

# マイクロタイター法によるウシアデノウイルスおよびパラインフルエンザウィルスの赤血球凝集抑制反応の術式

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	稲葉, 右二
巻/号	24巻6号
掲載ページ	p. 321-325
発行年月	1971年6月

WALKER, B.S. and JANNEY, J.C.: *Endocrinology*, 14, 736 (1930). 20) ZONDEK, B. and SKLOW, J.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 49, 629 (1942).

21) 末光: 化学と生物, 4, 1 (1966). 22) WILLIAMS, C.: *Endocrinology*, 73, 736 (1963). 23) COPPEDGE, R.L. SEGALOFF, A. SARETT, H. and ALTSCHUL, A.: *J. clin. Endoc.*, 8, 602 (1948). 24) 堀口: 日産婦誌, 7, 303 (1955). 25) RUPP, J. CANTAROW, A. RAKOFF,

A.E. and PASCHKIS, K.E.: *J. Clin. Endoc.*, 11, 688 (1951).

26) TALBOT, N.B.: *Endocrinology*, 25, 601 (1939). 27) KALLELA, K. and MOBERG, R.: *Nord. Vet. Med.*, 17, 291 (1965). 28) BENNETTS, H.W. and UNDERWOODS, E.J.: *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 29, 249 (1951). 29) 西川: 農技研報告, G, 14, 15 (1958). 30) 小笠, 松山, 須川: 家衛試水曜会記事 10(6) 3 (1961).

## 技術講座

## マイクロタイター法によるウシアデノウイルスおよびパラインフルエンザウイルスの赤血球凝集抑制反応の術式

稲葉 右二\*

(昭和 45 年 8 月 2 日受付)

血清反応の領域で反応物質の微量化あるいは術式の省力化のための工夫, 改良がなされた結果, マイクロタイター法が考案された. 本法はもともとインフルエンザウイルスの赤血球凝集 (HA) 反応および赤血球凝集抑制 (HI) 反応を行なうための超微量法の一つとして開発されたものである. 現在では各種ウイルスの HA 反応, HI 反応, 中和反応および補体結合反応などウイルス学領域の各種血清反応に広く用いられ, 実用化されている.

このマイクロタイター法の原理は, これまでのピペットと試験管による希釈法とは本質的に異なる方法である. すなわち, ピペットの代わりにダイリ्यूター (希釈棒) とドロッパー (滴下用ピペット) を用い, 試験管の代わりに 96 個の穴のあいたプラスチック製プレート (反応板) を用いる.

前回は試験管法によるウシアデノウイルスおよびパラインフルエンザウイルスの HI 反応術式を紹介したが, 今回はこの試験管法よりもはるかに省力的で経済的で, かつ家畜保健衛生所の段階でも容易に実施しうるマイクロタイター法についてその術式を紹介する. まず実験にさきだち次の器具および材料を用意する.

### 1. マイクロタイター

これは一つのセットになっており, 次の部品が含まれている. (1) プレート: 従来の HI 反应用プレートを縮小したもので, 厚さ 11 mm, 82.5×128.6mm の透明なプラスチックのプレートで, これに直径 6mm の穴が 8×11, 計 96 個ある. この穴底には U 字型のものと, V 字型のものとがあり, 前者は HA 反応, HI 反応などの凝集反応や中和反応に用いられ, 後者は補体結合反応や

ASLO 反応などの溶血反応に用いられる. このプレートは耐熱性がないので煮沸滅菌および高圧滅菌はできない (不可能である). 使用後は直ちに 0.05~0.1% 次亜塩素酸ソーダ液 (20~50 倍希釈オーヤラックス) に 1 晩つけて消毒し, 軽く水洗後洗剤につける. その後洗剤をふり落してから水道水でよく水洗し, 最後に蒸留水で水洗してからふらん器または室温で乾燥させると再び使える. なお, ディスポーザブルのプレートで Linbro 製, IS-MRC-96 (大洋物産扱い) は材料の希釈操作が容易であり, また安定性もあって便利である. (2) ドロッパー: 一滴が 0.025 ml ± 2% になるように調製された滴下用ピペットである. ドロッパーは耐熱性で煮沸滅菌も高圧滅菌も可能である. (3) ダイリ्यूター: 長さ 184 mm, ステンレス製のもので, その先端部は「つりがね」状になっており, 液体を 0.025 ml 吸着するように調製してある. (4) 検量紙: 厚手の沓紙にリングが印刷してあり, 0.025 ml の液体が中心から, ちょうどリングの所までしみこむようにできている. (5) その他の部品: シールテープ (液体の蒸発を防ぐ), シールするためのローラー, ミクロミキサー (プレートを振盪し, 穴の中の溶液を混和する器具), ドロッパー および ダイリ्यूター用のスタンドなどがセットに含まれている.

