

かつ加熱不活化抗原でも試験可能であるなどの利点を有し、実験環境、試験目的によっては有用な手段として活用できるものと思われる。

2 組織培養法の確立

現今、組織培養法の活用はウイルス病の研究にとって不可欠の手段である。この研究所においても従来この技術の導入開発に努力がなされたが、施設その他む

第2表 VN 試験と ICF 試験による、ウシ血清抗体価測定値の比較

試験牛 番 号	VN 試験による 抗体価		ICF 試験による 抗体価	
	強毒ウイルス攻撃 前*	7日後	強毒ウイルス攻撃 前*	7日後
C-121	20	640	5	320
C-128	20	640	10	640
C-129	20	640	10	320
C-130	20	640	10	320

* ワクチン接種21日後

VN=ウイルス中和反応, ICF=間接補体結合反応

ずかしい条件が多く、成果を上げるに至らなかった。種々の条件の検討改善を行ない実験を重ねた結果、任期も大半を過ぎる頃になって、やっと子豚腎上皮組織の単層細胞培養が定常的に行ないうようになった。第2表は、この組織培養を活用した試験の結果の1例である。

この表は、ワクチン試験牛の血清中の抗体価を、ICF 試験と、組織培養を用いたVN 試験によって測定し比較したものである。

筆者は初回派遣の研究者としてこの研究所に赴任し、孤軍奮闘のうちに1年が過ぎた。任期の前半はほとんど研究環境の整備と研究材料の確保に追われ、また、後半は研究手段術式の確立に多くを費やし、十分な研究成果をあげ得なかったことを遺憾に思う。しかし、口蹄疫の流行について種々貴重な見聞と体験を重ね得たことはなほ大有意意であった。ICF 試験および組織培養法の確立は、当所において試験動物の血中抗体測定に役立つことが少なくないと思われ、今後これらの方法を活用した研究の成果を期待するものである。

口蹄疫に関する研究

榎 馨

熱帯農業研究センター

駐在場所：Foot-and-Mouth Disease Laboratory,
Pak Chong, Thailand

駐在期間：1969年1月～1971年2月

研究協力者：Pinit Suphavilai (3, 4項のみ)

1 組織培養法による口蹄疫の中和抗体測定

着任当時、当研究所では中和抗体の測定について全く実施されておらず、当研究所で製造されているFrenkel 法による不活化ワクチン（以下ワクチンと略す）の免疫原性については明瞭でなかった。そこでこの免疫原性を知るための方法として、定量的中和抗体測定法について検討した。

まず最初にウイルス価検定について、仔牛腎細胞（着任当時研究所で使用していた）を用いて検討したが、良好な結果が得られなかったため、バンコクにあるウイルス研究所の山田専門家からBHK（ベビーハムスター腎）株化細胞を分与してもらい検討したところ、O, A, Asia 1 各型ウイルス価について良好な結果を得た。それ以後、組織培養にはすべてBHK細

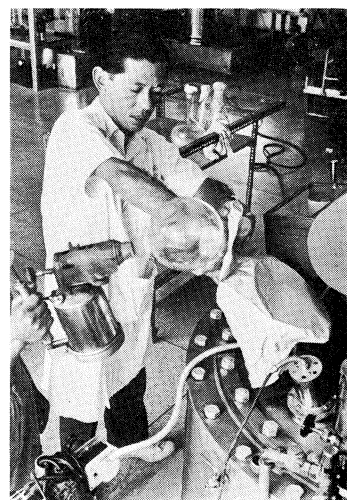


写真1 口蹄疫ワクチン製造作業

胞を用いて実験を行なった。

つぎに、各型ウイルスとこれらのウイルスに感染回

復した牛血清を用いて、中和抗体測定のための基礎試験すなわち、ウイルス量と回復血清を混合後の中和時間や温度並びにこの混合液をBHK細胞に接種後の感作時間などについて検討した。

