

## 弱毒ニューカッスル病ウイルスMET95株の赤血球凝集能

高瀬公三<sup>1)†</sup>・山崎憲一<sup>2)</sup>・小尾岳士<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>病態・予防獣医学講座微生物学分野, (<sup>2)</sup>(財)化学及血清療法研究所)

平成22年10月31日 受理

### 要 約

弱毒ニューカッスル病ウイルスMET95株の赤血球凝集 (HA) 能について, 同弱毒ウイルスB1株あるいはVG/GA株との比較において検討した。各HA能のホルマリンによる不活化作用において差は認められなかったが, 熱 (50℃) による不活化作用には差を認め, B1株のHA能は他の2株よりも早く失活した。MET95株およびB1株の感染価あるいはHA価を同じに調整した不活化ウイルス液に水酸化アルミニウムゲルアジュバントを加えたのち鶏に注射し, その後のHA抑制 (HI) 抗体の産生を, 両ウイルスのHA抗原で測定した。その結果, 不活化前ウイルス量を同じに調整した場合, HI抗体価の産生状態はほぼ同様であったが, 不活化前HA価を同じに調整した場合はB1株で低かった。なお, 両ウイルスのHA抗原で測定したHI抗体価は良く相関した。

キーワード: 弱毒ニューカッスル病ウイルス, 赤血球凝集反応, MET95株, 生ワクチンウイルス

### 緒 言

ニューカッスル病ウイルス (NDV) は, 鳥類の急性伝染病であるニューカッスル病 (ND) を引き起こし, 養鶏産業に甚大な被害をもたらす[1]ことから, わが国では家畜伝染病 (旧名: 法定伝染病) に指定し, その防圧に行政面からも取り組んでいる。その発生は古く, 1970年代には全国の養鶏場において流行発生し, その被害も甚大であった。以来, 生および不活化ワクチンが導入, 開発, 市販されるようになり, 大きな流行は制圧されてきた。しかし, 今なおわが国の養鶏環境およびその周辺環境においてNDVは保持され, 時折NDの発生が報告されている。今では, 養鶏場においてNDワクチンは必ずワクチネーションプログラムの中に組み入れられ, 頻回接種されている[6, 7]。特に弱毒NDVであるB1株を用いた生ワクチンはわが国のほか, 広く世界で利用されてきた。このような中で, 村川ら[10]は, 野外材料からユニークなHA能を持つ弱毒NDVのMET95株を分離した。その後MET95株の

HA能および弱毒性に関する性状が解明され[11, 12, 14], 生ワクチンとして市販されるようになった[2]。

本研究では, MET95株のHA能について未だ解明されていない部分について検討を加えたので, その成績を報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試ウイルス液

弱毒NDVのMET95株, B1株およびVG/GA株は, 市販の生ワクチン (財・化学及血清療法研究所・熊本市および日本全業工業・株・郡山市) の1ドースを10日齢のSPF発育鶏卵 (財・化学及血清療法研究所より分与) の尿膜腔内に接種し, 37℃, 3日間培養後, の尿膜腔液を回収, 3,000rpmで15分遠心後の上清をウイルス液として用いた。それぞれのウイルス液の感染価およびHA価は, MET95株:  $10^{0.0}$ EID<sub>50</sub>/ml, 1:1,024, B1株:  $10^{0.75}$ EID<sub>50</sub>/ml, 1:4,096およびVG/GA株:  $10^{0.75}$ EID<sub>50</sub>/ml, 1:4,096である。

†: 連絡責任者: 高瀬公三 (獣医学科病態・予防獣医学講座微生物学分野)

Tel: 099-285-8724, E-mail: ktakase@agri.kagoshima-u.ac.jp

<sup>2)</sup> 〒860-8568 熊本市大窪一丁目6-1

## 2. 鶏赤血球液

SPF鶏群（白色レグホン種：財・化学及血清療法研究所）由来の2カ月齢鶏2羽から抗血液凝固剤アルセバー液を含む試験管に採血し、赤血球をリン酸緩衝食塩液（PBS）で3回洗浄したのち、2,000rpm5分遠心し、その沈殿層の赤血球をPBSに0.5%に浮遊させ作成した赤血球液を用いた。