### 2. 遠心器 (血球の洗浄用)

### 3. 恒温槽 (被検血清, 非働化用)

### 4. 乳鉢および乳棒 (カオリン乳剤調製用)

5. アルスバー液 (採血に使う, ブドウ糖 2.05g, クエン酸ソーダ 0.8g, 食塩 0.42g, クエン酸 0.055g, 蒸留水 100ml, 115°C 10 分間滅菌, 最終 pH 6.1 とする).

6. 希釈液 まず次のようなストック溶液を作る. (1) 5×VBS (5 倍濃度ペロナール緩衝食塩液) …… NaCl

\* 農林省家畜衛生試験場

85.0g, ペロナール (5,5-diethylbarbituric acid) 5.75g, ペロナールソーダ (Sodium 5,5-diethylbarbiturate) 3.75g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.68g, CaCl<sub>2</sub> 0.28g, 蒸留水 2,000 ml. まず, ペロナールを約 100 ml の蒸留水に加温しながら溶解した後, 残りの試薬を加えて全量を2,000 ml とする. 115°C 10 分高压滅菌後, 4°C に保存する. 使用の際は, この溶液1容を4容の滅菌蒸留水で希釈し, 1×VBS として使う. 200 ml ずつ壺に分注して4°C で保存すると便利である. (2) 5%BSA (5%ウシ血清アルブミン溶液)……ウシ血清アルブミン (Armour 製, Fraction V) 5.0g, 1×VBS 100 ml, 沝過滅菌後, 4 ml ずつ小試験管に分注して, ゴム栓をし -20°C で保存する. (3) 1%ゲラチン溶液……ゲラチン 1.0g, 蒸留水 100 ml, 115°C 10分高压滅菌 (ゲラチンはこの時熱でとける). 4 ml ずつ小試験管に分注して, ゴム栓をし, 4°C で保存する. 使用時, 温浴でとくす. 以上のストック溶液を作ったら, 次の要領で希釈液を調製する. 1×VBS 200 ml に5% BSA 4 ml, 1%ゲラチン溶液 0.2 ml を加える. この溶液で抗原, 血清の希釈をしたり, 血球浮遊液を作る. (4) 25%カオリン乳剤: 希釈液 100 ml 中に Fisher 製 Acid washed カオリン 25g を含む.

7. 赤血球浮遊液 2,000 rpm 5分間遠心沈澱により3回洗浄された0.2%のウシまたはヒツジ赤血球浮遊液を用いる. なお, ウシ赤血球の場合, アデノ抗原に対し, その HA 値にかなり大きな個体差があるので注意すべきである. 将来抗原と一諸にホルマリン固定乾燥赤血球がメーカーで販売される予定である.

8. 抗原 メーカーで HI 用凍結乾燥抗原が販売される予定である.

9. 被検血清 急性期 (発病5日以内) と回復期 (発病2~3週) のペア血清. これら血清は小試験管に分注し, ゴム栓をして, -20°C で凍結保存する.

以上の準備が終わったら, 次の順序で実験をすすめる.

1. 抗原の検定

1) U字型プレートを用いる. 0.025 ml のドロPPERで希釈液を5 ml 位吸いあげる. ついで先端をガーゼかティッシュペーパーでよくぬぐい水滴が真下からのみ滴下するようにする. よくぬぐわないと水滴が先端から横にはみだしたりして, 液量が不正確になる. ついで検量紙の中央に1滴下して, ちょうどリングの所までぬれることを確かめてから, ドロPPERを垂直にもって, 表1のように穴番号1~12に1滴ずつ滴下する.