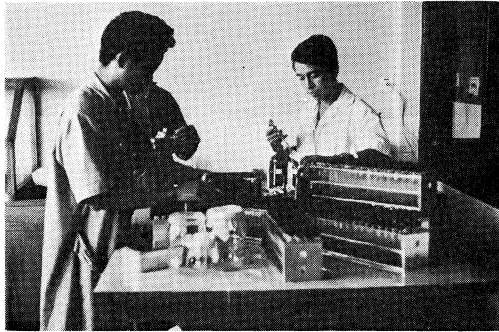


写真2 組織培養による口蹄疫の中和抗体測定試験

1) 成果 血清中の中和抗体価の測定は、56°Cで30分間非働化した各希釈段階の血清 0.5 ml に 200 TCID₅₀/0.1 ml のウイルス液の等量を混合し、37°Cの恒温槽に30分間感作後、その 0.1 ml ずつをBHK細胞培養試験管に接種し、さらに 37°C で30分間孵卵器内で感作して維持培地を加えたのち、孵卵器に静置し5日間細胞変性効果の有無を観察することによって、定量的に抗体を測定することができた。現在、当研究所ではこの方法によって中和抗体価を測定している。

2 口蹄疫ワクチンの効力試験牛における中和抗体の推移

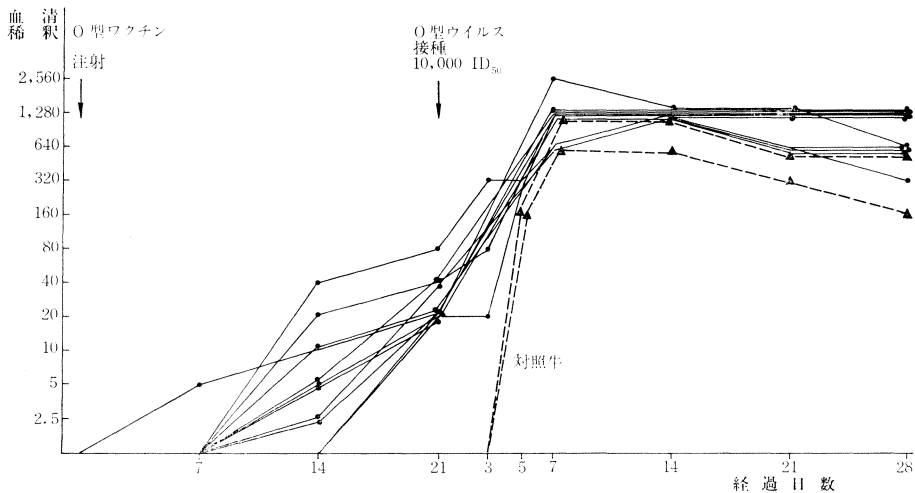
前項1の定量的中和抗体測定法によって、O、A、Asia 1 の各型ワクチンをそれぞれ異なる牛に注射後、

大体7、14、21日目の抗体産生状態を調べ、21日目にそれぞれ同型ウイルスの 10,000 ID₅₀ (50%感染量) を牛舌上皮内に攻撃接種し、その後の全身感染の有無との関係について検討した。また、ウイルス攻撃後の抗体推移についても調べた。

