

マレック病の血清反応

誌名	鶏病研究会報
ISSN	0285709X
著者名	湯浅, 囊
発行元	
巻/号	7巻4号
掲載ページ	p. 179-183
発行年月	1971年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



マ レ ッ ク 病 の 血 清 反 応

湯 浅 襄 (農林省家畜衛生試験場)

1967年 CHURCHILL & BIGGS¹⁾ はマレック病 (MD) にかかっている鶏からある種のウイルスを試験管内 (組織培養) で初めて分離することに成功し、それが MD の原因ウイルスであろうことを示唆して以来、MD に関するウイルス学的研究は急速に発展した。このウイルス (MDV) は組織培養の細胞で特徴的な細胞変性を伴って増殖し、原形質内に封入体を作ること、感染性のあるウイルスは生きた細胞の中のみ存在し、凍結融解などにより細胞を破壊すると感染性が失なわれること^{*1}、DNA (デゾキシリボ核酸) を含むウイルスであること、又電子顕微鏡による形態学的観察から、B 型のヘルペスウイルスであることがわかり、現在のところ、この B 型ヘルペスウイルスが MD の原因ウイルスであると考えられている。MDV に対する血清学的診断の手段として寒天ゲル内沈降反応 (AGP)、蛍光抗体法、間接血球凝集反応、中和反応などが行なわれているが、ここでは、一番簡便な方法である AGP を中心に解説したい。

1. AGP (寒天ゲル内沈降反応)

普通、ウイルスの血清反応として、多く用いられる反応は赤血球凝集抑制反応 (HI 反応) と中和反応である。HI 反応はニューカッスル病ウイルスなどのようにウイルスが赤血球を凝集させる性質をもっていることを利用する反応であり、中和反応はウイルスがそのウイルスに対する特異的抗血清 (陽性血清) により増殖が抑制される (ウイルスが中和される) ことを利用する反応である。しかし MDV は赤血球凝集能を持たず、また、前述したように感染性のあるウイルスは常に細胞の中に存在しているために、抗血清によりウイルスは中和されない。したがって HI 反応や中和反応は応用できない^{*2}。

*1 特殊な処置をすれば細胞フリーのウイルスをうるることができる。

*2 細胞フリーのウイルスを用いて行うことができるが、まだ、すべてのウイルス株について実施出来る段階にはいたっていない。

CHUBB & CHURCHILL²⁾ は MDV の血清反応として AGP を応用した。この反応は寒天の層に 2 個の穴をあけ、一つに抗原 (ウイルス)、他方に血清を入れる。もし、両者が反応すると、2 つの穴の中央に目に見える白色の沈降線が形成されることを利用するものである。CHUBB & CHURCHILL は AGP により MDV 感染鶏の抗体の検出に成功した。すなわち、MDV を鶏腎組織培養細胞で増やし、その感染細胞を抗原とし、MD 感染鶏血清との間に特異的な沈降線が形成されることを認めた。

これにより、MDV 接種鶏の血清を調べたところ、用いたひなはほとんどすべてが接種時 (1 日令) に抗体を有し、2 週令時にもまだ陽性のものがあつた。それは 3 週令時には陰性となり、4 週令時から再び陽性となった。以後は陽性のまま経過した。接種鶏群と同居させた鶏群では抗体の出現が遅れた (表 1)。また、11 のフロック、11

表 1. MDV HPRS-B14 接種後の AGP 抗体の出現

接種鶏	週						MD 病変
	0	2	3	4	5	6	
058	NT	+	-	+	+	+	+
061	+	+	-	+	+	+	+
064	+	-	-	-	+	+	+
067	+	-	-	-	-	-	-
072	+	+	-	+	+	+	+
076	+	-	-	+	+	+	+
080	+	+	-	+	+	+	+
084	+	+	-	-	+	+	+
086	+	+	-	+	+	+	+
同居鶏							
055	+	+	-	-	+	+	+
057	+	+	-	-	+	+	+
060	+	-	-	+	+	+	+
063	+	+	-	-	-	-	-
066	+	-	-	-	+	+	+
069	+	-	-	-	-	-	+
071	+	+	-	-	+	+	+
074	NT	+	-	-	+	+	-
078	+	+	-	-	-	-	-

CHUBB & CHURCHILL.