2) 0.025 ml のダイリ्यूーターの先端を蒸留水でよく洗条後, アルコールランプまたはブンゼンバーナーの火焰で軽く焼き有機物, とくに油をやきとる (白熱するまで焼かないこと). 放冷してから蒸留水で先端をぬらす. ついで先端を沝紙につけて水をきる. 再び先端を蒸留水の表面にのみ触れて水を吸いあげ検量紙の中央に先端を密着させ, リングの所までぬれることを確める. ついで抗原の表面に先端を触れて抗原を吸いあげる. この場合ずぶっと先端を抗原の中に浸してしまうと外側にまで抗原が附着して, その分だけ過量になるので注意する. 抗原を吸いあげたダイリ्यूーターの先端を第1穴に入れる.

3) 泡をたてぬようにダイリ्यूーターの上端を拇指, 人さし指, 中指で持ち, 回転攪拌する (往復5回も回転すれば十分である). この場合ダイリ्यूーターをプレートに押しつけると穴底に「キズ」がつきやすく, また先端を穴底より持ちあげすぎると泡がたちやすいので注意する. ついでダイリ्यूーターの先端に近い部位を鉛筆で字を書くようなかっこうで持ち, ダイリ्यूーターの先端を穴の側壁につけないようにして垂直に持ちあげ, 同じ注意しながら第2穴に入れる. ダイリ्यूーターを同じ要領で回転させ, 第3穴に移す. このようにして抗原の

表1 抗原の検定術式

穴番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原希釈倍数	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	白球対照
抗原	原液 0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	—
希釈液	0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
希釈液	0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
プレートを4°Cで1晩放置し十分冷却する												
4°Cに冷却された0.2%血球浮遊液	0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
HA	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

上例ではHA値は128とし, 128を4で割った数に希釈した抗原液, すなわち, 1:32希釈したものをHI反応の抗原として使用する.

2倍階段希釈列を第11穴まで作る。第12穴は血球対照である。

4) 希釈液をドロップパーで1滴ずつ第1～第12穴まで滴下する。これはHI反応での被検血清の代わりである。

5) プレートにシールテープをローラーでよく密着させるか、またはプレートの上からのプレートをのせて、液量の減少を防ぐ。

6) 0.2%の赤血球浮遊液を希釈液で調製する。

7) 上記プレートおよび赤血球浮遊液を4℃の氷室または冷蔵庫で1晩放置し、十分冷却する。この冷却が十分でないと、ウシアデノ抗原の場合はHA像が陰性になったり、HA価が低くなるので注意する。

8) 翌朝0.2%赤血球浮遊液をドロップパーで1滴ずつ全部の穴に加える。ついでマイクロキサーでプレートを振盪してよく混合する。

9) プレートの上に十分冷却された、からのプレートをのせ、4℃の氷室または冷蔵庫に約4時間放置する。

10) プレートを氷室または冷蔵庫から出して結果を判定する。なおウシアデノ抗原のHA像は室温では急速に消失するため、HAの判定は迅速に行なうか、氷室内で行なうことが望ましい。判定は真白な紙を敷き、その上にプレートをおいて、穴の真上からHA像を観察する。穴底一面に広がる凝集像または血球対照にくらべ直径がやや大きく、周囲がざざざ状の円盤を作っているものは(+)と記載する。直径の小さい、周囲の平滑な円盤を作っているものは(-)と記載する。(+)すなわち完全凝集した抗原の希釈倍数をその抗原のHA価とし、この抗原濃度を1単位とする。HI反応には4単位の抗原量を用いる。たとえば、第7穴までHA(+)であった場合、その抗原のHA価は128とし、このHA価を4で割った数に希釈した抗原液、すなわち32倍希釈抗原の0.025mlを次のHI反応に使用する。