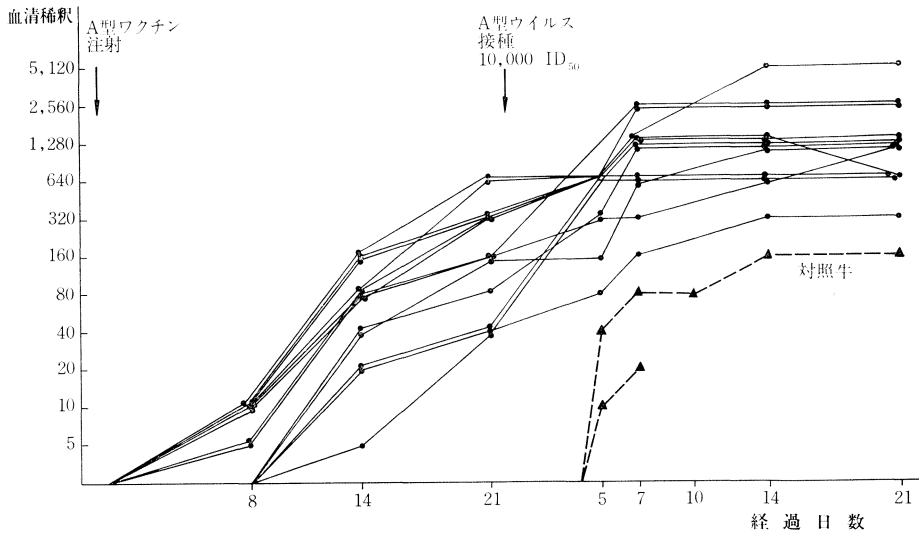


写真3 口蹄疫ワクチン効力試験 (ウイルスの舌上皮内接種)

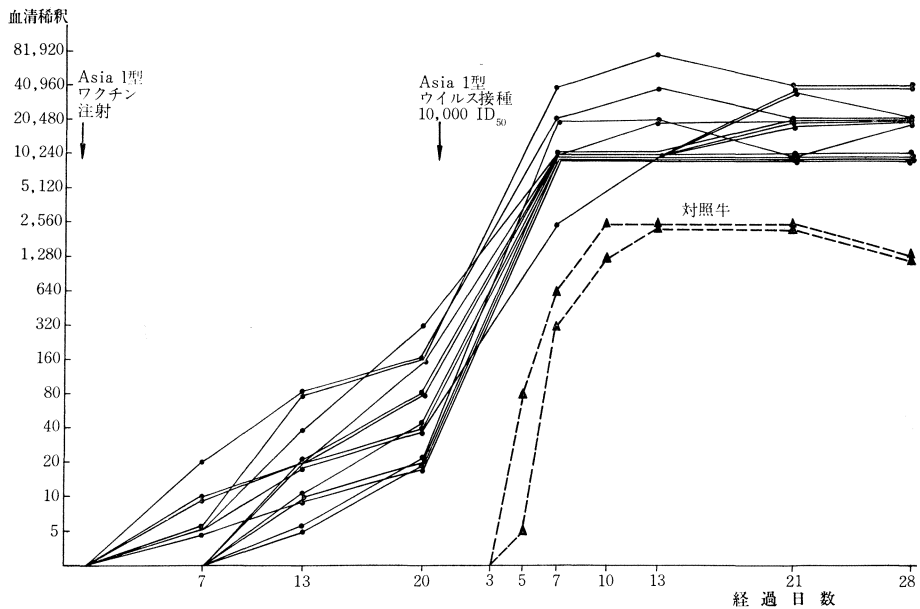
成果 第1、2、3図に略示した。概要はつぎの如くである。1) O型ワクチン注射牛の抗体産生はきわめて悪かったが、これは免疫原性が弱かったことによるものと思われた。他のA型、Asia 1型ワクチンでは良好な免疫を賦与した。一般に、中和抗体は大体7日目頃から産生し、21日目にほぼ最高値に達するものと



第1図 O型不活化ワクチン注射後並に攻撃ウイルス接種後の牛における中和抗体産生



第2図 A型不活化ワクチン注射後並に攻撃ウイルス接種後の牛における中和抗体産生



第3図 Asia 1型不活化ワクチン注射後並に攻撃ウイルス接種後の牛における中和抗体産生

考えられた。2) ワクチンの効力試験において、10,000 ID₅₀ の攻撃ウイルス量に対し全身感染を防禦するためには、20倍(血清希釈)以上の中和抗体価を有しなければならないことがわかった。3) 各型ウイルス攻撃接種後の中和抗体は、7日目に最高値を示すものが多く、おそくとも14日目にはすべて最高値となり、以後暫らく抗体は減少しないものと思われた。なお、対照牛ではウイルス接種後5日目から中和抗体が