表 2. 11 鶏群の血清の抗体保有

系統	週令	検査数	陽性数
A	20	48	45
B	20	40	40
C	20	16	16
D	>20	10	9
E	>20	11	11
F	>20	9	9
G	>20	10	10
H	>20	9	9
I	>20	9	9
J	>20	9	8
K	>20	14	9

CHUBB & CHURCHILL.

表 3. 日本における MDV 抗体分布 (成鶏)

年次	採取場所	検査数	陽性数
昭和 33	北海道	5	3
34	〃	5	4
35	〃	5	0
36	〃	5	0
38	東京, 北海道	11	10
39	北海道	5	5
40	全国 8 県	418	256
44	全国 23 県	432	334

鶏種の血清について検査したところ調べた全ての鶏群が陽性群であった。個体別陽性率は 94% であった。(表 2)。

私たちも AGP により、日本における MDV 抗体の分布を調べた。表 3 に示したように、例数は少いが昭和 33 年の血清に陽性のものがあり、昭和 44 年、全国 27 県下の 432 例の種鶏の卵黄抗体を検査した結果、77% が陽性であり、日本においてもこのウイルスがかなり以前から存在し、現在、広く、分布していることが解った。

MDV の AGP における抗原性について CHURCHILL ら^{3,4)} は、継代数の少いウイルスにおいては、主として、A, B, C, 3つの抗原性が認められ、継代を進めると、20 代目を経過する頃から抗原性の変化が起り、A 抗原は消失する。またそれに従い病原性は減弱したと報告している。前述の CHUBB & CHURCHILL の最初の報告では一本の沈降線を形成したという。私たちがこれまでに日本の異なる地区から分離した数種のウイルスで抗原を作ってみたが、野外の血清に対してはいず

れも共通な一本の沈降線が形成された。まだ抗原性の十分な解析は行なわれていないが、抗原の作り方、用いるウイルス、血清の側では免疫の仕方(感染の仕方)などによって反応性が異なってくるようである。

鶏群における AGP 抗体の消長を見てみると、種鶏は外界から完全に隔離され飼育されているわけではないから、ほとんどの種鶏が抗体を保有し表 2 のごとく、ふ化したひなは移行抗体を持っている。その抗体は、2 週目位まで検出され、その後消失するが、普通の飼育状態では、新たにウイルスの感染をうけ、抗体はふたたび陽転する。

初生時にウイルスを接種した鶏群と、接種せずに普通の鶏舎で飼育された鶏群の 2 群について、腎直接培養法によるウイルス分離と、AGP 抗体の動きを調べた結果を図 1 に示した。図 1-A は

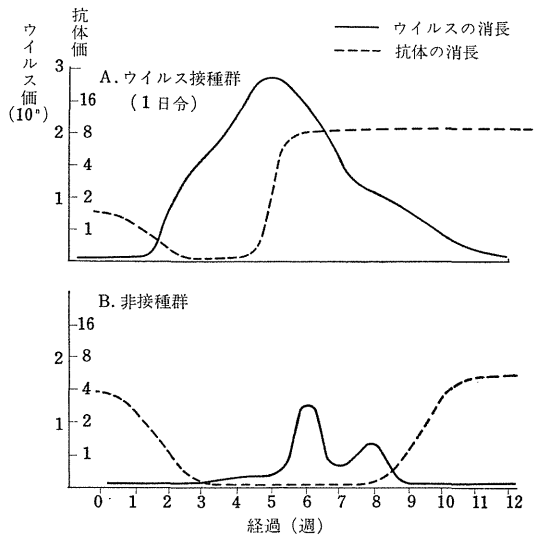


図 1. ウイルスの分離と抗体の消長

ウイルスを接種した鶏群であるが、移行抗体がまだ消失していないであろうと思われる 2 週目からウイルスは分離され、4~5 週でピークとなった。抗体もその時期から検出されるようになった。図 1-B は特に何の処置もしていない鶏群で、従来から MD の発生は認められていない鶏舎で、抗体陽性の親どりと一諸に飼育した。すべてのひなが移行抗体を保有しており、2 週目まで検出された。その後、3~7 週の間は陰性で経過したが、

