採材する時期は、IV接種群においては、5日目、YS接種群において

は、7日目が適当と考えられる。

(4) 脾と全胎児体におけるウイルス濃度

感染胎児の脾と全胎児(頭、翼、肢を除く)のウイルス濃度とを比較すると、IV接種でも、YS接種でも、通常、全胎児は脾よりも1ケタ低い価を示した。

(5) 感染死亡卵におけるウイルス濃度

試験2において、IV接種後7日目、YS接種後9日目の生存卵と死亡卵のそれぞれの脾および全胎児体について、IV接種によるEMIDを同時に測定した。死亡卵は前日の夕刻の検卵で生存が確認され、翌朝の検卵で死を発見したもので、死後およそ16時間以内孵卵器内に放置されたわけである。なお、死亡卵の細菌検査は陰性であり、脾は本ウイルス感染の特徴的な病変を示し、CF抗原証明は陽性であり、感染死と考えられた。しかるに、そのIV接種によるEMIDは、表示のごとく、生存卵が、IV接種群では 10^{-5} 、 10^{-4} また、YS接種群では 10^{-5} 、 10^{-4} のウイルス価を示したのに対し、それに対応する死亡卵の価

は、IV接種群では $<10^{-3}$ 、 10^{-3} また、YS接種群では $<10^{-3}$ 、 $<10^{-3}$ であり、死亡胎内のウイルス量は、死亡胎児の自家融解等の影響を受けて、急速に減ずるものようである。

4. 鶏胎児と牛に対する最小感染量の比較

牛を用いての諸種の試験を進める上に、供試ウイルスの牛に対する最小感染量 (BMID と略記)を知る必要を生ずる。しかし、経済的にいつでも、試験ごとにBMIDを測定することは困難である。そこで、IV接種によるEMIDを測定し、それをもつてBMIDを知ることができるか否か、すなわち、IV接種によるEMIDとBMIDとの間に一定の関係があるか否かを知るために本試験を行なった。

牛は、ホルスタイン種仔牛 (試験1) および和種仔牛 (試験2~6) を用いて、6回の試験を行なった。供試ウイルスは、IV株 162代の感染鶏胎児体 (頭、翼、肢を除く) の生材料 (試験1) および 163~172 代の感染鶏胎児体乳剤の凍結乾燥後保存したもの (試験2~6) であり、pH 7.2~7.4 のPBSでそれぞれ100倍乳剤を作り、2,500rpm、15分間の遠心上清を、さらに十進法で減希釈して、型のごとく、0.05mlを発育鶏卵にIV接種して、IV接種によるEMIDを測定し、同時に、1希釈液につき1頭の牛を用い、1ml (試験1, 2)、または0.5ml (試験3~6)を皮下接種して、BMIDを測定した。なお、牛に対する感染診断は、型のごとく、ウイルス接種後21日目 (試験1, 2, 6)、および88日目 (試験3~5)にそれぞれ牛系ウイルスで攻撃接

種して、その結果で判定した。すなわち、牛系ウイルスの攻撃接種を受けた場合に、IV株で感染したものは無症状で耐過し、IV株で感染しないもの、すなわち、最小感染量より少い量を接種したものは、牛疫の特徴的な症状をともなつて死亡した。前者を可検ウイルス (IV株) の感染陽性、後者を感染陰性として、第4表に示した。

表示のように、各試験とも、IV接種によるEMIDとBMIDは例外なく、平行関係を示した。すなわち、このIV株を用いての研究において、IV接種によるEMIDを測定することによって、牛に接種されたウイルス量を類推できることがわかつた。

鶏胎児と牛における最小感染量の関係を具体的且つ明確に表わすため、鶏胎児の最小感染量をEUをもつて表現し、牛の接種量から計算して、換算してみると、牛に対する最小感染量は、試験1, 2においては、牛接種量が1mlであるので、20EUとなり他の試験においては、0.5ml接種であるので、10EUに相当する。

5. 牛に対する病原性

IV株、162~172 代間のウイルスを用い、和種の仔牛30頭、同成牛2頭およびホルスタイン種の仔牛4頭について試験した。各ウイルスについては、牛に接種すると同時に、鶏胎児に対する最小感染量を測定し、ウイルスの接種量は、前項に従がいEUをもつて示した。試験成績を接種ウイルス量別にまとめて、第5表に示した。

免疫試験の結果からみると、10EU以上のウイルス量を接種した牛は、全例感染していたと判定

第4表 鶏胎児および牛に対する最小感染量の比較

試験番号	ウイルスの累代数	鶏胎児に対する感染価					牛に対する感染価				
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	162		+	-	-		+	+	-	-	
2	163		+	+	-	-		+	+	-	-
3	166		+	-	-		+	+	-	-	
4	168		+	-	-	-		+	-	-	-
5	170		+	-	-	-		+	-	-	-
6	172		+	+	-	-		+	+	-	-

+: 感染 -: 不感染

第5表 牛におけるIV株の接種量と臨床症状および免疫率との関係

牛		接種ウイルス量 (EU)	潜伏期 (平均日)	発熱率	発熱程度					発熱期間 (平均日)	最高体温 (平均)°C	発熱量 (平均)	牛系ウイルスに対する免疫率
種類	頭数				卍	卅	+	±	—				
和種仔牛	12	1/100~2	•	•*	0	0	0	0	12	•	•	•	0/12
	5	10~20	•	0/5	0	0	0	0	5	•	•	•	5/5
	9	100~200	5.4	4/9	0	0	3	1	5	2.3	40.3	20.8	9/9
	2	2,000	•	0/2	0	0	0	0	2	•	•	•	2/2
	2	20,000	•	0/2	0	0	0	0	2	•	•	•	2/2
和種成牛	2	200	•	0/2	0	0	0	0	2	•	•	•	2/2
ホルスタイン種仔牛	2	2/10~2	•	•*	0	0	0	0	2	•	•	•	0/2
	2	20~200	•	0/2	0	0	0	0	2	•	•	•	2/2

*: 感染が証明されていないので発熱率の計算から除外した

EU: 鶏胎児に対する感染単位をあらわし、たとえば10EUは、その10倍量を示す。以下各表に共通す。

第6表 牛におけるYS株の接種量と臨床症状および免疫率との関係

牛		接種ウイルス量 EU	潜伏期 (平均日)	発熱率	発熱程度					発熱期間 (平均日)	最高体温 (平均)°C	発熱量 (平均)	牛系ウイルスに対する免疫率
種類	頭数				卍	卅	+	±	—				
和種仔牛	6	2,000	4.9	6/6	3	3	0	0	0	3.8	41.0	70.3	6/6
	2	20,000	4.9	2/2	1	0	1	0	0	3.5	40.6	67.0	2/2
	平均		4.8	8/8	4	3	1	0	0	3.8	41.0	69.5	8/8
ホルスタイン種仔牛	1	2,000	•	0/1	0	0	0	0	1	•	•	•	1/1

される。IV株接種後に認め得た感染牛の臨床反応は、熱反応がまれにみられたのみで、他の症状は全くみられなかつた。熱反応についてみると、無熱で経過するものがほとんどで、和種仔牛では77.8%、同成牛およびホルスタイン種仔牛では100%であつた。熱反応は非常に軽く、+および±程度が、それぞれ16.7%および5.5%みられたに過ぎなかつた。発熱例4頭における潜伏期は4~6日で、平均5.4日であつた。発熱期間中の最高体温は40°C前後で、その平均は40.3°Cであり、発熱期間は2~3日程度で、その平均は2.3日であつた。発熱量は14~27で、平均は20.8であつた。発熱した牛にあつても、ほか症状は全くみられなかつた。発熱した4頭は、200EUの同一ウイルスを接種した同一試験群6頭中にみられた。

接種ウイルス量と感染との関係を牛系ウイルス攻撃に対する免疫性獲得の成績によつてみると、

和種仔牛でもホルスタイン種仔牛でも、1/100~2EUでは免疫が成立しないが、10EU以上のウイルス量の接種例では100%の免疫を示していたので、感染の限界も10EU接種牛までであつたと考えられる。