出現し、7~14日目に最高値に達した。

3 間接補体結合 (ICF) 反応による口蹄疫の補体結合 (CF) 抗体の証明

CF抗体の証明については、多くの研究者によって行なわれてきたが、いまだ日常の実験室的診断法として確立されていないようである。現在では組織培養によって中和抗体の測定が容易になり、CF抗体については関心がうすれている。しかしながら、CF抗体の

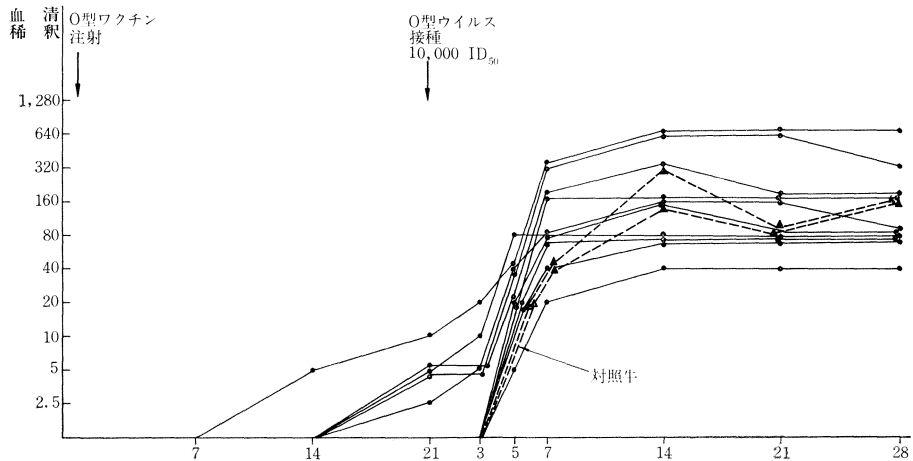
検出がもし容易に実施されるならば、血清学的診断上意義あるものと思われる。この抗体測定についてはさきに徳田研究員によって報告されたが、今回さらに追試験検討を加えたものである。

1) 成果 (1) C F 抗体証明のための反応術式を決定するために、徳田法並びに Traub 法の補体検定、抗原検定、抗血清の力価検定などを応用して、いろいろな条件下で予備試験を行なった。(2) 多くの予備試験の結果、C F 抗体測定のための本試験では下記の条件が最も適当であった。すなわち、口蹄疫に感染回復した牛血清 (56°C 30分非働化) 0.1 ml に抗原 (1 単位) 0.1 ml を加えて 37°C で 30 分間感作させたのち、指示血清 (モルモットの抗血清 1 単位) 0.1 ml, 補体 (1.5 単位) 0.1 ml を加え、37°C で 30 分間再感

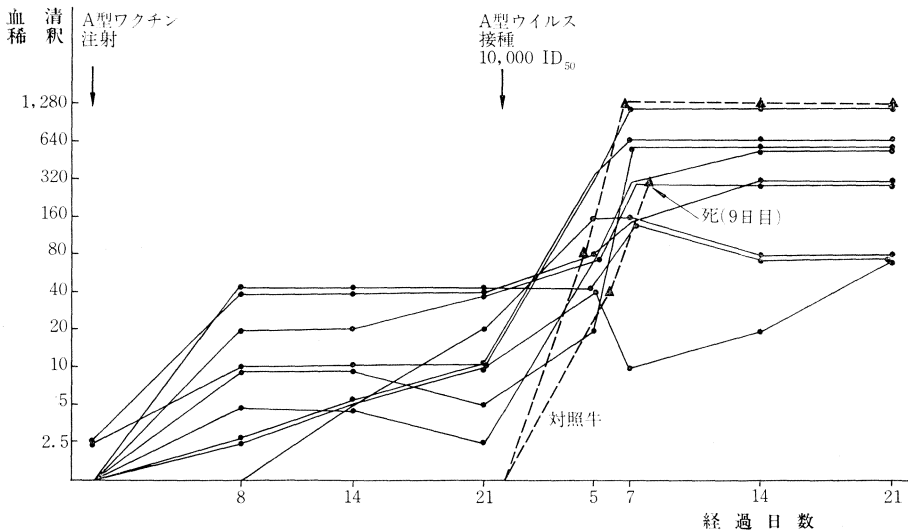
作し、溶血系 (4 単位) 0.1 ml を加えて更に 37°C で 30 分間感作したのち、溶血度を判定した。この術式は徳田法と殆んど同様な結果となったが、若干ことなる点は抗原、指示血清、補体の単位を決定したことである。(3) 上記の術式によって特異的に C F 抗体の検出度を若干高めることが確認され、また、各ウイルス型とそれらの感染牛の回復血清との間にほとんど交差反応もみられず、日常の診断法の一助として、目下タイの口蹄疫研究所で利用されている。