## 3. 免疫用不活化NDV液の調整

1) 免疫用不活化NDV原液の作成：供試ウイルスのMET95株およびB1株を $10^4$  EID<sub>50</sub>/卵の濃度でSPF発育鶏卵の尿膜腔内に接種し、37℃、3日間培養後、その尿膜腔液を回収、3,000rpmで15分遠心後の上清をウイルス原液として用いた。各ウイルス原液の感染価を、SPF卵を用いて測定したのち、0.2%になるようにホルマリンを加え、37℃、3日間静置したものを不活化ウイルス原液とした。なお、不活化ウイルス原液はPBS中で膜透析した後SPF発育鶏卵に接種することでNDVが完全に不活化されていることを確認し、使用した。

2) 濃度調整およびアジュバントの添加：免疫用不活化NDV液はウイルス抗原濃度を不活化前ウイルス量（感染価）および不活化前HA価の2通りで揃えた。すなわち、不活化前ウイルス量を $10^{9.75}$  EID/mlに希釈調整したMET95株（A）およびB1株（B）ならびに不活化前HA価を1：512に希釈調整したMET95株（C）およびB1株（D）を用意した。なお調整用の希釈液は、ウイルス非接種の発育鶏卵から得た腔液に0.2%ホルマリンを加えたものを使用した。

アジュバントは、塩化アルミニウムの10%（W/V）水溶液および水酸化ナトリウムの4%（W/V）水溶液を精製水中で等量ずつ混合して作成された水酸化アルミニウムゲルを1/2に濃縮後、121℃で20分間高压蒸気滅菌したものを使用した。

濃度調整されたそれぞれの不活化NDV液に水酸化アルミニウムゲルを等量ずつ混合し、十分に攪拌したものを免疫用不活化NDV液とした。

## 4. HA価およびHI抗体値の測定

HA価およびHI抗体価の測定は定法[5]に従い、0.5%鶏赤血球液を用いたマイクロプレート法で実施した。HI反応でのHA抗原はMET95株およびB1株のそれぞれを8単位に調整し使用した。なお、判定は室温で1時間反応後に行なった。

## 5. ホルマリンによるHA不活化作用

各供試ウイルス液のHA価が1：2,048になるように、非感染発育鶏卵腔液で希釈調整したウイルス液に、市販のホルマリンを0.2%になるように加え、よく混和後、37℃で0～108時間静置しながら、経時的にHA価を測定した。

## 6. 温度によるHA不活化作用

各供試ウイルス液のHA価が1：2,048になるように、非感染発育鶏卵腔液で希釈調整したウイルス液各供試ウイルス液を45℃、50℃、56℃の温水中に15～180分間静置しながら、経時的にHA価を測定した。

## 7. 不活化NDV液の鶏に対する免疫能

SPF鶏（白色レグホン種：財・化学及血清療法研究所）の45日齢20羽を5羽ずつ4群に分け、不活化前ウイルス量を $10^{9.75}$  EID/mlに希釈調整したMET95株（A）およびB1株（B）ならびに不活化前HA価を1：512に希釈調整したMET95株（C）およびB1株（D）の免疫用不活化NDV液を下腿部筋肉内に0.5ml/羽ずつ注射した。その後、10、20、30、45日後に採血し、血清分離後にHI抗体価を測定した。

## 結 果

### 1. ホルマリンによるHA不活化作用

成績はTable 1に示した。開始時に1：4,096であった各ウイルス液のHA価は、時間の経過と共に低下し、84～96時間後には検出されなくなった。すなわち、MET95株およびVG/GA株が84時間後に、また

