

イバラキウイルスの研究

誌名	日本大學農獸醫學部學術研究報告
ISSN	00780839
著者	北林, 卓
巻/号	43号
掲載ページ	p. 185-187
発行年月	1986年3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



イバラキウイルスの研究 超音波処理による赤血球凝集抗原

北 林 卓*・斉 藤 健 哉*・門 井 克 幸*
大 森 常 良*

(昭和60年10月17日受理)

Studies on Ibaraki Disease Virus:

Preparation of Hemagglutinating Antigen by the Use
of Ultrasonic Treatment

Taku Kitabayashi*, Kenya Saitoh*, Katsuyuki Kadoi*
and Tsuneyoshi Omori*

In 1975, Halonen reported that HA reaction of rabies virus was found to be dependent on the pH as well as the sodium chloride molarity. Using a similar method, it was reported that epizootic hemorrhagic disease virus, bluetongue virus and african horse sickness virus which are all members of Reoviridae, are also able to make HA reactions. Recently, Tokuhisa et al. have reported that Ibaraki disease virus concentrated by ultrafiltration started from the infectious cell culture fluid showed HA reaction. On the other hand, we have also carried out HA test with Ibaraki disease virus which was the infectious cell culture fluid ultrasonicated. In our hands a usable HA antigen was easily prepared as compared with that by the ultrafiltration method.

イバラキウイルスはレオウイルス科のオルビウイルス属に分類されている。従来、レオウイルス科のウイルスには赤血球凝集 (HA) 性が認められないことから特異抗体の測定には、主に中和試験法が用いられていた。Schluederberg ら (1967)¹⁾ はパラミクソウイルス科の麻疹ウイルスについて従来のインフルエンザウイルスやニューカッスル病ウイルスとは異なる pH と食塩濃度依存性の HA 反応が可能であることを報告した。その後、彼らの開発した術式の応用によりそれまで HA 反応が不可能とされていた狂犬病ウイルス²⁾ をはじめ、伝染性鹿出血病ウイルス³⁾、ブルータングウイルス³⁾、アフリカ馬疫ウイルス⁴⁾ などについても HA 反応が可能になった。イバラキウイルスについても徳久ら (1983)⁵⁾ の報告があるが、それによれば抗原の濃縮と精製が必要であるとされている。今回筆者らは簡単な超音波処理抗原においても HA 反応が可能であることを認めたのでその成績を報告

する。

実験材料と方法

1) 供試ウイルス

供試ウイルスは1959年茨城県下の野外発生例から分離されたもので継代数が BEK 細胞で12代、次いで BK 細胞で13代のを農林水産省家畜衛生試験場の稲葉右二博士より分与され、本実験に使用した。

2) 培養細胞

種ウイルスおよび HA 抗原の作成にはハムスター胎仔肺由来の HmLu-1細胞を用いた。

細胞培養液は Eagle's MEM (ニッセイ) 80容に 2% TPB およびイバラキ病無抗体牛血清をそれぞれ10容含むものを増殖用液とし、Eagle's MEM 90容に 2% TPB を10容加えたものを維持液として使用した。これらの培養液にはペニンリン G カリウムおよび硫酸ジヒドロス

* 日本大学農獣医学部 獣医伝染病学研究室 (Lab. Epizootiol., Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ.)

トレプトマイシンをそれぞれ最終濃度 100u/ml および 100mcg/ml 添加した。細胞維持液はウイルスおよび血清の希釈液としても使用した。HmLu-1細胞の継代と単層細胞の作成は常法のごとくトリプシン・EDTA 混合液で分散した細胞を細胞増殖培地に $18-20 \times 10^4/ml$ に再浮遊させ、それを角型ガラス培養瓶 (80×40mm) には 10ml、チューブ (13×100mm) には 1ml ずつ分注し、37°Cで40-48時間静置培養したものを使用した。

3) 種ウイルスと HA 抗原

分与ウイルス株を HmLu-1 細胞で更に3代継代したものを種ウイルスとした。瓶培養の細胞を 10ml の維持液で軽く2回洗浄し種ウイルス液を 1ml 接種 (0.02 TCID₅₀/細胞) して1時間吸着させた後 5ml の維持液を加えて培養を続けると4日目に90%以上の細胞に著明な CPE が認められた。この時点で 2,000rpm 15分間の遠心操作を行いその上清を小バイアルに 2ml ずつ分注し -80°Cに保存した。この種ウイルスの感染価はチューブ法で 10^5 TCID₅₀/ml であった。