4 口蹄疫ワクチンの効力試験牛における C F 抗体の推移

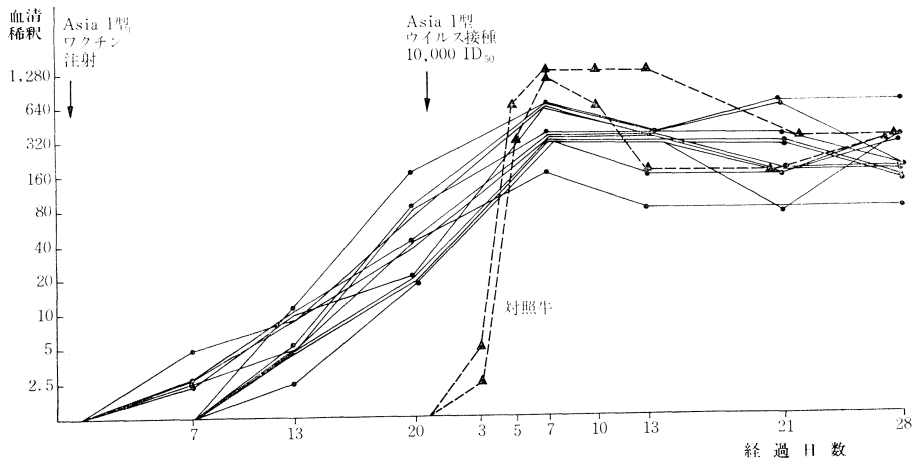
2 の項の試験と同じ牛血清を用い、3 の項の術式によって、ワクチン注射後並びにウイルス攻撃接種後の C F 抗体の推移を調べた。



第 4 図 O 型不活化ワクチン注射後並に攻撃ウイルス接種後の牛における CF 抗体産生



第 5 図 A 型不活化ワクチン注射後並に攻撃ウイルス接種後の牛における CF 抗体産生



第6図 Asia 1型不活化ワクチン注射後並に攻撃ウイルス接種後の牛におけるCF抗体産生

1) 成果 第4, 5, 6図に略示した。概略は下記の如くである。1) O型ワクチンではとくに注射後のCF抗体産生は悪かったが, 他の良好な免疫賦与能のあるワクチンでは, 7日目頃から検出可能であった。しかし, 中和抗体価と比較するとかなり低く現われた。(2) O, A, Asia 1型の共通点として, CF抗体価の高いものほど攻撃ウイルスに対する病変も弱く, 低いものほど強い傾向を示した。そして, 10倍以上のCF抗体価を有する牛は 10,000 ID₅₀の攻撃ウイルスに対し全身感染を防禦した。5倍の抗体価を有する牛でも殆んど全身感染を示さないものが多かった。(3) ウイルス攻撃接種後のCF抗体の推移は, ワクチン注射による免疫程度によって多少異なるが, 大体7日目に最高値に達し, 以後暫らく減少しない傾向を示した。また, 対照牛ではウイルス接種後4日目からCF抗体が出現し, その後は大体上記と同様な抗体の消長を示すものと思われた。