8週目以降陽転し、そのまま続いた。ウイルスは4週目から分離された。ウイルス分離はウイルスを接種した群に比べ2~3週遅れ、抗体の上昇も3週遅れている。この鶏群では、丁度、移行抗体の消失した時期にウイルスの感染増殖が起きたと思われる。CHUBB & CHURCHILL⁵⁾によると、移行抗体を持つひなは、持たないひなに比べ、MDV接種後の死亡率に明らかな差があったと報告している。私たちが行なった図1-Aの例では、ウイルスを大量接種している関係もあるであろうが、移行抗体の影響は少なかったようであるが、図1-Bの例のように、自然の状態では、移行抗体がある程度感染を抑えているのかもしれない。なぜなら、この鶏舎はすでにMDVに汚染されていることは同居の鶏がみな抗体を有していることから明らかであるからである。ウイルスの毒力の差、ウイルス量なども関係しているのであろうが、このようにウイルスの感染が明らかな場合でも、発症しない場合があり、MD発症の機序の解決は今後の問題であろう。

以上MDV感染によって検出されるAGP抗体について簡単に述べた。次に私たちが行なっているMDVのAGPの術式について記しておく。私たちのところでは、抗原および血清の量が少なくてすむこと、一度に多数例を調べられることから、スライド法を主として利用している。

1) 抗原

鶏腎培養細胞にMDVを接種し、CPEが十分に広がったもの（ブラックが少い場合は、細胞をトリプシンではがし、新たな培養細胞に継代し、CPEが十分に広がったものが良い）の培養液を集め、濃縮する。濃縮する場合は、集めた培養液をセロハンチューブ（透析膜 Visking Company, 三光純薬）に入れ、その上にカーボワックス（ポリエチレングリコール 6000 又は 4000, 和光純薬）をふりかける。4°Cに置いておくと、水分が外に侵出し、濃縮される。用いた培養のCPEの程度にもよるが、1/10以上に濃縮する。3,000 r. p. m, 5分程度遠心し、上清を抗原とする。保存は-20°Cでよい。そのようにして作った抗原で反応が出ない場合は、さらに濃縮を高めなければならない。作った抗原は、2倍段階希釈をし、後述の術式で

陽性血清と反応させ、何倍まで反応するか、抗原の力価を調べる。はっきりとした沈降線が形成される希釈の2倍濃度程度の抗原を試験に用いればよい。又濃縮方法として硫酸による塩析法もよい。この場合、30%飽和で塩析を行ない沈殿を適当量のPBS（リン酸緩衝食塩液 pH 7.2）に浮遊したものを抗原とする。脱塩（透析により硫酸を除く）はしなくともよい。

いずれにしても、組織培養の手段を持たない場合は作ることができないので、可能な機関に分譲してもらわなければならないであろう。

MD感染鶏の羽のうにはAGPの抗原性があることが知られており、HAIDER⁹⁾らによると非常に高率に（特に下退部では100%）抗原性が証明されたと報告しているのので、発症鶏の皮膚（毛根を含む）の乳剤を抗原として利用することを試みるのも一つの方法と思う。