以上のことは、IV株の牛に対する最小感染量は、鶏胎児に対する最小感染量の10倍に相当し、病原性が著しく減弱していながら、なお強い感染性と確実なる免疫原性を保持していることを示している。

つぎに、対照として、IV株の原株であるYS株の220~333代間のウイルスの牛に対する病原性を観察した。試験した牛は、和種仔牛8頭およびホルスタイン種仔牛1頭であつて、その成績を接種ウイルス量別にまとめると、第6表のごとくである。

主な臨床症状は、発熱と食欲不振であつた。こ

これらの牛は牛系ウイルス攻撃による免疫試験で免疫を立証しており、YS株に感染していたと判断される。熱反応は和種仔牛においては全例にみられ、ホルスタイン種仔牛は無反応で経過した。和種仔牛における潜伏期は4～5.5日で、平均4.8日であつた。発熱期中の最高体温は、40.1°Cの軽微なるものも1例はあつたが、ほかはいずれも41.0°C前後の高熱であり、平均最高体温は41.0°Cであつた。発熱期間は2～6日間で、平均3.8日間であり、発熱量は17～117とかなりまちまちであつたが、平均は69.5であつた。熱反応の程度の高いものうち、数例には2～3日間の食欲不振を示したものがみられ、1例には下痢さえみられた。試験の範囲内では、臨床反応の強さや頻度とウイルス量あるいは継代数との間には明確なる関連性を見出すことはできなかつた。和種仔牛とホルスタイン種仔牛の間には、明らかな抵抗性の差が見られた。

以上の成績を通覧し、IV株とYS株の和種仔牛に対する病原性の強さを比較してみると、第7表のごとくなる。すなわち、供試IV株は、既述のようにYS株207代より出発して、IV接種により継代されてきたもので、その162～172代間のウイルスであり、YS株は220～333代間のウイルスで、IV株と207代において分れてから引き続きYS経路のみで継代されたものである。さて、両者間の差についてみると、潜伏期はIV株(5.4日)がYS株(4.8日)にくらべてやや長く、熱反応はIV株は発熱例22.2%で、その程度もきわめて軽微であるのに、YS株は発熱例100%で程度も重い例(卅)が多い。発熱期間、最高体温、発熱量いずれもIV株はYS株よりも遙かに小さい。それにもかかわらず、免疫度は両者

とも100%で差異がなかつた。

以上の事実は、YS株より出発し、IV接種で継代を続けられたIV株は、牛に対する病原性が著しく軽度で、YS株との間に明確なる差異があることを示した。

IV株感染牛における剖検変状を和種仔牛8頭について調べた。接種ウイルス量は200EU(1例)、1,000EU(1例)、4,000EU(6例)であり、確実に感染せしめ得る量であつたが、これらの試験牛にはいずれも臨床症状が全く認められなかつた。ウイルス接種後6～12日の間に行なつた剖検で、諸臓器、消化管ともに肉眼的変状を全く認め得なかつた。

6. 牛体内におけるウイルスの消長

牛の最小感染量の400倍に相当する4,000EUのウイルスを接種した5頭の和種仔牛について、種々の経過日に、血液および表在リンパ節を採取し、血液は脱せんし、リンパ節は3～5倍薬剤となし、5日令発育鶏卵にYS接種して、ウイルスの証明を行なつた。その成績は第8表に示すように、59—29号牛では、接種後4、5、6日目のリンパ節および5、6日目の血液に、また、59—52号牛では7日目のリンパ節および血液の両者に証明され、59—30号牛では6日目、60—5号牛および60—6号牛では5日と7日目のリンパ節にのみ、ウイルスが証明された。なお、これらの摘出リンパ節については、CF抗原の証明を行なつたが、すべて陰性であつて、一般に牛疫ウイルスの好増殖臓器であるとされているリンパ節においてさえ本ウイルスの増殖の程度は低いことが示された。牛系ウイルスはもち論のこと、諸種の変異牛疫ウイルス接種牛においては、ウイレミーがみられるのが普通であるのに、IV株ウイルス接種牛

第7表 IV株およびYS株に感染した和種仔牛の熱反応比較

ウイルス	試験牛の頭数	潜伏期(平均)日	発熱率%	発熱程度(%)					発熱期間(平均)日	最高体温(平均)°C	発熱量(平均)	免疫率%
				卅	卍	+	±	—				
IV株	18	5.4	22.2	0	0	16.7	5.5	77.8	2.3	40.3	20.8	100
YS株	8	4.8	100	50.0	37.5	12.5	0	0	3.8	41.0	69.5	100

第8表 ウィルス接種和種仔牛におけるリンパ節および血液のウィルス証明

牛	可検材料	成 接 種 後 の 経 過 日 数 [*]											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
59-29	リンパ節				+	+	+		-		-		-
	血液				-	+	+	-	-	-	-		-
59-30	リンパ節				-	-	+		-		-		-
	血液				-	-	-		-		-		-
59-52	リンパ節	-	-	-		-		+		-		-	
	血液	-	-	-	-	-	-	+		-		-	
60-5	リンパ節	-	-	-		+		+		-		-	
	血液	-	-	-	-	-	-	-		-		-	
60-6	リンパ節	-	-	-		+		+		-		-	
	血液	-	-	-	-	-	-	-		-		-	

*: + はウィルス証明陽性, - はウィルス証明陰性

第9表 牛系ウィルスおよび各変異株の和種仔牛におけるウイレミーの出現率

試験別	ウィルス	供試牛数	出現率 %
試験群	鶏胎化ウィルス—IV株	6	33.3
対照群	鶏胎化ウィルス—YS株	28	64.3
	家兎化—鶏胎化ウィルス	11	54.5
	家兎ウィルス	22	100
	牛系ウィルス	22	100

(感染極期における1-2回の検査成績である。)

で、これが見られない場合が多いことも、また感染が軽微である一証左であろう。

しかし、牛体内において、ウィルスは接種後およそ4~7日頃、明らかに増殖していることは確実である。

7. 牛系ウィルスおよび各種変異株接種牛におけるウイレミーの比較

牛系ウィルスおよびその変異株の家兎化ウィルス、家兎化—鶏胎化ウィルス、鶏胎化ウィルス—YS株をそれぞれ接種した和種仔牛のウイレミーの出現を検査し、IV株のウイレミー出現と比較検討した。各ウィルスのウイレミーの発現頻度について、多数例の和種仔牛を用い、その感染極期

第10表 牛系ウィルスおよび各変異株の

試験別	ウィルス	牛	熱反応	転 帰 (経過日数)	ウィルスの証明用動物
試験群	鶏胎化ウィルスIV株	59-52	-	耐 過	鶏胎児
		59-29	-	〃	
対照群	鶏胎化ウィルスYS株	BA-8	+	〃	
		BA-7	+	〃	
	家兎化—鶏胎化ウィルス	57-25	+	〃	
		57-28	+	〃	
	家兎ウィルス	C-19	+	〃	
		49-33	+	〃	
	牛系ウィルス	54-1	+	〃	
		50-53	+	死(11)	
		55-19	+	〃(8)	
		54-5	+	〃(7)	
54-7	+	〃(6)			

*: + はウィルス証明陽性,

と推定される時期に採取した血液のウイルス証明を、牛系ウイルスおよび家兎化ウイルス接種牛群においては家兎を使用し、家兎化—鶏胎化ウイルス、鶏胎化ウイルス—Y S株およびI V株については発育鶏卵を用いて、それぞれ型のごとく行ない、第9表に示したような成績を得た。

表示のように、各ウイルス接種牛群のウイレミー証明率は、牛系ウイルスおよび家兎化ウイルス接種牛群においては、それぞれ100%、家兎化—鶏胎化ウイルス接種牛群にあつては、54.5%、鶏胎化ウイルス—Y SおよびI V両株接種牛群にあつては、それぞれ64.3%および33.3%であつた。