5 口蹄疫無発地域といわれているタイ国南部の牛の抗体調査

タイ国南部では約40年来口蹄疫フリーといわれているが, いまだウイルス学的血清学的に調査検討されていなかった。当国で口蹄疫フリーといわれている根拠は, 臨床的に野外での発生例がないといわれていることや, ワクチンの効力試験時にウイルスのみを接種された対照牛が殆んど全身感染を示すことに基づいているに過ぎない。しかし, この攻撃ウイルス量は多量であり, きわめて弱い免疫状態の牛, 例えば5~10倍程度の中和抗体を有する牛では, 感染防禦できないことが2の項の成績から明らかである。一般に無処置健康牛では5倍以上の抗体価を示さないものと考えられて

いる。そこで, これらの点について検討するため, 当研究所でワクチン効力試験牛として, タイ国南部から購入した2~3才の牛239頭について, 前項1の定量的中和抗体測定法並びに前項3のICF反応(成績は紙面の都合で省略)によって, O, A, Asia 1の各型ウイルスに対する抗体調査を行なった。

1) 成果 (1) O型ウイルスに対し, 5倍希釈血清で陽性を示したものは13頭(5.4%), 10倍では4頭(1.7%), その他は5倍以下であった。(2) A型ウイルスに対しては5倍以下であった。(3) Asia 1型ウイルスに対し, 5倍希釈で陽性を示したものは3頭(1.3%), その他は5倍以下であった。(4) 反応陽性牛は過去において口蹄疫に感染したことも疑われるが, 現段階では調査例数も少なく, また在来種牛の個体差や飼育環境その他によっても多少異なることも考えられるので, これが直ちに口蹄疫と結びつけて断定することはできない。したがって, 今回の調査結果からは, 口蹄疫が存在するということが皆無であるということも云えない。この重要な問題点については, さらに南部地域の牛血清について例数をふやして調査を続けていく必要がある。

