

オーエスキー病ウイルス抗体に対する各種検出法の比較

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	佐藤, 邦彦 三浦, 康男 徳久, 修一
巻/号	44巻12号
掲載ページ	p. 1172-1175
発行年月	1991年12月

オーエスキュー病ウイルス抗体に対する各種検出法の比較

佐藤邦彦¹⁾ 三浦康男¹⁾ 徳久修一¹⁾ 服部孝二²⁾

宮村和典³⁾ 田島和彦⁴⁾

- 1) 農林水産省家畜衛生試験場 (つくば市観音台 3-1-1, 〒 305)
- 2) 大阪府中部家畜保健衛生所 (藤井寺市津堂 2-8-9, 〒 583)
- 3) 高知県家畜病性鑑定所 (吾川郡伊野町大領西 1879-1, 〒 781-21)
- 4) 栃木県宇都宮家畜保健衛生所 (宇都宮市若草 2-3-39, 〒 320)

(平成 3 年 2 月 26 日受付・平成 3 年 7 月 19 日受理)

Comparative Evaluation of Various Methods for Detecting Antibody to Aujeszky's Disease Virus in Swine

KUNIHICO SATO*, YASUO MIURA, SHUICHI TOKUHISA, KOUJI HATTORI, KAZUNORI MIYAMURA and KAZUHIKO TAZIMA (* National Institute of Animal Health, Tsukuba-shi, Ibaraki 305)

SUMMARY

A total of 924 serum samples from swine in 1990 were examined by indirect immunoperoxidase plaque staining (IIPS) test, complement-dependent neutralization test (CNT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and latex agglutination (LA) tests. Agreement among these methods for the detection of positive and negative sera was expressed as percentage of the total number of sera examined. Detection of the antibody by IIPS was compared with that by CNT, LA and ELISA. IIPS and CNT showed 99.6% agreement. IIPS and ELISA or LA indicated 93.7% and 93.3% agreement, respectively. Agreement of ELISA with the other methods ranged from 93.6% to 95.3%.

Detection of the antibody by LA was compared with that of CNT, IIPS and ELISA. Agreement of LA with CNT, IIPS and ELISA was 93.1%, 93.3% and 95.3%, respectively.

Definite results were obtained by CNT and IIPS, while the results for 12 and 35 of the 924 serum samples were ambiguous for ELISA and LA, respectively. Based on the present data, IIPS and CNT may be concluded to be the most reliable methods for conducting serodiagnosis of Aujeszky's disease in swine.

—**Key Words**: swine, aujeszky's disease virus, antibody-detection methods.

-----*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 44, 1172~1175 (1991)

要 約

1990年に採取された924例の野外豚血清を用い、間接免疫酵素抗体ブラック染色(IIPS法)、補体要求性中和試験(CNT法)、ELISAおよびLatex凝集試験(LA法)による抗体検出率を比較した。IIPS法とCNT法による抗体検出率はほぼ一致し、その一致率は99.6%であった。ELISAおよびLA法との一致率は93.7%および93.3%であった。ELISAと他の試験法との比較では、CNT法は93.6%、IIPS法は93.7%、LA法は95.3%の一致率であった。LA法と他の試験法との比較では、CNT法は93.1%、IIPS法は93.3%、ELISAは95.3%の一致率であった。IIPS法およびCNT法では抗体疑陽性例はなかったが、ELISAでは12例、LA法では35例あった。

以上の成績から、ADウイルス感染豚の摘発に用いる血清学的診断法として、IIPS法とCNT法は極めて有用と考えられた。——**キーワード**: 豚, オーエスキュー病ウイルス, 血清診断法。

オーエスキュー病(AD)はヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科に属する豚ヘルペスウイルス1^{2,5)}の感染によって起こる疾病である。わが国におけるADは1981年山形県で初めて発生して以来各地で発生し、その被害は莫大な額に達している。このウイルスの血清学的診断には中和試験(NT法)⁶⁾の他、補体要求

性中和試験(CNT法)^{1,8)}、酵素免疫測定法(ELISA)^{3,4,6~10)}、間接免疫酵素抗体ブラック染色法(IIPS法)⁸⁾およびラテックス凝集試験(LA法)⁹⁾が知られている。わが国ではADウイルスの血清学的診断法としてNT法、ELISAおよびLA法が行われ、ADウイルス感染豚の摘発に用いられている。今回、ADの汚染地域、初発生