すなわち、各株ウイルスの病原性の強さと、ウイレミーの出現頻度との間に、明確な平行関係がみられる。

つぎに、出現したウイレミーの持続期間を検討した。各ウイルス接種後、経日的に採血し、その脱せん血液につき、牛系ウイルスおよび家兎化ウイルス接種牛群においては家兎を用い、また、家兎化—鶏胎化ウイルスおよび鶏胎化ウイルス—Y S株接種牛群にあつては、発育鶏卵を用い、型のごとくウイルスの証明を行なつた。これらの成績と、上述の鶏胎化ウイルス—I V株のウイレミー陽性の2例を比較的に配列して第10表に示した。

表示のように、牛系ウイルス接種牛群は、いずれも重篤なる症状をとらない、急性経過で死亡の転帰をとり、それらの牛のウイレミーも、接種後2日、または3日目より出現し、死に至るまで証明された。家兎化ウイルス接種牛群では、牛系ウイルス接種牛群にくらべて、長期の経過をとり、その臨床症状もかなり重く、1例は接種後11日目に死亡したが、他の2例は回復した。そのウイレミーの出現は、牛系ウイルス接種牛群にくらべて、やや遅れ、接種後3~4日目より始まり、出現期間も症状に平行して長く、死亡例にあつては死に至るまで、回復例にあつては下熱後1~2日目まで存続した。家兎化—鶏胎化ウイルス接種牛群においては、中等度ないし軽度の熱反応を示したが、ウイレミーの出現の時期は、家兎化ウイルス接種牛群よりさらに遅れ、接種後5日目以降であり、存続期間もまた短かく、1~5日間であつた。鶏胎化ウイルス—Y S株接種牛群における臨床症状は、中等度あるいは軽度の熱反応であり、ウイレミーの出現の時期および持続期間は、家兎化—鶏胎化ウイルスとはほぼ同様で、接種後5~6日目に出現し、持続期間は3~4日であつた。I V株接種牛群では、前項に述べたごとく、5~7日目に出現し、持続期間は、家兎化—鶏胎化ウイ

和種仔牛におけるウイレミーの持続期間

成績*														
接種後の経過日数														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	+	+						
		-	-	+	+	+	-	+			-			
		-	+	+	+	+	+		+	+			-	
	-		+	+	+	+	+		+	+	-			
		+	+	+	+	+	+		+	+				
	-	+	+	+	+	+	D							
	-	+		+	+	D								
	+	+		+	+	+								

- はウイルス証明陰性、D は死亡

第11表 I V株接種牛における補体結合抗体と接種ウイルス量との関係

接種ウイルス量(EU)	牛			補体結合抗体の証明							
	種類	頭数	発熱率	卍	卍	卍	十	士	一	陽性	
1/100~2	和種仔牛	15	0/12	0	0	0	0	0	12	0/12	
10~20		5	0/5	5	0	0	0	0	0	5/5	
100~200		9	4/9	6	1	0	2	0	0	9/9	
2,000		2	0/2	2	0	0	0	0	0	2/2	
20,000		2	0/2	1	1	0	0	0	0	2/2	
200	和種成牛	2	0/2	2	0	0	0	0	0	2/2	
2/10~2	ホルスタイン種仔牛	2	0/2	0	0	0	0	0	2	0/2	
20~200		2	0/2	1	0	0	1	0	0	2/2	
(合計)				17	2				3	14	•
牛系ウイルスに対する免疫率				22/22					0/14	•	

ルスおよびY S株接種牛よりやや短かく、1~2日間であつた。以上の成績を通覧して牛系ウイルスおよびその変異ウイルスのウイレミー出現の様相は、各ウイルスの病原性の強さ、いい換えれば接種された牛の症状の強さに平行的な関係がみられる。

牛疫各ウイルスの牛に対する病原性の強さは、接種された牛の臨床症状の程度によつても示されるが、ウイレミーの出現頻度および持続期間によつてもわかる。

8. 補体結合抗体の産生

I V株接種後におけるCF抗体の産生を調査した。牛は和種仔牛30頭、同成牛2頭、およびホルスタイン種仔牛4頭であり、接種ウイルス量は1/100~20,000EUの種々の量であつた。一般にCF抗体が最高に達する接種後2~3週間の時期の血清について検査した。CF反応の成績を、接種ウイルス量群別に配列して、第11表に示した。

これらの試験牛については、いずれも牛系ウイルスで、攻撃接種を行なつたが、その結果22頭は免疫を示し、他の14頭は免疫していなかつた。この成績はCF抗体証明成績と一致し、2EU以下のウイルス接種では、免疫の面から感染が否定されるばかりでなく、CF抗体の産生も陰性である。

CF反応陽性例の抗体についてみると、強陽性卍が 17/22 (77.3%), 卍が 2/22 (9.1%), +が 3/22

(13.6%)であつた。和種仔牛と同成牛およびホルスタイン種仔牛とCF抗体の強さの関係についてみると、試験の範囲内では、年令および品種の差異によつては、なんらの影響を認め得なかつたが、和種成牛およびホルスタイン種仔牛の試験例数が少ないので結論的なことはいえない。接種ウイルス量とCF抗体価との関係については、1度感染が成立した場合は、接種ウイルス量が産生される抗体の強さに、なんらかの影響を有するような傾向は見受けられず、抗体価の強弱は、むしろ牛自体の個体差によると思われた。しかし、臨床症状を示したような牛には、常に高い抗体価がみられた。

つぎに、CF抗体の出現時期を知るために、ウイルス接種後、経日的に採血し、CF抗体証明を行なつた。牛は、和種仔牛19頭、同成牛2頭、お

第12表 ウイルス接種量と補体結合抗体出現時期との関係

牛		接種ウイルス量(EU)	抗体出現時期(接種後の平均日数)
種類	頭数		
和種仔牛	4	10~20	16.2
	8	100~200	14.2
	6	2,000~4,000	11.9
	1	20,000	12.0
和種成牛	2	200	13.5
ホルスタイン種仔牛	1	20	21.0
	1	200	12.0

よびホルスタイン種牛2頭であつた。その成績は第12表に示すように、比較的多数例について試験ができた和種仔牛についてみると、接種ウイルス量と抗体出現時期との間に一定の傾向がみられた。すなわち、接種ウイルス量が10~20 EUという牛に対する最小感染量のレベルでは、14~21日目、平均16.2日目に出現し、接種量100~200 EUの場合は、平均14.2日、さらに、2,000~4,000 EUにおいては、平均11.9日、20,000 EU接種では12日目にCF抗体の出現が証明された。

臨床症状の有無とCF抗体出現時期との関係を検討してみると、臨床症状を示した4例の抗体出現時期は、11~14日とほぼ一定していたが、臨床的に無反応の牛では、11~21日とまちまちであつた。また、CF価の低い例は、抗体出現時期がおくれる傾向がみられた。

9. I V株ウイルスの凍結乾燥およびその保存試験

A. 凍結乾燥の方法

I V株を型のごとく、発育鶏卵にI V接種し、感染極期の全胎児体(頭、翼、肢を除く)を、ホモゲナイザーで挫碎し、1%ブドウ糖液で50%乳剤をつくり、その1,500 rpm 10分間の遠心上液を、2 ml 容量のアンプルに0.4 ml ずつ分注し、ドライアイス・アルコール中で、廻転しながら、アンプルの内壁にほぼ均一なフィルム状に凍結させた後、直ちに真空乾燥した。乾燥機はEdwardsの2A/153型機であり、吸湿剤は被乾燥材料のおよそ11倍量の五酸化燐である。到達真空度は $5 \sim 2 \times 10^{-2}$ mmHgで、室温(20~25°C)で操作し、乾燥時間は20時間であつた。製品の含湿度は、Abderhalden法による定温減圧乾燥法で測定した。

B. 乾燥ウイルスの保存試験

I V株151, 154, 156, 158代ウイルス感染鶏胎児体(頭、翼、肢を除く)を前述の方法で乾燥し、4バッチを作つた。乾燥前材料のI V接種によるEMIDは 10^{-5} (No. 1~No. 5)および 10^{-6} (No. 4)であり、乾燥後は、いずれも1ケタ落ちて、 10^{-4} または 10^{-5} であつた。乾燥ウ