HA 抗原は種ウイルスの作製と同様に瓶培養の細胞にウイルスを増殖させ感染細胞の90%以上が変性し維持液中に浮遊した時に外部を氷水で冷却しながらガラス器具洗浄用超音波装置 (国際電気株式会社製 UT-30B型) で 26KHz, 20分間の超音波処理を行った。

その後 2,000rpm 15分間遠心し、その上清を HA 抗原とした。

4) 牛血球浮遊液

神奈川県下の食肉衛生検査所に搬入された健康牛から個体別に採血し Alsever 液加血液を作成した。Alsever 液加血液は 4°Cに保存したがその保存期間は7日間を限度とした。使用に際しこの血液をダルベッコの燐酸緩衝液で3回遠心洗浄しその血球沈渣を 0.6モル食塩加 0.2モル燐酸緩衝液 (pH7.5) (以下 SPBS と略す) に 0.5% に浮遊させて使用した。各実験に先立ち各牛個体の血球浮遊液について HA 試験を行い、最も高い HA 価を示した血球浮遊液を本実験に用いたがその価は通常 32-64 倍であった。

5) 可検血清とその処理

6組の牛ベアー血清は農林水産省動物医薬品検査所において、行われたイバラキ病の生ワクチンの検定の際に各試験牛から感染前および感染後3週間目にそれぞれ採取し、同所佐々木英治技官より分与されたものである。

可検血清には 56°C, 30分間の非動化処理を施したが、HI 抗体の測定には更にカオリン処理も行った。すなわち、非動化血清の一部を SPBS で5倍に希釈し、その1容に SPBS で作成した 25% カオリン (Fisher Scientific Company, U.S.A. K-5) 液を等量加え混和した後室温

に30分間放置した。次いで 2,500rpm 15分間遠心し、その上清を HI 試験用血清とした。これらの血清はこの時点で10倍希釈されたことになる。

6) HA および HI 試験

HA および HI 試験はマイクロタイタープレート (Cooke Engineering Co., U.S.A. Type U) を用いて行った。HA および HI 試験の抗原および可検血清の希釈には SPBS を用いた。HA 試験の術式は以下のごとくである。プレートの横列10管に 0.025ml 容の抗原 2倍階段希釈を作る。その各管にさらに SPBS を 0.025ml ずつ加えて各管の内容を 0.05ml とし、そこに 0.5% 牛血球浮遊液を 0.025ml ずつ加えて混和する。HA 像の判定はプレートを室温に一夜放置した後に行った。HI 試験では HA 試験と類似の方法で可検血清の 2倍階段希釈を作りその各管に8単位の抗原を加えて混和し室温に一夜放置する、次いで牛血球浮遊液を加え室温に4時間放置した後の反応像を観察した。

7) 中和試験

中和試験はチューブ法で行った。チューブに非動化した可検血清の4倍階段希釈を作り、その各管に 0.2ml あたり 200TCID₅₀ の感染価を含むウイルス液を等量加え混和し、室温に1時間放置する。次いでその内容物を HmLu-1細胞のチューブ培養に 0.2ml ずつ接種した。使用したチューブ数は各血清希釈あたり2本とした。細胞維持液と等量のウイルス液とを混和したウイルス対照は接種直前に10倍階段希釈を4管作りそれぞれ2本のチューブ培養に接種し 37°Cに7日間保持したがその間倒立顕微鏡下に CPE の有無を観察した。中和抗体価の判定はウイルス対照が 100TCID₅₀ を示した時点で各可検血清の CPE 抑制最高希釈数を逆数で示した。

実験結果

1) 抗原作成

HmLu-1細胞にイバラキウイルスを感染させ、ほぼ90%以上の細胞が CPE を起こした時点で細胞を集め、超音波処理を 0-120分間にわたって実施した。その結果、Table 1に示すように処理前は全く HA 性を示さなかったが、10分で HA 能をみとめ (1:8), 20分で最高 (1:16) となり、以後45分では低下がみとめられはじめた。細胞塊と培養上清、細胞塊と細胞維持液の混和物の間には HA 能の差はみとめられなかった。以後超音波処理は20分間実施し、抗原を作成した。

2) HI 抗体の特異性

上記の HA 抗原を使用した HI 抗体の特異性を確認するためにイバラキウイルスを実験的に牛に接種して陽転させた対血清 (Paired Sera) について、HI 抗体と中和

Table 1 The effect of times of ultrasonification on HA titers

	Times of ultrasonification (min.)								
	0	10	20	30	45	60	75	90	120
A	<2	3	16	16	8	8	4	4	4
B	<2	4	16	16	8	8	4	4	4
C	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2