地域および未発生地域の豚血清について、CNT 法、IIPS 法、ELISA および LA 法を行い AD ウイルスの抗体検査を行い、検出率の比較検討を行った。

材料および方法

ウイルス

Purdue 大学 (Indiana, U. S. A.) の Dr. D. P. GUSTAFSON から分与された豚ヘルペスウイルス 1 型インデアナ S 株を用いた。HmLu-1 細胞 (ハムスター肺由来細胞) で 3 代継代したウイルスを IIPS 法と CNT 法に用いた。

細胞培養

HmLu-1 細胞の増殖培養液 (GM) は Eagle の minimum essential medium (MEM) に 10% Tryptose phosphate broth (T. P. B.) (Difco), 10% 子牛血清, 抗生物質 (100 u/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン, 1 μ g/ml ファンギゾン) を加え, 炭酸水素ナトリウムで pH 7.2 に調整して用いた。IIPS 法には HmLu-1 細胞を 4×10^5 個/ml になるように GM に浮遊し, 平底 24 ウェルのプラスチックプレート (Coostor) の各ウェルに 1 ml ずつ分注し, 5% 炭酸ガス孵卵器で 37°C 5 日間静置培養して用いた。CNT 法には HmLu-1 細胞を 3×10^5 個/ml になるように GM に浮遊し試験管 (11 \times 100 mm) に 0.5 ml ずつ分注し, 37°C 5 日間静置培養して用いた。

野外血清

AD の汚染地域, 初発生地域および未発生地域より採取された 924 例をそれぞれ 56°C 30 分間加熱非動化して試験に用いた。

IIPS 法

SATO ら⁸⁾の方法に従って行った。すなわち、HmLu-1 細胞の単層が形成されたプレート (24 ウェル) の各ウェルにウイルス液 (100 PFU/0.1 ml) を 0.1 ml 接種し, 37°C 1 時間吸着した後, 0.8% メチルセルロース液を 1 ml 加え 37°C 36 時間培養した。メチルセルロース液を除き氷水中で冷却した PBS (リン酸緩衝食塩液) で 1 回洗浄後, -20°C 冷メチルアルコールで 10 分間固定した後メチルアルコールを除き乾燥した。被検血清は希釈液 (5% 牛血清加 2% 塩化ナトリウム液) で 100 倍に希釈し, その 0.2 ml を上記乾燥プレートに加え室温 30 分間静置した。次いで 1 ml の洗浄液 (2% 塩化ナトリウム液) で 3 回洗浄し, 4 回目は洗浄液をウェルに満し 10 分間静置後洗浄液を除いた。全ウェルに上記希釈液で 100 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗豚血清免疫ウサギ血清 IgG (IgG; Cooper Bio-medical) を加え室温暗所に 30 分間静置し前述と同様の洗浄を行った。次いで 0.02% 3,3'-ジアミノベンチジン (pH 7.6, 0.05 M トリス-塩酸緩衝液加 0.01% H₂O₂) 液を 0.5 ml

ずつ加え室温暗所に 20 分間静置後, 水道水で洗浄した。判定は染色されたブラックの有無を肉眼で観察し, ブラックの確認されたものを抗体陽性とした。

CNT 法

SATO ら⁸⁾の方法に従って行った。すなわち、被検血清 0.2 ml を維持培養液 (MM) (MEM に 10% TPB, 0.05% イーストエキストラクト, 0.5% グルタミン酸ナトリウム, 0.1% ブドウ糖および上記抗生物質を加え炭酸水素ナトリウムで pH 7.2 に調整したもの) で 2 倍階段希釈し, 各希釈当たりウイルス液 (400 TCID₅₀/0.1 ml) を 0.1 ml ずつ加え攪拌した後 4°C 48 時間静置した。次いでモルモット補体 (東芝化学社製) 16 溶血単位を 0.1 ml ずつ加え 37°C 1 時間反応させた後, 各混合物を 0.1 ml ずつ 2 本の細胞培養試験管に接種した。37°C 1 時間吸着した後 MM を 0.5 ml ずつ加え 37°C で回転培養を行った。4 日後に 2 本の試験管中少なくとも 1 本で細胞変性が阻止された最高血清希釈の逆数を中和抗体価とし, 1 倍以上を抗体陽性とした。