イルスの含湿度は1.96~2.67%であつた。

これらの乾燥ウイルスについて、つぎの保存試験を行なつた。

(1) 0~5°Cおよび-40°C保存

各バッチのアンプルを0~5°Cおよび-40°Cに保存し、前者については、種々の経過後(第13表参照)、また、後者にあつては約1カ年保存後、それぞれ2アンプルずつ取り出し、PBSで懸濁液を作つて、混合し、型のごとくI V接種によるEMIDを測定した。その成績は第13表で示すように、0~5°C保存において、No. 1は乾燥直後、I V接種によるEMIDが 10^{-4} であつたものが、保存7日目では 10^{-3} 、270日目に 10^{-3} 以下となつた。No. 2(乾燥直後 10^{-4})は21日目に 10^{-3} となり、360日後に 10^{-3} 以下となつた。No. 3(乾燥直後 10^{-4})は、14日までは 10^{-4} を保持したが、30日目では 10^{-3} となり、その後同価を保ち、360日目に 10^{-3} 以下となつた。また、No. 4(乾燥直後 10^{-5})は、7日目では 10^{-4} となり、120日目までは 10^{-4} を保つたが、210日目では 10^{-3} となり、360日後の測定でもなお同価 10^{-3} を保持していた。一方、-40°C保存では、1カ年の保存で、No. 3は乾燥直後と同価の 10^{-4} を保つていたが、他の3バッチは、いずれも乾燥直後の価より1ケタ落ちていた。

(2) 22°Cおよび37°C保存

3バッチについて試験した。乾燥直後、各バッチのアンプルを22°Cおよび37°Cの孵卵器内に納めて、経日的にそれぞれ2アンプルずつ取り出して、バッチ別に混合して、I V接種によるEMIDを測定した。その成績は、第14表、第15表に示すように、22°C保存では、試験当初いずれも 10^{-4} のウイルス価であつたものが、7日後では、各バッチともに、 10^{-3} となり、その後、30日後までは 10^{-3} を保ち、90日後では、No. 1およびNo. 2は 10^{-3} 以下に低下したが、No. 3は低下せず 10^{-3} を保つていたが、180日後の測定で 10^{-3} 以下を示した。37°C保存では、No. 1は3日後すでに 10^{-3} 以下に落ちていた。No. 2は、3日目に1ケタ落ちて 10^{-3} となり、7日目までは同価

第13表 凍結乾燥ウィルスの0~5℃および-40℃における保存成績

乾燥 ウィルス	含湿度 (%)	0~5℃ 保存日数													-40℃ 保存日数	
		0	7	14	21	30	60	90	120	150	180	210	270	360	0	360
No. 1	2.08	10 ⁻⁴	10 ⁻³			10 ⁻³		10 ⁻³			10 ⁻³		10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³
No. 2	1.96	10 ⁻⁴		10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³		10 ⁻³		10 ⁻³	10 ⁻³		10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³
No. 3	2.14	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴		10 ⁻³		10 ⁻³		10 ⁻³	10 ⁻³		10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
No. 4	2.67	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴			10 ⁻⁴		10 ⁻⁴			10 ⁻³		10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴

10⁻³~10⁻⁵: 発育鶏卵で測定したウィルス価

10⁻³: 10⁻³稀釈液に感染が証明されない。

第14表 凍結乾燥ウィルスの22℃における保存成績

乾燥 ウィルス	含湿度 %	保存日数					
		0	7	14	30	90	180
No. 1	2.08	10 ⁻⁴	10 ⁻³				
No. 2	1.96	10 ⁻⁴	10 ⁻³				
No. 3	2.14	10 ⁻⁴	10 ⁻³				

10⁻³~10⁻⁴: 発育鶏卵で測定したウィルス価

10⁻³: 10⁻³稀釈液で感染が証明されない。

第15表 凍結乾燥ウィルスの37℃における保存成績

乾燥 ウィルス	含湿度 (%)	保存日数				
		0	3	7	14	21
No. 1	2.08	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³
No. 2	1.96	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³
No. 3	2.14	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³

10⁻³~10⁻⁴: 発育鶏卵で測定したウィルス価

10⁻³: 10⁻³稀釈液に感染が証明されない。

を保っていたが、14日目には10⁻³以下となつた。また、No. 3は同様に、3日目では10⁻³となり、14日後まで、この価を保っていたが、21日目には10⁻³以下となつた。

(3) 溶解後の保存

乾燥後0~5℃に保存した2バッチ (No. 2, No. 3) について、溶解後の保存性を検査した。まず、乾燥ウィルスをPBSで100倍に希釈して、試験管に分注し、22℃および37℃の孵卵器内

に納めて、経時的にIV接種によるEMIDを測定した。その成績は、第16表で示すように、22℃保存では、試験の当初いずれも10⁻⁴であつたものが、3時間後の測定において、No. 2は低下を示さず、No. 3は1ケタ落ちて10⁻³となり、6時間後にNo. 2は1ケタ落ちて10⁻³となり、No. 3は変わらず10⁻³を示していた。9時間後の測定で、No. 2はさらに低下して10⁻³以下となり、No. 3は変わらず10⁻³を示していた。

第16表 凍結乾燥ウイルスの溶解後における保存成績

保存温度	乾燥ウイルス		経過時間			
	バッチ番号	前処置	0	3	6	9
22°C	No. 2	0~5°C, 14日保存	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³
	No. 3	0~5°C, 7日保存	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³
37°C	No. 2	0~5°C, 14日保存	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³
	No. 3	0~5°C, 7日保存	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³

10⁻³~10⁻⁴: 発育鶏卵で測定したウイルス価

10⁻³: 10⁻³稀釈液で感染が証明されない。

一方、37°C保存では、試験の当初に、いずれも10⁻⁴を示していたものが、3時間後の測定では、No.2およびNo.3ともに1ヶタ落ちて、10⁻³となり、6時間後の測定では両者ともさらに低下して10⁻³以下となつた。

10. I V株の牛系ウイルス感染防禦能発現時期
 和種仔牛を用い、6回の試験を行なつた。まず、I V株の感染鶏胎児凍結乾燥ウイルスの200~4,000 EUを背部皮下に接種し、48, 72, 96時間、または、72, 96, 120時間(試験2)後に、それぞれ1頭ずつの牛に、牛系ウイルス感染牛リンパ節の20倍または1,000倍希釈液(通常、感染リンパ節の牛に対する最低致死量は10⁻⁷~10⁻⁸である)1mlを反対側の背部皮下に、それぞれ接種して、I V株ウイルスが牛系ウイルスの感染を抑制するか否かを観察した。また、I V株接種前および牛系ウイルス攻撃前の血清について、発

育鶏卵を用いて、中和抗体証明試験を行なつたが、すべて陰性であつた。

第17表で示すように、試験3, 5および6は、I V株ウイルス接種後96時間目、また、試験2は、120時間目にそれぞれ、牛系ウイルスの感染を完全に抑制した。試験1および4は、試験牛数不足で終末を見失つた。

以上のごとく、感染抑制は96時間目から大半の牛に認められ、一部の牛では120時間目に至つて認められた。72時間以前では、抑制は認められなかつた。

なお、この試験において、牛系ウイルスをもつてする攻撃により軽度発症後回復した3例(試験2の96時間目、試験4の72時間目および96時間目の例)があつたことは注目に値する。著者の経験では、牛系ウイルスに感染した和牛は例外なく特徴的な牛疫症状をあらわして死亡するので、これ

第17表 I V株接種牛における牛系ウイルス感染抑制能の出現時期

試験番号	I V株の接種量(EU)	牛系ウイルスの接種量(感染牛リンパ節)	牛系ウイルスによる攻撃接種の結果 I V株接種後の経過時間			
			48	72	96	120
1	200	1:20, 1ml	+	+	+	
2	400	1:1,000, 1ml		+	±	-
3	1,000	1:20, 1ml	+	+	-	
4	4,000	1:20, 1ml	+	±	±	
5	4,000	1:1,000, 1ml	+	+	-	
6	4,000	1:1,000, 1ml	+	+	-	