2) 寒天平板の作り方

リン酸緩衝液（pH 7.2）、（普通の蒸留水でもよい）に食塩8%、寒天（Bact. Agar, Difco）、1%を加え、煮沸融解し、1/10,000のマーゾニンを加える。少し温度が低くなってから、それをスライドグラス（一般に使用されている、26mm×76mmのもの）に4~5mlのせ凝固させる。（あらかじめ、スライドグラスの端に、絆創膏かテープを張り、番号を書けるようにしておくと便利）。固まってから、抗原と血清を入れる穴をあけるのであるが、あらかじめ、紙の上に必要とする穴の型を書いておき、その上に寒天を固ませたスライドグラスを置き穴をあける。穴をあけるのにはストローを用いるのが大きさも丁度よく便利である。紙型の上をストローで刺すと、丸く寒天が切れ、円の中には寒天が残るので、サッカーで吸って取り除く。（図2参照）。抗原を入れる穴と、血清を入れる穴との間隔は約5mmとする。図の様

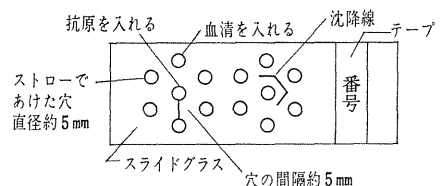


図2. AGP 反応用スライドグラス

に穴をあけたとすると、中心に抗原を入れ、まわりに血清を入れる。一枚のスライドグラスで12例の検査ができる。私たちのところで、粘土の中にストローを図のようになる様に等間隔でうめこみ、一度に7個の穴があげられるようにしたものを使っているが、簡単に作ることができるし、便利である。

3) 反応

抗原と血清をそれぞれの穴に入れる。穴が小さいので毛細ピペットを使う。スライドグラスは蓋のついた容器に入れる。下に何かを敷き、水を少し入れることができる様にする。蓋のない容器だとすぐ乾燥してしまう。室温、あるいは37°Cで反応させる。1日で沈降線は形成される。3日間観察すれば十分である。スライドグラスの下から光を当ててやると判定しやすい。時に、非特異的な反応が現れる場合がある。例数は少ないと思うが、常に対照(陽性血清、陰性血清、正常細胞培養液から前述と同様に作った正常抗原)をおくように心がけてほしい。

2. 蛍光抗体法 (FA)

FAは主として、MDVの抗原検出の手段として用いられる。すなわちMDV感染鶏の血清に蛍光色素をラベルした蛍光抗体により、感染鶏の臓器の抗原(クリオスタット切片標本など)の分布を追跡したり、組織培養で分離されたウイルスの抗原性の差を知ったりする。これにより最近、MDのワクチンウイルスとして用いられている七面鳥由来のヘルペスウイルス(HVT)と鶏由来のヘルペスウイルス(MDV)の抗原性の差が区別できるともいわれている。

PURCHASE⁷⁾、CALNEKら⁸⁾はMDV感染鶏の各臓器の抗原をFAにより調べたところ、主として羽のう、肺、Fのうなどに抗原性が認められた。(表4)中でも羽のうの抗原検出率が一番高い。羽のうはAGPの抗原性も陽性で、ウイルスの完全粒子が電顕で観察されることなど、MDの大きな感染源となる可能性を示している。

最近MDに対するワクチンの開発が進み、ワクチンウイルスと野外ウイルスとの区別も大切なこととなってきた。今のところはっきりと区別することは困難であるけれども、PURCHASE⁹⁾らに

表4. MDV感染鶏臓器における蛍光抗原の検出

検査材料	接種群	対照群
羽のう	19/29*	0/9
肺	12/53	0/20
Fのう	8/53	0/20
胸腺	7/50	0/19
脾	2/23	0/11
盲腸扁桃	1/19	0/9
神経	0/20	0/9
脳	0/7	0/2
生殖腺	0/19	0/9
肝	0/11	0/4
腎	0/11	0/4
膝	0/7	0/2
腺胃	0/7	0/2
全体の陽性数	23/59	0/21

*陽性数/検査数 PURCHASE.

表5. 蛍光抗体法によるMDV, HVTの交差反応(間接法による)。

	MD 抗原		HVT 抗原	
	細胞質	核	細胞質	核
標識抗体: MD	++	++	±	+
HVT	+	+	++	++

+ : 蛍光の強さの程度 PURCHASE.