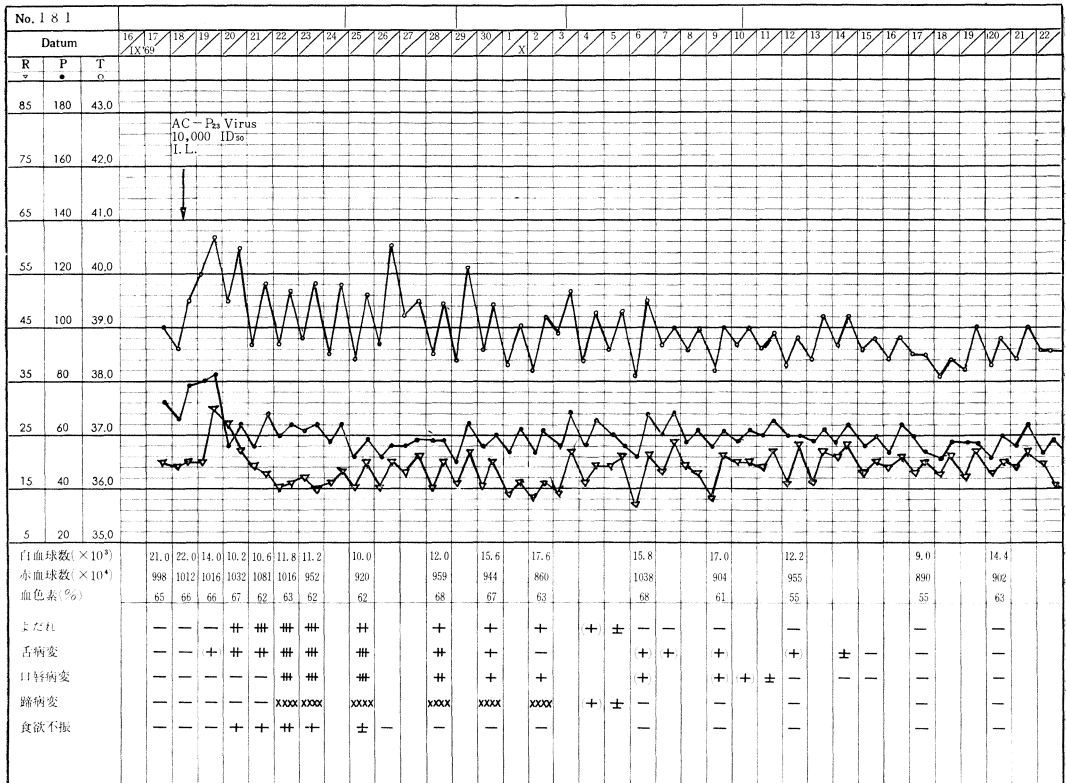
6 口蹄疫ウイルス人工感染牛の臨床所見ならびに血液所見

当研究所では口蹄疫ウイルス接種牛の臨床所見について殆んど記録がなく, 担当者の経験によって記憶しているに過ぎなかった。そこで, タイ国在来種牛のウイルスに対する感染発症状態とその後の経過を明らかにするため各型ウイルスの10,000 ID₅₀をそれぞれ3頭ずつ在来種牛の舌上皮内に接種し, 約5週間臨床検査並びに血液検査を行なった。

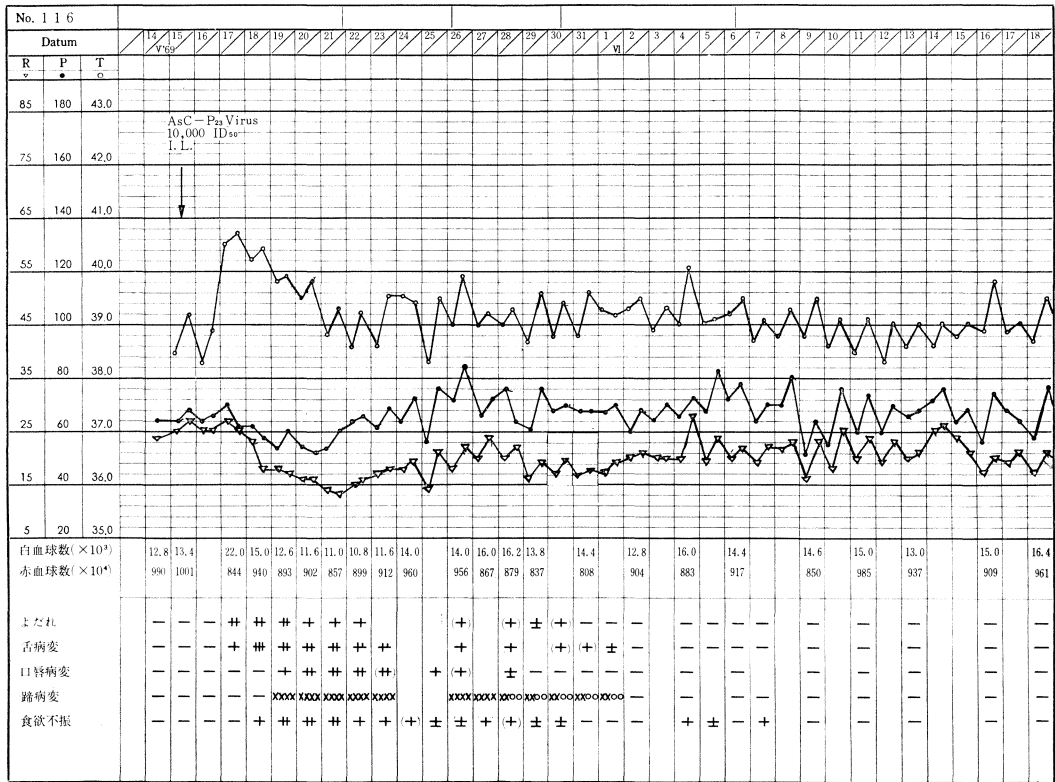
1) 成果 臨床所見はウイルスと牛の両方の性質の
かねあいによって多少異なるが、大方の症状は大体共
通しており、各ウイルス型間による差はとくに認めら
れないようであった。紙面の都合上2例のみを第7、8
図に示した。また、死亡例はまれであるが、その症状
は第9図に示すように特徴的な所見を示した。(1) 臨
床所見 ① 体温はウイルス接種後大体24時間で急激
に40~41°Cの発熱を示し、大体2日間稽留したのち
3~4日目に下熱する。元気食欲も消失する。10日目
頃一時再発熱するものもあるが、これは蹄の水胞形成
破損後の細菌の二次感染によるものと思われる。②脈
膊は発熱に伴なって第1日目に増加する例が多いが、
第2日目には減少し、下熱と共に正常に復す傾向を示
す。再発熱する例では再び増加するものもある。③呼吸
数は脈膊数と大体平行する傾向がみられるが、下熱後
2日目頃から4~5日間呼吸測定困難となるものもある。
④ 舌上皮内にウイルス接種後の病変は、24時間
目に部分的に水胞を形成し、48時間後には舌全般に及
び、水胞は破れて爛斑が現われる。この爛斑は4~5
日後から回復に向い、早いものでは10日以内、遅いもの