+: 重度発症斃死(抑制せず)
 ±: 軽度発症回復(不完全抑制)
 -: 無症状耐過(完全抑制)

第18表 感染和牛における免疫の持続期間

牛	接種ウイルス量 (E U)	熱 反 応		補体結合抗体価		牛系ウイルスの攻撃接種		
		発熱程度	発熱期間 (日)	接種後1カ月以内	攻撃接種直前	I V株接種後の経過日数	ウイルスおよび接種	結 果
59-14	200	±	3	卅	—	158	感染牛リンパ節 1:20 1 ml	耐過
59-16		—	•	卅	—	365		耐過
59-17		+	2	卅	—	365		耐過
59-18		—	•	卅	—	158		耐過
59-19		+	3	卅	—	365		耐過

らの恢復牛は部分的に抑制があつたためと思われる。両ウイルスの量的な関係についての特別な試験は行なわなかつたが、この試験の範囲においても、I V株ウイルスの接種量の少ないものにも、牛系ウイルス抑制時間が若干おくれる傾向がうかがわれた。

11. 牛に対する免疫原性

I V株は牛に対して、ほとんど臨床症状を示さないまでに、病原性を減じているが、なお充分な免疫原性を有しており、 $1/100 \sim 2$ E Uのごとき微量接種では、牛を免疫し得ないが、10 E U以上を接種すると100%免疫する。こゝにいう免疫とは、病原性のきわめて強い牛系ウイルスをもつてする攻撃に耐過し得る抵抗性をいう。牛で長期の免疫持続期間を試験することは、経済的に困難であり、実験成績はわずか数例に過ぎないが、その成績は第18表に示すように、ウイルス200 E Uを接種した和種仔牛5頭について、5カ月(2例)、または12カ月(3例)後に、牛系ウイルスで攻撃した。対照牛は、表示しなかつたが、定型的な牛疫症状を示して死亡したが、試験牛は、なんらの臨床症状もなく、全例耐過し、強い免疫を示していた。この試験の範囲では、免疫の消失する時期を知ることができなかつたが、免疫は少くとも1カ年以上持続することがわかつた。

V. 総括および考察

牛疫を予防するために、予防液の研究が、世界各地において、長い間行なわれてきた。中村²⁾⁻⁹⁾らが変異株の家兎化牛疫ウイルスを作出することに成功して以来、牛疫ウイルスの変異の研究が非常にくわしく行なわれるようになった。牛疫ウイ

ルスの変異の研究を、わかり易く整理すると、つぎのようになる。

- (1) 牛系→山羊化: Edwards²⁷⁾, Sanders²⁸⁾ら Daubney²⁹⁾ら
- (2) 牛系→家兎化: 中村ら²⁾⁻⁹⁾
- (3) 家兎系→鶏胎化: 中村ら^{10) 11)}, 著者ら^{12) 13)}
- (4) 牛系→鶏胎化: Shope¹⁴⁾⁻¹⁶⁾ら, 石井ら¹⁸⁾
- (5) 鶏胎化Y S株→鶏胎化I V株: 磯貝ら¹⁹⁾

山羊化ウイルスは病原性が強く、一般には応用できない。家兎化ウイルスは病原性が、非常に弱くなつたが、高度感受性牛に対しては、免疫血清との共同注射を必要とする。鶏胎化株は病原性が非常に弱く、単味注射が可能である。同じ鶏胎化株でも、順応させるためにとつた継代方法、すなわち、(1)原株の牛系ウイルスから家兎に順化させ、さらに鶏胎に順化させたものと、牛系ウイルスから鶏胎に直接順化させたもの、あるいは、(2)同じ鶏胎化株でも、発育5日令卵に卵黄のう内接種で継代しているY S株と、Y S株をさらに、発育12~13日令卵に漿尿膜の血管内接種で継代して、この経路に順化させたI V株とでは、牛に対する病原性が異なる。ことに、(2)の系列では、Y S株とI V株とでは、発育鶏卵に対して、接種経路や発育卵令の差により、ウイルスの病原性や増殖性が異なる。また、卵に対する病原性と、牛に対する病原性とは平行しない。また、牛におけるウイレミーの出現頻度や持続期間が病原性の減弱と密接な関係があることを知つた。これらのこと

は、一般に変異弱毒ウイルスを予防液として用いる場合に貴重な基礎資料を提供するものと思われるので、以下考察を下しながら総括する。

(1) Y S株の鶏胎児に対する最小感染量を、発育5日令卵に卵黄のう内接種で測定したときは、高いウイルス価を示すが、発育12日令卵に静脈内接種で測定したときは、きわめて低い。I V株の鶏胎児に対する最小感染量は、卵黄のう内、静脈内、いずれの経路で測定しても、高いウイルス価を示す。すなわち、Y S株を静脈内接種で継代を続けて得たI V株は、静脈内経路に適応されているが、なお、もとの卵黄のう内経路に対しても、適応性を保持している。Y S株を発育12日令卵に静脈内接種したとき、増殖の悪いのは、接種経路の相違と卵令による抵抗性の差によるものと考えられるが、ウイルス側からみて、感染に不利な環境にあることが想像される。しかし、Y S株は静脈接種で継代されたことによつて、静脈内経路に適応し、感染性が増大した。一方、鶏胎に対する感染性を、卵黄のう内接種法で測定するとき、I V株はY S株とほぼ同じウイルス価を示した。I V株が卵黄のう内経路に対する適応性をいさゝかも減少していない。

磯貝ら¹⁰⁾は、Y S株を発育13日令卵に静脈内接種法で継代するにあたり、継代数が進むにつれて、静脈内接種での発育鶏卵に対する感染性が漸次増強したことを報じている。著者はこれを追試して、I V株は静脈内経路によく適応し、均一な感染性を示すようになったことを再確認し、I V株の静脈内経路によるウイルス価測定などに充分応用できるようになっていることを知つた。

(2) I VおよびY S株両いづれによる感染でも、鶏胎児には特徴的な病変として、胎脾の腫脹および潮紅が認められ、健康胎児の脾との間に明らかな差があり、感染診断の重要な参考となる。I V株を発育12日令卵に静脈内接種して感染させた鶏胎児の脾の平均重量は26.7mgで、Y S株に発育12日令卵の静脈内接種で感染した鶏胎児の脾の平均重量は16.9mgであり、両者間に明確な差が認められる。一方、発育5日令卵に卵黄のう内接種

して感染させた鶏胎児の脾の腫脹および潮紅は、両株間に差異を認め得なかつた。これらのことは、上述の感染性の所見とともに、I V株は静脈内接種でも、卵黄のう内接種でも、鶏胎児によく感染し、病原性が強いことを示している。

磯貝ら¹⁰⁾は、Y S株を発育13日令卵の静脈内接種で継代するにあたり、継代数が進むにつれて、脾の病変である腫脹と潮紅が、しだいに強く現われるようになったことを述べている。著者は、彼らの観察を再確認し、脾の腫脹と潮紅は、鶏胎児の感染診断の一助となることを知つた。

I V株に感染した鶏胎児の死亡率は、静脈内接種による感染であつても、卵黄のう内接種による感染であつても、きわめて高く、その死亡率は、前者は接種後6日目より、後者は接種後8~9日目より、それぞれ急速に上昇する。

(3) I V株の発育鶏卵内における増殖態度について、使用卵の発育卵令、接種経路、および培養期間のウイルスの増殖におよぼす影響について検討してみると、発育11~12日令卵に静脈内接種し、5日間培養することにより、また、5日令卵に卵黄のう内接種し、7~9日間培養することによつて、それぞれ高い濃度のウイルスが得られる。ウイルスが最高濃度に達したとき、静脈内接種感染卵の価が卵黄のう内接種感染卵の価より1ケタ程度高い。高い濃度のウイルスを欲するとき、胎脾が選ばれるが、予防液などのように、ウイルスを大量に欲するとき、全胎児体が利用できる。