A : cell pellet+supernatant

B : cell pellet+maintenance medium

C : supernatant

• 0.5% bovine RBC

• diluent (pH 7.5, NaCl concentration 0.6M)

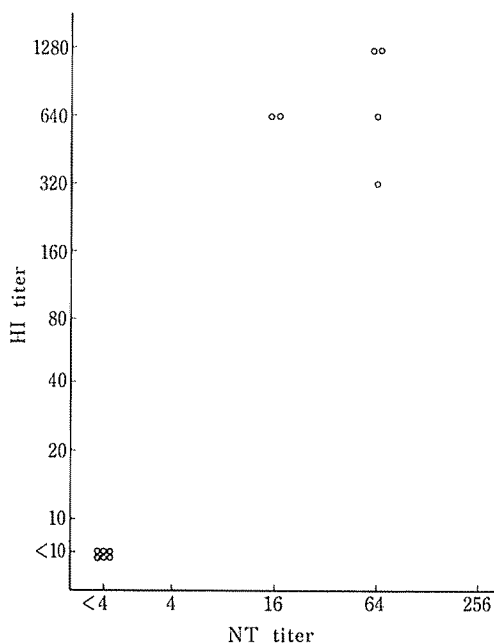


Fig. 1 Correlation between HI and NT titers of paired sera. (NT: neutralization test)

抗体を測定した。その結果, Fig. 1 に示すように, HI 抗体は接種前はすべて10倍以下を示したが, 後血清では320—1,280 倍を示し陽転した。なお同時に実施した中和抗体は前血清ではすべて4倍以下であったが, 後血清では16~64倍と力価は低いもののすべて2管以上の上昇がみとめられた。HI, 中和両抗体の間には有意の相関関係 ($r=0.758, p<0.01$) がみとめられた。

考 察

徳久ら⁵⁾も報告しているごとくイバラキ病ウイルスのHA 反応では, 通常のウイルス培養上清をHA 抗原としてそのまま使用することはできなかった。それゆえ, 彼らは限外濾過法によって抗原液を100—150倍に濃縮し, 最高HA 価として256 倍の値を得ている。今回の筆者ら

の実験では極端な抗原濃縮操作を施さずとも簡単な超音波処理を加えただけの抗原でも使用に耐えるHA 価が得られた。光学顕微鏡下に観察した範囲でも超音波処理により変性細胞がより微細に破壊されていることが解るが, その処理にも一定の有効範囲のあることが予備実験で認められており, それぞれの実験系に応じて超音波処理の度合を加減する必要があると思われた。またHI 試験法は中和試験法より短時間で判定できることから有利であり, イバラキ病の迅速診断のためにはHI 試験法の一層の改良が望まれる。食塩濃度とHA 性との関係およびその作用機序についてはほとんど解明されていない。しかしHI 反応が特異的であることは本実験の成績からも間違いないものと思われた。

要 約

イバラキ病の簡単かつ迅速な診断方法としてHI 抗体の検出があるが, HA 抗原の簡便な作成法の検討を試み以下の成績が得られた。

1. 抗原作成のための培養細胞としてHmLu-1 細胞を適期に集め, 超音波処理を加えることにより, 簡便に使用に耐える抗原が得られた。
2. 上記抗原を用いてHI 抗体が検出でき, 中和抗体との対比から特異性がみとめられた。

謝 辞

本実験に際し, 供試ウイルスおよびベア—血清を分与していただいた, 稲葉右二博士ならびに佐々木英治技官に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) P. Halonen 1975: Hemagglutinin of rabies virus. In G. Baer edition, The natural history of rabies. Vol. 1. 103~113. Academic Press Inc., New York.
- 2) S. Tokuhisa, Y. Inaba, Y. Miura, K. Sato, H. Akashi, T. Tsuda and I. Shibata 1981: Hemagglutination of epizootic hemorrhagic disease virus. *Arch. Virol.*, 69, 291~294.
- 3) S. Tokuhisa, Y. Inaba, Y. Miura and K. Sato 1981: Salt-dependent Hemagglutination with bluetongue virus. *Arch. Virol.*, 70, 75~78.
- 4) S. Tokuhisa, Y. Inaba and K. Sato 1982: Factors associated with improved hemagglutination by African horse sickness virus. *Vet. Microbiol.*, 7, 177~181.
- 5) S. Tokuhisa, Y. Inaba, Y. Miura, K. Sato and M. Matsumoto 1983: Salt-dependent hemagglutination with Ibaraki virus and its inhibition by specific antisera. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 45(1), 15~21.
- 6) A. Schluenderberg and M. Nakamura 1967: Salt dependent hemagglutination particle from Measles-infected cells. *Virol.*, 33, 297~306.