2. 被検血清の処理

血清中には非特異的にウイルスのHAを抑制する物質

や赤血球を凝集する自然凝集素が含まれていることがある。したがってHI反応を実施する前には必ずこれら物質を除去するため、次のような処理をしておかなくてはならない。

1) 被検血清の非働化：血清1容に対し希釈液1.5容を加えてから56℃の恒温槽で30分間加温する。

2) 被検血清のカオリン処理：上記非働化血清と等量の25%カオリン乳剤を混合し、室温で十分振盪しながら30分間感作する。

3) 被検血清の血球処理：以上の処理を終えたウシ血清（血清は5倍に希釈されている）には赤血球を凝集する自然凝集素が含まれていることがある。このような場合にはHI反応に用いるのと同じ赤血球のPacked cellをドロップパーで1滴ずつ加え、十分振盪し、4℃に1時間おいた後、赤血球を遠心沈殿によりおとし、その上清を使用する。しかし、ウシ赤血球を使用する場合、この処理を必要とする血清は0.1～0.05%位でほとんどこの処理をしなくてよいが、ヒツジ赤血球を使用する場合は必ずこの処理をしなくてはならない。

3. HI反応

1) プレートの第10穴の上に粘着性テープ（Shuford製 Shurtape、堀江商事扱い、4色ある）を縦にはり、血清番号を記入するか、またはガラス鉛筆でプレートの左端に血清番号と第9穴と第10穴の間に線を引く（希釈や滴下操作を間違えないようにするため）。

2) ドロップパーで希釈液を表2のように第10、11穴を除く全部の穴に1滴ずつ滴下する。

3) 被検血清の表面にダイリューターの先端を触れて血清を吸いあげる。このダイリューターをプレートの第1穴に立てる。なお、ダイリューターはプレートの穴に立てられるので、同様にして順次8本立てていく。ついでダイリューターを8本ずつ両手掌の間に揃えてはさみ、すり合わせるようにして回転攪拌（往復5回で十分である）する。ついで、ダイリューターを両手掌にはさんだままプレートの近くまで両手を下げてからダイリューター

表2 HI 反 応 術 式

穴 番 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
血清希釈倍数	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560			血清対照 1:10	
血 清	1:5 希釈 0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	—	—	1:5 希釈 0.025
希 釈 液	0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	—	—	0.025 すてる
抗 原	0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	—	—	—	希釈液 0.025
プレート を 4℃ で 18 時間 放置 し 感 作 す る													
4℃に冷却された 0.2%血球浮遊液	0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025			0.025

表3 使用抗原の検定術式

穴 番 号	1	2	3	4	5	6
抗 原 単 位	4	2	1	1/2	1/4	血球対照
抗 原 (使用抗原を第1, 第2穴に滴下する) 希 積 液	0.025ml	0.025ml	0.025	0.025	0.025	—
希 積 液	0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
プレート を 4℃ で 18 時間 放置 し 十分 冷却 する						
4℃ に 冷却 された 0.2% 血球 浮遊 液	0.025ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
HA	+	+	+	-	-	-

ーを持ち上げ第2穴にダイリューターの先端を入れる。以下同様の操作を順次第9穴までくりかえし、血清の2倍階段希釈列を作る。第9穴の回転攪拌が終了したダイリューターはそのまま持ち上げ、その先端を汚紙に密着させて液体を吸いとる。ついで同一血清を再びそのダイリューターで吸い上げ、第12穴に入れ回転攪拌する(血清対照)。なお、多数の被検血清を同時に数種の抗原、たとえばウシアデノウイルス1型、2型、7型およびパラインフルエンザウイルス3型などの抗原に合わせる場合はプレートを抗原別に用いた方が便利である。

4) プレートの第10, 11, 12穴を除く全部の穴に4単位の抗原をドロッパーで1滴ずつ滴下する。第12穴には抗原の代わりに希釈液を1滴ずつ滴下する。なお、使用した抗原が適正であったかどうかしらべるため、同時に抗原対照をおく。すなわち、表3のように第1穴から第5穴まで希釈液をドロッパーで1滴ずつ滴下し、4単位の抗原をドロッパーで第1穴と第2穴に滴下する。ダイリューターで第2穴から第5穴まで抗原の2倍階段希釈列を作る。ついで第2穴から第5穴まで希釈液をド