では3週間以内に完治する。⑤ 流涎は舌の病変と関
連を有し、接種後翌日からみられるものもあるが、大
体2日目から認められ、10日目頃には殆んど消失す
る。⑥ 蹄温は高くなり、蹄冠部、趾間の皮膚の水胞
形成は、接種後2日目にみられたものがあるが、これ
はきわめてまれな例であると思われ、3日目になると
大体全身感染して症状はきわめて明瞭となり、蹄趾間
の水胞形成は破れて爛斑を形成する。そして歩行をき
らうようになり跛行する。その後爛斑が消失して正常
に復するまでには、牛舎内のコンクリート上の飼養管
理で約2週間要する。治癒の経過は飼養管理条件によ
って異なり、野外で自然感染した場合は、細菌による
二次感染やウジの発生などで治癒するまでにかかり経
過が長くなる例が多いものと思われる。⑦ 食欲は舌
病変と或程度関連を有し、ウイルス接種後2日目に舌
や口唇に爛斑形成がみられると同時に食欲減退がはじ
まり、3~4日目には全く癡絶する。食欲の回復は舌
病変がはじまってから約1週間後に回復しはじめ、同
時に元気も回復する。

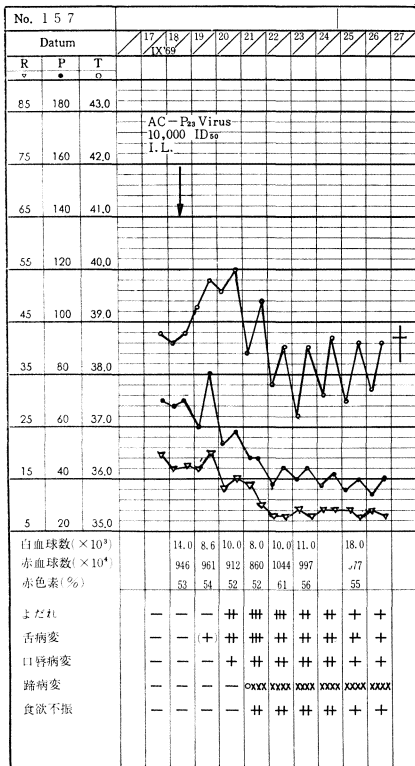
2) 血液所見 重症例では白血球が半減する例がみ



第7図 A型ウイルス接種牛の臨床所見



第8図 Asia 1型ウイルス接種牛の臨床所見



←第9図 A型ウイルス接種牛の臨床所見

られたが、一般的にとくに口蹄疫に特徴的な血液所見は見出せなかった。

以上の所見から、現在タイ国で知られているO, A, Asia 1型ウイルスを、在来種牛へ人工接種感染させることによって、タイ国で自然発生している口蹄疫の臨床症状について推察することができた。