Table 1. Hormalin sensitivity of haemagglutination activity of 3 NDV strains

| Time (hr) | NDV     |         |         |
|-----------|---------|---------|---------|
|           | MET95   | B1      | VG/GA   |
| 108       | <1:2    | <1:2    | <1:2    |
| 96        | <1:2    | <1:2    | <1:2    |
| 84        | <1:2    | 1:2     | <1:2    |
| 72        | 1:8     | 1:8     | 1:2     |
| 60        | 1:32    | 1:32    | 1:32    |
| 48        | 1:64    | 1:64    | 1:128   |
| 36        | 1:64    | 1:64    | 1:128   |
| 24        | 1:128   | 1:128   | 1:512   |
| 12        | 1:512   | 1:512   | 1:1024  |
| 1         | 1:4,096 | 1:4,096 | 1:4,096 |
| 0         | 1:4,096 | 1:4,096 | 1:4,096 |

Table 2. Heat treatment sensitivity of haemagglutination activity of 3 NDV strains

| Time (min) | 50℃     |         |         | 56℃     |         |         |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|            | MET95   | B1      | VG/GA   | MET95   | B1      | VG/GA   |
| 180        | 1:512   | <1:2    | 1:2,048 | <1:2    | <1:2    | <1:2    |
| 120        | 1:1,024 | <1:2    | 1:2,048 | <1:2    | <1:2    | <1:2    |
| 60         | 1:2,048 | <1:2    | 1:2,048 | <1:2    | <1:2    | 1:4     |
| 30         | 1:2,048 | 1:128   | 1:2,048 | <1:2    | <1:2    | 1:512   |
| 15         | 1:2,048 | 1:1,024 | 1:2,048 | 1:2,048 | <1:2    | 1:1,024 |
| 0          | 1:4,096 | 1:4,096 | 1:4,096 | 1:2,048 | 1:2,048 | 1:2,048 |

B1株が96時間後にHA価は<1:2となり、検出されなくなり、3ウイルス間で差を認めなかった。

2. 温度によるHA不活化作用

作用温度45℃の場合、開始時に1:2,048であった各ウイルス液のHA価は3時間後もそのままの価が維持され、温度の影響は認められなかった。作用温度50℃および56℃の結果は、Table 2に示した。作用温度50℃においては、B1株において60分(1時間)後に検出されなくなった。MET95株およびVG/GA株においては、180分(3時間)後においても、1/2~1/8に低下したものの検出された。一方、56℃においては、MET95株およびB1株においては、15~30分で検出されなくなり、VG/GA株のみが1時間後(1:4)まで検出された。

3. 不活化NDV液の鶏に対する免疫能

B1株をHA抗原として測定したHI抗体価の推移をFig. 1に、またMET95株をHA抗原に用いて測定した結果をFig. 2に示した。どちらのHA抗原を用いても、HI抗体価はいずれの鶏群においても注射後10日目から高い値を示し、20日目をピークに徐々に低下した。鶏群間での推移において、免疫用不活化NDV液のHA価を揃えるために不活化ウイルス原液を1/4に希釈調整したD群のみのHI抗体価が他の3群(A, B, C)よりも明らかに低値で推移した。

B1株のHA抗原およびMET95株のHA抗原でのHI抗体価から相関係数を求めたところ、R=0.87となりよく相関していた。

考 察

わが国では、NDは家畜伝染病に指定され、1967年以來、多くの生および不活化ワクチンが使用されるようになり、今日では最も基本的なワクチンとし

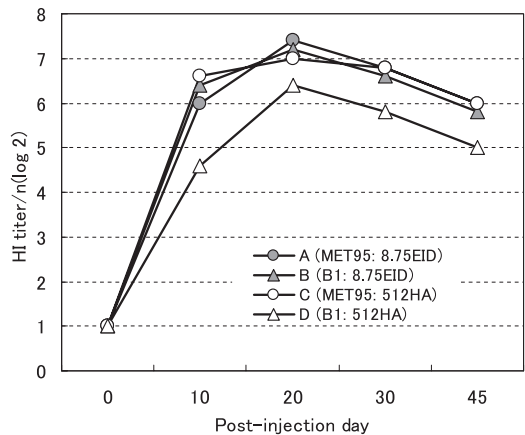


Fig. 1. HI titer against 3 inactivated NDV strains, measured with HA antigen prepared from B1 strain.