ELISA

AD 診断用酵素抗体反応抗原 (日生研イムノサーチ) を用い, 添付の使用法に従って行った。すなわち, プレート洗浄液で 3 回洗浄したプレートに血清希釈液で 10 倍希釈した被検血清を 50 μ l ずつ 3 ウェルに加えて, 37°C 1 時間反応させた後プレート洗浄液で 4 回洗浄した。リン酸緩衝食塩液 (PBS) で 15 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識プロテイン A を各ウェル当たり 25 μ l ずつ加え, 37°C 20 分間反応させた後プレート洗浄液で 4 回洗浄した。所定の発色剤混合液を調製し, 全ウェルに 50 μ l ずつ加え遮光し室温 30 分間反応させた後, 反応停止液を全ウェルに 50 μ l ずつ加えた。405 nm と 492 nm の 2 波長で吸光度の測定を行い E (ELISA) 値を算出し, 全ウェルが 0.4 以上の血清を抗体陽性とした。3 ウェル中 1~2 ウェルが 0.4 以下を凝陽性とした。なお, 3 ウェルすべてが 0.4 以下を抗体陰性とした。

LA 法

AD ウイルス抗体検査用キット (AD 抗原ラテックス) (日ワク製) を用い, 添付の使用法に従って行った。すなわち, 被検血清を添付希釈液で 4 倍と 40 倍に希釈し, その 50 μ l ずつをガラス板上の径 1.4 cm のウェル内に上げ抗原液 1 滴と混合し 8 分間振盪し, 凝集の有無を肉眼で観察した。40 倍希釈血清で凝集像を示したものを抗体陽性とし, 4 倍希釈血清で凝集し 40 倍希釈血清で凝集しなかったものを凝陽性とした。なお, 4 倍希釈血清で凝集しないものを抗体陰性とした。

成績

IIPS 法と各種試験法による抗体検出の比較

野外豚血清 924 例について各種試験を行いその成績を

比較した。IIPS法とCNT法との比較では、IIPS法による抗体陽性は361例、抗体陰性は563例であった。いっぽう、CNT法で抗体陽性を示したものはIIPS法で抗体陽性を示した361例中360例、抗体陰性を示した563例中3例であった。いっぽう、CNT法で抗体陰性を示したものはIIPS法で抗体陰性を示した563例中560例、抗体陽性を示した361例中1例であった。両法の一一致率は99.6%であった。

IIPS法とELISAとの比較では、ELISAで抗体陽性を示したものはIIPS法で抗体陽性を示した361例中338例、抗体陰性を示した563例中29例であった。また、ELISAで抗体疑陽性を示したものはIIPS法で抗体陽性を示した361例中6例、抗体陰性を示した563例中6例であった。いっぽう、ELISAで抗体陰性を示したものはIIPS法で抗体陰性を示した563例中528例、抗体陽性を示した361例中17例であった。両法の一一致率は93.7%であった。

IIPS法とLA法との比較では、LA法で抗体陽性を示したものはIIPS法で抗体陽性を示した361例中341例、抗体陰性を示した563例中18例であった。また、LA法で抗体疑陽性を示したものはIIPS法で抗体陽性を示した361例中10例、抗体陰性を示した563例中25例であった。いっぽう、LA法で抗体陰性を示したものはIIPS法で抗体陰性を示した563例中520例、IIPS法で抗体陽性を示した361例中10例であった。両法の一一致率は93.3%であった(表1)。

ELISAと各種試験法による抗体検出の比較

ELISAとCNT法との比較では、ELISAによる抗体陽性は367例、抗体疑陽性は12例、抗体陰性は545例であった。しかし、CNT法で抗体陽性を示したものはELISAで抗体陽性を示した367例中338例、抗体疑陽性を示した12例中7例、抗体陰性を示した545例中18例であった。いっぽう、CNT法で抗体陰性を示したものはELISAで抗体陰性を示した545例中527例、抗体疑陽性を示した12例中5例、抗体陽性を示した367例中29例であった。両法の一一致率は93.6%であった。

表1 IIPS法と各種試験法による野外豚血清の抗体検出の比較

各種試験法	IIPS法		一一致率(%)
	陽性(361)*	陰性(563)	
CNT法	陽性	360	99.6
	陰性	3	
ELISA	陽性	338	93.7
	疑陽性	6	
LA法	陽性	341	93.3
	疑陽性	10	
	陰性	528	
	陰性	520	