I V株の増殖は、静脈内および卵黄のう内両接種群ともに、発育日令の進んだ卵を用いたとき若い卵より低い価を示した。すなわち、発育日令の進んだ卵は若い卵よりウイルスの増殖に対する抵抗性が強いことを示している。本研究において、発育5日令卵に卵黄のう内接種で継代しているY S株を、12日令卵に静脈内接種したとき、感染の不良を示したのは、卵令による抵抗性の差が大きく原因していると考えられる。

感染死亡胎児のウイルス価はきわめて低い。これは、感染胎児の死亡から、ウイルス価の測定ま

でに要した時間および温度と密接な関係にあることは容易に想像される。本研究は、その点に関する詳細な実験を欠いてはいるが、前日の夕刻の検卵で生存を確かめ、翌朝の検卵で死亡を認めたものについての成績であり、従つて、死亡後16時間以内38°Cの孵卵器内に放置されたものについての検査成績である。死亡卵材料のウイルス価は、生存卵材料の価より2ヶタ程度低く、 $<10^{-3} \sim 10^{-3}$ であった。このことは、死亡卵材料は予防液などウイルス材料採取のためには適当でないことを示している。

これらの成績は、家兎化一鶏胎化ウイルスについて行なつた著者ら¹³⁾および中村ら¹⁴⁾の成績とはほぼ一致している。

(4) I V株の牛に対する最小感染量と発育鶏卵に対する最小感染量との間に一定の関係が成立するならば、後者によつて前者を類推できるわけである。そこで著者は6回の比較試験を行ない、両者が平行関係にあることを知ることができた。

I V株は、牛に接種された場合、ほとんど発熱反応をも認めぬ程度まで病原性を減弱しており、一方、鶏胎児に対して病原性をいちじるしく増強しており、致死性をもつようになってゐる。このことは、感染性と病原性とは、別々に考えるべきことを示している。また、I V株の卵に対する最小感染量の測定をもつて、牛に対する接種ウイルス量を推定できる。

(5) I V株接種により感染した和種子牛は、その77.8%が無症状であり、発症例でもきわめて軽度の発熱を示したに過ぎない。しかして、感染牛は、いずれも牛疫ウイルスに対する強度の免疫を獲得していた。接種ウイルス量と、臨床症状の発現の頻度や程度には、ほとんど関係がなく、むしろ、牛自体の個体差によつて、接種反応が異なるように見える。

和種成牛およびホルスタイン種仔牛は、試験例数も少なかつたが、いずれも全く無症状で耐過し、免疫を獲得した。福所ら^{30)~32)}が、ホルスタイン種牛は和牛にくらべて、一般牛疫ウイルスに対して、抵抗性が強く、ことにその差異は、弱

変異ウイルスに顕著に認められると報告した。著者の実験では上述のごとく、牛の実験例数が少なく、結論的なことはいえないが、I V株のように弱毒化したものでは、この差がみられないかもしれない。

Y S株について、石井¹⁸⁾らは、その50代までのウイルスを接種した和牛およびホルスタイン種牛は重篤なる牛疫症状を示し、その約半数は死亡の転帰をとることを報告している。著者が、対照として試験した220~333代間のY S株を接種した和牛は、石井らの成績からみると、その症状はいちじるしく軽減していたが、なお、全例に熱反応を示し、その発熱期間は平均3.8日、最高体温は41.0°C前後、発熱量は平均69.5であり、また食欲不振を伴つた例がおよそ50%あつたのに、ホルスタイン種牛は無症状で耐過して、両品種間に感受性の差がみられた。

しかるに、I V株はY S株にくらべて、牛に対する病原性は遙かに弱く、和牛に対して、ほとんどが無症状経過を示すようになっており、このように減毒したI V株では、和種とホルスタイン種との間に、みかけ上の感受性の差がみられないようである。

磯貝ら¹⁹⁾は、I V株の牛に対する病原性が、ほとんど接種反応を示さないまでに軽減し、Y S株より明らかに弱いことを述べた。著者は、さらに種々のウイルス量を用いて、試験例数を加え、ほぼ一致した成績を得た。

家兎化一鶏胎化ウイルスは、和牛に対して、十分なワクチンとして応用できるまでに、病原性を減じてはいるが、福所³³⁾の成績によると、発熱率89%、潜伏期平均5.7日、発熱期間平均3.5日、熱量平均48を示すので、I V株の和牛に対する病原性は、家兎化一鶏胎化ウイルスよりも、なお一層弱いといえる。

(6) I V株感染牛5例中2例に、ウイレミーが、発育鶏卵試験によつて証明されたにすぎなかつた。ウイレミーの持続期間はごく短期間で、2~3日程度であつた。なお、同時に手術によつて摘出した表在リンパ節には、5例とも常にウイル

スが証明された。ウイルスの証明される期間は、ウイルス接種後4日から7日頃で、その中の1日あるいは3日間にわたって証明された。

牛が牛疫ウイルスに感染するにあたり、ウイレミーを必発することは、すでに知られた事実である。病原性が減弱した山羊化ウイルス、家兎化ウイルスの感染牛においてもなおウイレミーがみられる。福所³³⁾は家兎化一鶏胎化ウイルス感染牛にも、ウイレミーが出現するが、ウイルス量は少ないと報じている。

I V株感染牛におけるウイレミーの出現は不定であり、かつ弱く、出現期間もきわめて短期間であるので、これを牛系および各変異ウイルスの牛接種試験成績と対比すると、ウイルスの病原性とウイレミーの程度および持続期間との間に一定の関係があることがわかる。すなわち、著者の実験によれば、ウイレミーを起すウイルスは、ウイレミーの程度および持続期間によつて、病原性の減弱を客観的に証明できるといえる。

(7) I V株接種牛において、感染の成立が認められたものには、すべてC F抗体が証明された。接種ウイルス量と、産生されるC F抗体の強さとの間には、なんらの関係がなく、むしろ、牛自体の個体差によつて、C F抗体価の高低がみられると考えられた。

しかし、C F抗体の出現時期は、接種ウイルス量の多少によつて、差異が認められ、最小感染量のレベルにおいては、おそくなる傾向がみられた。また、熱反応を示したような例では、出現時期は11~14日とほぼ一定しているが、無熱例では11~21日とかなりまちまちであつた。この事実は、接種されたI V株のウイルス量および牛の個体差による抵抗性の差異によつて、牛体内におけるウイルスの増殖の速度によつて影響された結果と考えられる。

(8) 牛疫ウイルスは一般的に外界の感作に対して抵抗性が弱く、I V株もまたその例外ではない。ウイルス保存のため、または将来、予防液として応用されることを考慮にいれて、I V株の乾燥およびその保存性について試験した。この乾

燥ウイルスのウイルス価は組織の湿重量より計算し、乾燥直後において 10^{-4} ~ 10^{-5} であり、ウイルス価が 10^{-3} 以上保たれている保存期間は、試験パッチによりまちまちであつた。-40°C保存では、1カ年以上、0~5°Cではおよそ9~12カ月、22°Cでは1~3カ月、37°Cでは7~14日間であつた。溶解後は、22°Cでは6~9時間、37°Cでは僅かに3時間であつた。福所³³⁾は、著者らの作出した家兎化一鶏胎化ウイルス赤穂株で試験し、-40°Cでは2年半以上、0~5°Cでは20カ月、22°Cでは10カ月、37°Cでは3週間、溶解後は、22°Cでは9時間、37°Cでは3~6時間、それぞれ 10^{-3} 以上のウイルス価を保つと述べているので、著者のI V株乾燥ウイルスの保存性は、家兎化一鶏胎化ウイルスより弱いことを示している。

(9) 牛疫変異ウイルスの接種を受けた牛が、短期間内に、牛系ウイルスの攻撃に耐える感染防禦能を獲得する事実については、既に多くの研究報告がある。たとえば、山羊化ウイルスについては、Pfaff³⁷⁾、Cilli³⁸⁾、Daubney²⁹⁾らの観察によると、感染防禦能は本ウイルス接種後、24~72時間で証明されると述べ、家兎化ウイルス接種後における感染防禦能の出現については、Brotherston³⁹⁾は3.5~5日、陳ら⁴⁰⁾は3日、Illartein⁴¹⁾らは84時間と報告している。鶏胎化ウイルスについては、Jenkins¹⁷⁾らは接種後4日目に牛系ウイルスの感染を防禦したと述べている。また、福所³³⁾が家兎化一鶏胎化ウイルスは、接種後2~4日の間に牛系ウイルスの感染を防ぐと報じた。