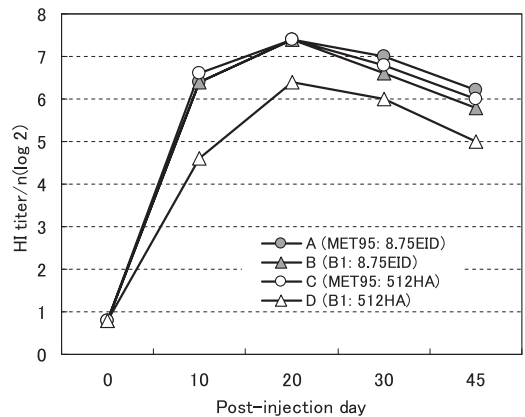


Fig. 2. HI titer against 3 inactivated NDV strains, measured with HA antigen prepared from MET95 strain.

てあらゆる養鶏場で、鶏の生涯で複数回投与されている。最も古くから、生ワクチン株としてわが国だけでなく海外でも多く使用されてきたB1株は、その役目を十分に果たしてきた。しかし、特に移行抗体の残存する日齢にB1株ワクチンを投与したにも

拘らずHI抗体が上昇しないケースがあり、他の弱毒株を用いたワクチンも開発され使用されるようになった。1995年に野外鶏から分離された弱毒MET95株[9]はB1株よりも免疫原性が高いということでワクチン化された株である[2]。

Takaseら[14]は、MET95株のHA能は急速凝集反応では陽性にならないか、極めて微弱であり、B1株や他のワクチン株、あるいは野外強毒株のHA能とは異なることを見いだした。さらに、Murakawaら[11, 12]は、MET95株の特異なHA能が、アヒル、ガチョウおよびハトの赤血球においても鶏赤血球と同様に起きることを確認し、さらにヘモアグルチニン-ノイラミニダーゼ蛋白遺伝子を解析し、MET95株のアミノ酸216番目と552番目がスレオニンとロイシンに置換されていることを明らかにすることで、この置換がHA特性と関係していることを示唆した。今回、著者らは、これまで未検討であったMET95株のホルマリン感受性、温度感受性およびHI抗体産生能について、市販ワクチン株であるB1株あるいはVG/GA株と比較検討した。

HAの温度感受性についてはNDV株により異なるとの報告が既にあり、感染性あるいは病原性との関係が検討され、さらには弱毒株あるいは生ワクチン株のマーカースとしての利用も示唆されている[3, 4, 8, 9, 13]。著者らが検討したワクチン株の結果においても、ホルマリン感受性では差を見出せなかったものの、温度感受性においては3株間で異なることがわかった。すなわち、50℃温度下では、B1株のHAが最も失活しやすく、VG/GA株は最も抵抗性であり、MET95株はその中間を示した。ただ、継代することで変化する[8]こともあり、生ワクチン株などのマーカースとして利用するには注意が必要であろう。

鶏を使用したHI抗体産生能においては、不活化前感染価でウイルス抗原を調整した場合、MET95株およびB1株共に良好に反応し、両株間での違いを見出せなかった。しかし、HA価で調整した場合、B1株のHI抗体産生能が明らかに低下した。両ウイルスのHA価を1:512に調整する際にB1株のウイルス原液を1/4に希釈しているが、そのことに起因していると思われる。この1/4の希釈がHA抗原量として正確な調整であったかどうか、検討の余地はある。HAの免疫原性において、MET95株およびB1株、あるいはその他の株間で異なるかどうかは、初めにHAの抗原量を確実に調整できる方法が検討さ