ロッパーで1滴ずつ滴下する。第3穴が最終的に1HA単位を示すことになる。

5) プレートをマイクロキサーで十分振盪する。ついでこのプレートの上に1枚空のプレートをのせて、4℃の水室かまたは冷蔵庫で1晩(約18時間)感作する。

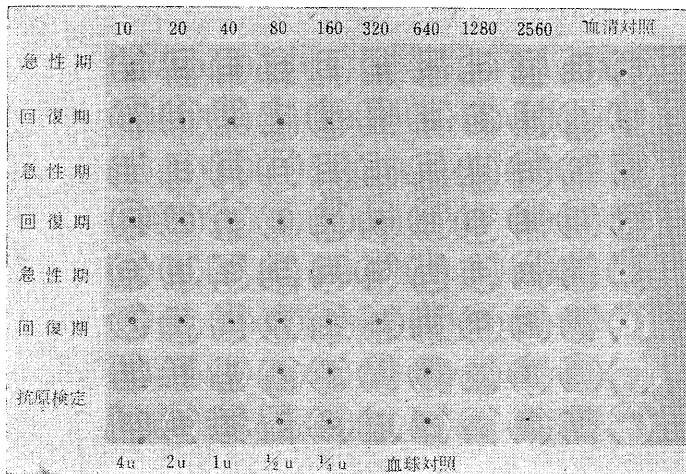
6) 翌朝、あらかじめ4℃に冷却された0.2%赤血球浮遊液をドロッパーで1滴ずつ、プレートの全穴(第10, 11穴は除く)に滴下する。プレートをマイクロキサーで十分振盪し、このプレートの上に、4℃に冷却された空のプレートを1枚のせ、4℃の水室または冷蔵庫で約4時間感作させる。なお、希釈液2滴と赤血球浮遊液1滴とを混合した血球対照をおく。

7) 判定: 血球対照および血清対照が完全にHA陰性であることをたしかめてから判定する。凝集像が完全に抗制されている血清の希釈倍数をもってその血清のHI価とする。なお、この場合抗原対照で第3穴までHA(+)で第4穴以降がHA(-)であればHI価の補正はしなくてよいが、第2穴までしかHA(+)にならなかった場合は、HI価を1穴分低く補正(1/2倍)し、第4穴までHA(+)の場合は1穴分高く補正(2倍)する。

4. 診断

急性期および回復期血清の各抗原に対するHI価が判定できたら、回復期血清のHI価/急性期血清のHI価を求め、これが4以上なら、そのウイルスによる感染と診断し、2なら感染の疑いもしくは結論不明とする(急性期と回復期血清の採血時期があまり接近し過ぎると両者のHI価に差がみられないことがある)。また、HI価10以上の血清は抗体陽性とする。

診断を急ぐ場合は、次の変法を用いてもよい。-20℃のディープフリーザーで十分予備冷却されたプレートおよび赤血球浮遊液(生赤血球の場合は凍結されないよう注意する)を用いて抗原の検定を午前中に行ない、午後判定する(血球の沈下に約4時間かかるので、あらかじめこの時間を計算に入れておくこと)。ついでHI反応を実施する。この場合、被検血清と抗原との感作を室温で1時間行なった後、プレートを-20℃のディープフリーザーで十分冷却する。次に冷却された赤血球浮遊液を加え、4℃の水室または冷蔵庫で1晩放置し、翌朝結果を読む。要するにウシアデノの場合は、低温



感作（4℃）が反応成立のための必須条件である。しかし、パラインフルエンザだけの診断を目的とする場合

は、プレートおよび赤血球浮游液の予備冷却は省略してよい。

## 獣医師の英文の呼称名について

金 川 弘 司\*

本誌 23 巻 1 号 29 頁 (1970) に「獣医師の英文の呼称名(参考)」と題して次のような参考記事が載った。比較的短文なのでもう一度その全文を載せると次に示した通りである(「」内)。

「一般に獣医師という場合は Veterinarian を使用します。また正式名(書類等の)では Obtained the national license of D.V.M. といっております。