著者の実験において、I V株の接種を受けた牛は、接種後4~5日目から牛系ウイルスの感染を抑制した。

弱毒変異牛系ウイルスによる牛系ウイルスの感染防禦能の出現する時期は、そのウイルスの牛に対する病原性の強弱、または、牛の抵抗性の強弱によつて起るウイルスの増殖の速度によつて異なると想像される。もし、この考え方が正しいとすれば、つぎのことが考えられる。すなわち、家兎化一鶏胎化ウイルスについての福所³³⁾の成績では、接種後2~4日目、I V株についての著者の試験

では、接種後4～5日後にそれぞれ牛系ウイルスの感染を抑制しており、両者が用いた牛は、いずれも和種仔牛であつたことから、この点においても、I V株の牛に対する病原性は、家兎化一鶏胎化ウイルスよりも弱いといえる。

なお、上述の多くの研究者達は、このように感染防禦能が短期日に出現する現象を、接種変異ウイルスによる干渉現象をもつて説明しようとしている。この見解に従えば、著者の成績もまた、I V株ウイルスによる干渉現象をもつて説明しなければならない。著者は牛系ウイルスの攻撃接種前の牛の血清について、中和抗体の証明を試みたが、すべて陰性であつた。これについては、将来なお検討を要すると考える。

(10) 実験した範囲では、感染が成立さえすれば、接種ウイルス量が最小感染量であつても、牛に対して強い免疫を附与し、牛系ウイルスの攻撃に対して、完全な抵抗を示した。そして、この免疫は試験した最長期間、すなわち、1カ年間持続した。一般に弱毒変異牛疫ウイルスの接種により、牛に産生される免疫は長期間持続する。家兎化ウイルスについては、9カ月から4カ年³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾と、それぞれの試験範囲内で、なお完全に免疫が保たれていることを認められており、福所³³⁾は、家兎化一鶏胎化ウイルスについて、1カ年半でもなお免疫の減退を認めない成績を得ている。

しかしながら、生ウイルスによる免疫の効果が、そのウイルスの病原性の強弱、または牛の抵抗性の差異によつて惹起される牛の感染の程度に依つて、免疫の持続期間に長短を生ずることは、一般に考えられていることである。この見解によれば、病原性の減弱程度が著しく進んだI V株感染によつて起る免疫は、持続性が最も劣ると考えねばならないであろう。

しかし、なおI V株は充分に価値ある程度に強い免疫原性をもち、牛疫に対して最も感受性の高い和牛に接種した場合でさえ、ほとんど熱反応もなく、しかも1年以上強い免疫を与えるので、I V株は和牛に対してすぐれた予防液として期待されよう。

VI. 結 論

牛継代の牛系牛疫ウイルスを発育鶏卵の漿尿膜上接種でこれに順化させ、さらに卵黄のう内接種で継代を続けた変異株（鶏胎化牛疫ウイルス—Y S株）と、さらにY S株を発育鶏卵の漿尿膜の静脈内接種によつて順化させた株（鶏胎化牛疫ウイルス—I V株）について、その性質や発育鶏卵および牛に対する感染態度を比較し、予防液としての必要条件である凍結乾燥によるI V株の保存性や免疫原性などについて試験した。

(1) 漿尿膜の静脈内接種では、発育鶏卵に対する感染および病変の程度は、I V株がY S株より明らかに強い。しかし、卵黄のう内接種では、両株間に差異がみられない。

(2) I V株感染鶏胎児の死亡率は、静脈内接種による感染でも、卵黄のう内接種による感染でも同様に高い。

(3) I V株の和牛に対する病原性は、もとのY S株にくらべて、一層軽減し、ほとんど接種反応を示さなくなつた。

(4) 牛に対するI V株の最小感染量は、鶏胎児に対する最小感染量と平行するので、牛接種材料の発育鶏卵に対するウイルス価を測定することによつて、牛に対するウイルス価を類推できる。

(5) I V株感染牛のウイレミーは、証明されたり、されなかつたりする。ウイレミーが証明されても短期間に消失する。これに反して、Y S株ではウイレミーの出現頻度がさらに高く、持続期間が長い。また、病原性の強い牛系ウイルスや家兎化ウイルスは100%にウイレミーがみられ、持続期間も長い。

(6) I V株を発育11～12日令卵に静脈内接種した5日間培養、また、発育5日令卵に卵黄のう内接種した7～9日間培養により、ウイルス価は最高となる。しかし、静脈内接種の方が卵黄のう内接種よりやや高い価を示す。

(7) 感染卵内のウイルス量は、胎児の死亡後は急速に減少する。

(8) I V株接種牛は、強毒の牛系ウイルスに対して完全に免疫し、免疫持続期は、少なくとも

1カ年以上である。

(9) I V株接種牛は、接種後4～5日目に牛系ウイルスの感染を抑制する。

(10) I V株感染牛のCF抗体の産生は、接種ウイルス量が少ないとおくれる傾向があるが、最高抗体価はウイルス量によつて影響されない。

(11) I V株を凍結乾燥すると長く保存ができ、良い生予防液をつくることのできる。

参考文献

- 1) 蛸崎千晴：牛疫予防接種に関する実験的研究（第1報告）、第4次牛疫血清製造所年報、11—108, 1917. —2) 中村稔治、我妻正三郎、福所金松：家兎に於ける牛疫毒感染に就て、第1報告、基礎的試験、日獣医誌、17：185—204, 1938. —3) 福所金松、中村稔治：家兎に於ける牛疫毒感染に就て、II. 病理解剖学的変状、日獣医誌、2：75—101, 1940. —4) 中村稔治：家兎に於ける牛疫毒感染に就て、III. 中和試験、日獣医誌、2：567—578, 1940. —5) 中村稔治、五島義盛：家兎に於ける牛疫毒感染に就て、IV. 補体結合反応、日獣医誌、3：263—286, 1941. —6) 中村稔治：家兎に於ける牛疫毒感染に就て、V. 感染家兎体内に於ける病毒の増殖、日獣医誌、3：403—429, 1941. —7) 中村稔治、黒田定男：家兎継代牛疫毒（家兎Ⅲ系）の膿に対する毒性について、日獣医誌、4：75—102, 1942. —8) 中村稔治、福所金松、黒田定男：朝鮮牛に於ける家兎継代牛疫毒共同接種に関する実験的研究、日獣医誌、5：455—473, 1943. —9) 中村稔治：牛疫における生毒予防注射法、特に家兎化牛疫毒の性質並に應用、細菌学の新領域、70—86, 医学書院, 1953. —10) Nakamura, J. and Miyamoto, T.: Avianization of lapinized rinderpest virus, Amer. J. vet. Res., 14：307—317, 1953. —11) Nakamura, J., Kishi, S. et Miyamoto, T.: Sur les caractéristiques de la multiplication du virus lapinisé-avianisé de la peste bovine dans les embryons de poulet, Bull. Off. int. Epiz., 42：692—709, 1945. —12) 古谷武、片岡敏明、倉田一明、中村久：家兎化一鶏胎化牛疫ウイルス赤穂系に関する研究。I, 家兎化牛疫ウイルスの鶏胎化、家畜衛生試験場研究報告、32号：117—135, 1957. —13) 古谷武、石井助満、倉田一明、中村久：家兎化一鶏胎化牛疫ウイルス赤穂系に関する研究。II. 発育鶏卵内におけるウイルスの増殖態度、家畜衛生試験場研究報告、32号：137—149, 1957. —14) Shope, R.E., Griffiths, H.J. and Jankins, D.L.: Rinderpest: I. The cultivation of rinderpest virus in the developing hen's egg, Amer. J. vet. Res., 7：135—141, 1946. —15) Shope, R.E., Maurer, F.D., Jenkins, D.L., Griffiths, H.J.