れなければならないだろう。

## 謝辞

本研究は、留学生Mr. Kamali Ali Naghi (イラン)の協力によるところ大であり、心より感謝する。

## 引用文献

- [1] Alexander, D.J.: Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infection. in Saif, Y.M. (ed), *Diseases of Poultry* 12<sup>th</sup> ed. p75-115, State University Press, Ames (2008)
- [2] 江里口真一・村川泰司・岩村善利・西村伸一郎・江副伸介・藤川英雄・高瀬公三: 新しいニューカッスル病生ワクチンの安全性および有効性. 化血研所報黎明, 11, 46-54 (2002)
- [3] Hanson, R.P., Spalatin, J.: Thermostability of the hemagglutinin of Newcastle disease virus as a strain marker in epizootologic studies. *Avian Dis.*, 22, 639-665 (1978)
- [4] Hrdá M., Zajac J. and Cernik K.: Comparison of the thermostability of Newcastle disease virus strains isolated in Slovakia. *Vet. Med. (Praha)*, 26, 247-256 (1981)
- [5] 川村斎: 鶏ウイルス病の血清反応; 鶏病診断 (堀内貞治編) p595-598, 家の光協会, 東京 (1982)
- [6] 鶏病研究会報: 総合ワクチネーションプログラム. 鶏病研究会報, 35, 187-196 (1999)
- [7] 鶏病研究会: ニューカッスル病の防除対策. 鶏病研究会報, 37, 149-159 (2001)
- [8] King D.J.: Selection of thermostable Newcastle disease virus progeny from reference and vaccine strain.: *Avian Dis.*, 45, 512-516 (2001)
- [9] Lomniczi B.: Thermostability of Newcastle disease virus strains of different virulence. *Arch. Virol.*, 47, 249-255 (1975)
- [10] 村川泰司・高瀬公三・村上敬昭・前田治久・内布洋一: ワクチン無接種プロイラー鶏群の病原体浸潤状況調査 II. 細菌およびウイルス分離成績からみた病原体の動き. 鶏病研究会報, 34, 36-42 (1998)
- [11] Murakawa Y., Takase K., Sakamoto K., Sueyosi M. and Nagatomo H.: Characterization of lentogenic Newcastle disease virus isolated from a broiler chicken in Japan. *Avian Dis.*, 44, 686-690 (2000)
- [12] Murakawa Y., Sakaguchi M., Soejima K., Eriguchi S., Takase K., Sueyoshi M., Nagatomo H., Ito T. and Otsuki K.: Haemagglutinating activity of the lentogenic Newcastle disease virus strain MET95. *Avian Pathol.*, 32, 39-45 (2003)
- [13] Seal B.S., King D.J. and Bennett J.D.: Characterization of Newcastle disease virus vaccines by biological properties and sequence analysis of the hemagglutinin- neuraminidase protein gene. *Vaccine*, 14, 761-766 (1996)
- [14] Takase K., Murakawa Y., Eriguchi S. and Fujikawa H.: Unique hemagglutination activity of an isolate of Newcastle disease virus. *J. Vet. Med. Sci.*, 62, 1325-1326 (2000)

## Haemagglutination Activity of Lentogenic Newcastle Disease Virus Strain MET95

Kozo TAKASE<sup>†</sup>, Kenichi YAMAZAKI<sup>1)</sup> and Takeshi OBI

(*Laboratory of Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, <sup>1)</sup>The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute*)

### Summary

The haemagglutination activity (HA) of lentogenic Newcastle disease virus MET95 strain was investigated compared to vaccine strains B1 and VG/GA. There is no difference in sensitivity to formalin among them. Their thermostability was different, showing that the B1 strain was the most sensitive. The MET95 and B1 strains inactivated with formalin and adjusted as equal as infectivity or HA activity before inactivation were injected intramuscularly with adjuvant into SPF chickens, then HA inhibition (HI) antibody titers were titrated on 10, 20, 30 and 45 days after injection, using HA antigen prepared from each virus strain. When the infectivity was adjusted, HI antibody was produced equally between the two strains, even though measured with different HA antigen. However, when HA activity was adjusted, HI antibody titers of the group injected with the B1 strain were lower than the MET95 strain.

**Key words:** haemagglutination, lentogenic Newcastle disease virus, MET95 strain, live vaccine virus

<sup>†</sup>: Address correspondence to : Kozo TAKASE (Laboratory of Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Kagoshima University) Tel: 099-285-8724, E-mail: ktakase@agri.kagoshima-u.ac.jp

<sup>1)</sup> The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute: Okubo 1-6-1, Kumamoto, Japan