日常の表現の Dr. は敬意を表わした表現で先生という意味です。正式にいうと大学院修士課程を終えたという意味が正しいわけです。」

私はカナダ・アメリカに数年間滞在して、カナダ・アメリカはもちろん、イギリスやその他の英語を母国語ないし公用語としている国からの留学生、大学教官および獣医師などに会ってみて、上記の参考記事からはむしろいくらかの混乱を与えられる恐れがあると思われるので、私の調べた範囲で獣医師の英文の呼称名についても一度考えてみたい。私の調査方法はできるだけ多くの外国人からの聞き取り調査と、それを裏付けるために英語を公用語ないし準公用語としている国々の獣医科カレッジ、獣医師会および農林省に問い合わせを出し、回答のあった 23 カ国についてまとめたものである。第 1 表には獣医教育を行なっている 11 カ国のみを、第 2 表には自国では獣医教育を行っていない 12 カ国について表示した。

第 1 表をみると 11 カ国のうち 6 国は Veterinary Surgeon を、4 国は Veterinarian を、そして 1 国がこれらの両方を使用している。おもにイギリスと英連邦諸国の多くは Veterinary Surgeon を獣医師の公式名として使い、アメリカと一部の国は Veterinarian を使用している。第 2 表に示した獣医学校の存在しない国のうち多くは Veterinary Officer を使用しているが、これはこれらの国では獣医師数が非常に少なく、そのほとんどが政府機関に関係しているためと考えられる。また、マレーシアではイギリス、南アフリカ連邦およびカナダの獣医科カレッジを卒業して獣医師の資格を取ったものを Veterinary Officer と呼び、インドおよびパキスタンの獣医科カレッジを卒業して獣医師になったものを Assista-

nt Veterinary Officer と区別し、この Assistant Veterinary Officer は数年後に Deputy Veterinary Officer に昇進することができる。

獣医教育の期間と卒業時に与える学位の関係をみると、イギリスは 5 年間で学位は Bachelor of Veterinary Science (B.V.Sc.) であるためミスター (Mr.) を、アメリカは 6 年間で学位は Doctor of Veterinary Medicine (D.V.M.) であるためドクター (Dr.) を一般に使用している。獣医師としての資格についてはフィリピンだけが政府の国家試験を行なっており、この点からみても本誌 1 号の記事中の Obtained the national license of D.V.M. と云う表現はあたかも世界中の英語を使用している国全部がこのような表現を使っているかのごとき印象を与えるので適当とはいえないのではなからうか。フィリピン以外で D.V.M. の学位を出しているカナダ・アメリカにも National Veterinary Medical Licensing

第 1 表 英語使用国の獣医師呼称名

国 (A B C 名 順)	獣医 教育 学 位 期 間	獣医師の呼称名	
		一 般	公 式
Australia	5年 B.V.Sc.	Mr. Dr.	Veterinary Surgeon
Canada	6 {D.V.M. D.M.V.*1	Dr.	Veterinarian
Ceylon	4 B.V.Sc.	Mr.	Veterinary Surgeon
England	5 B.V.Sc.	Mr.	Veterinary Surgeon
India	4 {B.V.Sc. B.V.Sc. & A.H.	Mr.	Veterinary Surgeon
Ireland	5 M.V.B.*2	Mr.	Veterinary Surgeon
New Zealand	5 B.V.Sc.	Mr.	{Veterinary Surgeon Veterinarian
Pakistan	4 D.V.M.	Dr.	Veterinary Surgeon
Philippines	6 D.V.M.	Dr.	Veterinarian
Republic of South Africa	5 B.V.Sc.	Dr.	Veterinarian
U.S.A.	6 {D.V.M.*3 V.M.D.	Dr.	Veterinarian

注：\*1 Docteur en Médecine Vétérinaire, ケベック獣医科カレッジ(仏語系)のみ。

\*2 Bachelor of Veterinary Medicine.

\*3 Veterinariae Medicinae Doctoris, ペンシルバニア大学のみ。

\* ウェイン州立大学医学部繁殖生理部門