- and Baker, J.A.: Rinderpest: IV. Infection of the embryos and fluids of developing hen's eggs, Amer. J. vet. Res., 7：152—163, 1946. —16) Shope, R.E. and Griffiths, H.J.: Rinderpest: VI. The persistence of virus in chicks hatched from infected eggs, Amer. J. vet. Res., 7：170—173, 1946. —17) Jenkins, D.L. and Shope, R.E.: Rinderpest: VII. The attenuation of rinderpest virus for cattle by cultivation in embryonating eggs, Amer. J. vet. Res., 7：174—178, 1946. —18) 石井助満、佃兼道：牛系牛疫病毒の鶏胎化に関する研究、家畜衛生試験場研究報告、25号：29—36, 1952. —19) 磯貝誠吾、古谷武、福所金松：日獣医誌投稿予定。—20) Nakamura, J. and Ishii, S.: Demonstration of rinderpest complement fixation antibody in bovine serum. II. Some further experiments, Jap. J. Vet. Sci., 15：251—257, 1953. —21) 中村稔治：生ワクチンによる牛疫予防注射法について、日獣医師誌、9：1—4, 1956. —22) 石井助満、倉田一明：鶏胎化牛疫毒接種卵卵黄のうを抗原とする補体結合反応術式に就て、第37回日獣医学会報告、1954. —23) Nakamura, J.: Complement Fixation Reaction in Rinderpest Study, Inter. Off. Epiz. Paris, 1958. —24) Nakamura, J., Kishi, S., Kiuchi, J. and Reisinger, R.C.: An investigation of antibody response in cattle vaccinated with the rabbit-passaged LA rinderpest virus in Korea, Amer. J. vet. Res., 16：71—75, 1955. —25) 古谷武、中村久、石井助満、倉田一明：発育鶏卵による牛疫中和抗体証明法としての脈管内及び卵黄のう内接種法の比較、家畜衛生試験場研究報告、31号：39—46, 1956. —26) 磯貝誠吾、石井助満、片岡敏明、福所金松：牛系牛疫ウイルスの鶏胎化に関する研究。II. 孵化鶏卵内におけるBAウイルスの増殖態度、家畜衛生試験場研究報告、37号：147—158, 1959. —27) Edwards, J. T.: Rinderpest: Some points in immunity, Trans. 7th Congr. Br. India, 3：707—717, 1927. —28) Sanders, P.T. and Ayyar, K.K.: An experimental study of rinderpest virus in goats in a series of 150 direct passages, Indian J. vet. Sci., 6：1—86, 1956. —29) Daubney, R. and Hudson, J.R.: Reports of first and second Rinderpest Conference, Nairobi, 1938 and 1940. —30) Fukusho, K. and Furuya, K.: Studies on simultaneous inoculation of antirinderpest serum and lapinized rinderpest virus into the Japanese black cattle, Rep. Govt. Exp. Sta. Anim. Hyg., 26：27—34, 1953. —31) Fukusho, K., Ishii, S. and Takamoto, H.: Comparative study on infectiousness to rinderpest of Japanese black and Holstein-Friesian catt with complement fi-

xation reaction, Rep. Govt. Exp. Sta. Anim. Hyg., 26 : 35—39, 1953. —32) Fukusho, K., Ishii, S. and Furuya, K.: Experiments on susceptibility and resistibility of Japanese black and Holstein-Friesian cattle against lapinized rinderpest virus of Nakamura III strain serially passaged in Formosa, Rep. Govt. Exp. Sta. Anim. Hyg., 26 : 41—47, 1953. —33) 福所金松: LA変異ウイルスをもつてする牛疫予防接種法の研究, 家畜衛生試験場研究報告に投稿予定 (1961). —34) Fulton, A.: Test of duration of immunity, Information to F.A.O. of the United Nations, March 28, 1950. —35) Brotherston, J.G.: Lapinized rinderpest virus and a vaccine: Some observations in East Africa. II. Field trials with lapinized vaccine, J. comp. Path., 61 : 289—306, 1952. —36) Birkett, J.O.: Duration of immunity conferred by wetlapinized rinderpest virus vaccine in N'Dama cattle in Sierra Leone, J. comp. Path., 68 : 115—120,

1958. —37) Pfaff, G.: Immunization against rinderpest with special reference to the use of dried goatspleen, Onderstepoort J. vet. Sci., 11 : 263—330, 1938. —38) Cilli, V.: Observations sur le phénomène d'interférence dans la peste bovine, Rev. Path. gen., 53 : 562—567, 1953. (Vet. Bull., 23 : 497, 1953). —39) Brotherston, J.G.: Lapinized rinderpest virus and a vaccine: Some Observations in East Africa. I. Laboratory experiments, J. comp. Path., 61 : 263—288, 1951. —40) 陳, 袁, 氏家, 沈: 兔化牛瘟病毒之研究, 第1報, 兔化毒之毒力及免疫原性之研究, 東北獣医科学研究報告, 1 : 1—13, 1953. —41) Illartein, P.R. et Guerret, M.: Contribution a l'étude de la prophylaxie de la peste bovine en Guinée française (A.O.F.). Note sur des essais de vaccination de taurins N'dama au moyen de la souche de virus pestique lapinisé Nakamura III, Bull. Soc. Pat. Exot., 47 : 422—434, 1955. (Vet. Bull. 25 : 64, 1955).

Studies on the Avianized Variants of Rinderpest Virus

Takeshi FURUTANI

National Institute of Animal Health (Director: Dr. Susumu ISHII)

Bovine strain rinderpest virus was adapted on embryonating eggs by the inoculation repeated first on the chorio-allantoic membrane and then into the yolk-sac (avianized rinderpest virus-YS strain). This YS strain was further adapted by the inoculation into the vein of chorioallantoic membrane (avianized rinderpest virus-IV strain). Biological nature and the mode of infection on the embryonating eggs and cattle were compared between the two variants YS strain and IV strain. Various tests were made, further, on the preservability of freeze-dried IV strain as well as on its immunogenicity as vaccine.

1. When inoculated into the vein of chorio-allantoic membrane, IV strain showed stronger intensity of infection and lesions than that of YS strain. When the inoculation was made into the yolk-sac, however, there was no difference between the two.

2. In either case of the inoculation made with IV strain intravenously or into the yolk-sac, no difference of mortality was found in chick embryos.

3. Pathogenicity of IV strain on Japanese black cattle was much weaker than that of the original YS strain and the inoculation reactions were negligible.

4. As the minimum infective dose (MID) of IV strain on cattle parallels that of chick embryos, the amount of virus vaccinated can be determined by the determination of its chick embryo MID.

5. Appearance of viremia is inconsistent in the cattle infected with IV strain and even when it develops, it disappears within a short period of time. On the contrary,

when infected with YS strain, viremia appears more frequently with longer duration. When infected with bovine strain or rapinized strain, moreover, viremia appears in 100% with much longer duration.

6. Virus titer becomes highest when IV strain is inoculated intravenously on the embryonating eggs of 11-12 days and incubated for 5 days and also when the same strain is inoculated into the yolk-sac of the embryonating eggs of 5 days and incubated for 7-9 days. The former, however, gives a titer slightly higher than the latter.

7. Virus content of the infected egg reduces rapidly following the death of embryo.

8. Cattle inoculated with IV strain are completely immune against the challenge with highly virulent bovine strain and this immunity lasts at least for 1 year.

9. Cattle inoculated with IV strain inhibit the challenge of bovine virus in such an early stage of 4-5 days after inoculation.

10. Complement fixation antibody of the cattle infected with IV strain is produced quicker in proportion to the amount of virus inoculated, but the highest antibody titer is little influenced by the amount of virus inoculated.

11. Investigations were made on the preservability of freeze-dried IV virus in order to use it as vaccine. It maintains the chick embryo virus titer of 10^{-3} for 1 year and over when preserved at -40°C , 9-12 months at $0-5^{\circ}\text{C}$, 1-3 months at 22°C and 1-2 weeks at 37°C . When once dissolved, it maintains the same titer for 6-9 hours at 22°C and only for 3 hours at 37°C .