よると、MDVとHVTはFAでホモ同志はヘテロの組合せに比べ強く反応すること。MDVに対する標識抗体ではHVTは細胞質の蛍光が陰性が弱いことを一つの示標としている(表5)。

いずれにしてもそれぞれのウイルスに対する純粋な特異的血清を得ることが大きな問題であろう。なを、FAの方法については文献¹⁰⁾を参考にしてほしい。

FAによる血清抗体の検出の方法として、蛍光抗体間接法がある。PURCHASE & BURGOYNE¹¹⁾によると、間接法による抗体の検出を行なったところ、AGPによるものと同様の結果であったが、FAの方が感受性は良かったと報告している。

参 考 文 献

- 1) CHURCHILL, A. E., BIGGS, P. M.; Nature 215, 528, 1967.
- 2) CHUBB, R. C., CHURCHILL, A. E.; Vet. Rec. 83, 4, 1968.
- 3) CHURCHILL, A. E., PAYNE, L. N., CHUBB, R. C.: Nature 221, 744, 1969.
- 4) CHURCHILL, A. E., CHUBB, R. C.: J. Gen. Virol.

- 4, 557, 1969.
- 5) CHUBB, R. C., CHURCHILL, A. E.: Vet. Rec. 85, 303, 1969.
- 6) HAIDER, S. H., LAPEN, R. F., KENZY, S. G.: Pout. Sci. 49, 1654, 1970.
- 7) PURCHASE, H. G.; Cancer Res. 30, 1898, 1970.
- 8) CALNEK, B. W., UBERTINI, T., ADLINDER, H.: J. Nat. Cancer Inst. 45, 341, 1970.
- 9) PURCHASE, H. G., WITTER, R. C., OKAZAKI, W., BURMESTER, B. R.: Perspective in Virology. VII, 91, 1971.
- 10) 広直, 増井, 尾藤: 鶏研会報 6, 168, 1970.
- 11) PURCHASE, H. G., BURGOYNE, G. H.: Amer. J. Vet. Res. 31, 117, 1970.

7. マレック病ゲル沈降反応における羽毛の利用性

HAIDER, S. A., LAPEN, R. F., & KENZY, S. G.

(Poultry Sci., 49, 1654, 1970)

マレック病の伝播, 病理において皮ふは重要な役割をはたしていることは毛のう上皮における封入体, 細胞フリーウイルス, 蛍光抗原の存在から明かで, これらはすべてマレック病感染の1つの過程を示すものである。そこで毛のう上皮にゲル沈降抗原が存在し, 診断に応用できるのではないと思われるので, その開発を試みた。

羽毛を抜きとり, 4~5本の毛根からピンセットで附着する皮ふ, 毛のう上皮を剥ぎとり, 材料とした。

羽域別に調べた結果は表1に示すように, 下腿域が最高で, 大腿, 胸, 腰域もかなり高率に検出された。(抄録

者註。病変陰性のヒナの羽域分布は示されていない)。

病変と検出の関連をみると, ウイルス接種例では肉眼病変のあったものはすべて抗原も検出されたが, 病変のなかったものでは79% (11/14)であった。接触感染させたもので病変のあったものでは54% (7/13), なかったものでは53% (9/17)であった。完全に隔離飼育したひなでは検出でなかった。

抗原が陽性になる時期は今後検討するが, 毛のう材料を用いてゲル沈降抗原の検出は診断に応用できそうである。(家衛試中国支場, 椿原彦吉抄)

表 1 羽域別ゲル沈降抗原検出率

接 種 日 令	ル ー ト	か ん さ つ 時 期	羽 数	羽 域 別 検 出 率					
				下 腿 (外側)	大 腿 (外側)	胸	腰	背	尾
2	ip	5 週後	14	100	93	86	86	43	29
2,9	ip, in	6 "	10	100	100	90	80	20	20
25	im	5 "	11	100	82	82	73	36	9
合 計			35	100	91	88	80	40	20

ひなはいずれも検査時剖検上肉眼病変陽性であったもの