* ()は例数

表2 ELISAと各種試験法による野外豚血清の抗体検出の比較

各種試験法	ELISA			一一致率(%)
	陽性(367)*	疑陽性(12)	陰性(545)	
CNT法	陽性	338	7	93.6
	陰性	29	527	
IIPS法	陽性	338	6	93.7
	陰性	29	528	
LA法	陽性	354	0	95.3
	疑陽性	13	6	
	陰性	10	521	

* ()は例数

ELISAとIIPS法との比較では、IIPS法で抗体陽性を示したものはELISAで抗体陽性を示した367例中338例、抗体疑陽性を示した12例中6例、抗体陰性を示した545例中17例であった。いっぽう、IIPS法で抗体陰性を示したものはELISAで抗体陰性を示した545例中528例、抗体疑陽性を示した12例中6例、抗体陽性を示した367例中29例であった。両法の一一致率は93.7%であった。

ELISAとLA法との比較では、LA法で抗体陽性を示したものはELISAで抗体陽性を示した367例中354例、抗体陰性を示した545例中4例であった。LA法で抗体疑陽性を示したものはELISAで抗体陽性を示した367例中13例、抗体疑陽性を示した12例中6例、抗体陰性を示した545例中16例であった。LA法で抗体陰性を示したものはELISAで抗体陰性を示した545例中521例、抗体陽性を示した367例中10例であった。両法の一一致率は95.3%であった(表2)。

LA法と各種試験法による抗体検出の比較

LA法による抗体陽性は359例、抗体疑陽性は35例、抗体陰性は530例であった。CNT法で抗体陽性を示したものはLA法で抗体陽性を示した359例中341例、抗体疑陽性を示した35例中10例、抗体陰性を示した530例中11例であった。いっぽう、CNT法で抗体陰性を示したものはLA法で抗体陰性を示した530例中519例、抗体疑陽性を示した35例中25例、抗体陽性を示した359例中18例であった。両法の一一致率は93.1%であった。

LA法とIIPS法との比較では、IIPS法で抗体陽性を示したものはLA法で抗体陽性を示した359例中341例、抗体疑陽性を示した35例中10例、抗体陰性を示した530例中9例であった。IIPS法で抗体陰性を示したものはLA法で抗体陰性を示した530例中521例、抗体疑陽性を示した35例中25例、抗体陽性を示した359例中18例であった。両法の一一致率は93.3%であった。

LA法とELISAとの比較では、ELISAで抗体陽性を示したものはLA法で抗体陽性を示した359例中354例、

表3 LA法と各種試験法による野豚血清の抗体検出の比較

各種試験法	LA法			一致率(%)
	陽性 (359)*	疑陽性 (35)	陰性 (530)	
CNT法	陽性	341	10	93.1
	陰性	18	519	
IIPS法	陽性	341	10	93.3
	陰性	18	521	
ELISA	陽性	354	13	95.3
	疑陽性	0	6	
	陰性	8	521	

* ()は例数

抗体疑陽性を示した35例中13例, 抗体陰性を示した530例中6例であった。ELISAで抗体疑陽性を示したものはLA法で疑陽性を示した35例中6例であった。いっぽう, ELISAで抗体陰性を示したものはLA法で抗体陰性を示した530例中521例, 抗体疑陽性を示した35例中16例, 抗体陽性を示した359例中8例であった。両法の一一致率は95.3%であった(表3)。

考 察

野豚血清のADウイルスに対する抗体検出率を各種試験法により比較したところ, IIPS法はCNT法と同様に高い抗体検出率を示し, かつ両法の一一致率は99.6%とほぼ一致した判定成績が得られた。次いでELISAとは93.7%, LA法とは93.3%の一一致率であった。このような成績はSATOら⁹⁾の報告とほぼ一致した。

しかし, ELISAではIIPS法で抗体陽性であった17例が抗体陰性を示し, IIPS法で抗体陰性であった29例が抗体陽性を示した。また, LA法ではIIPS法で抗体陽性であった10例が抗体陰性を示し, IIPS法で抗体陰性であった18例が抗体陽性を示した。抗体疑陽性例はIIPS法, CNT法ではなかった。また, ELISAによる抗体疑陽性例とLA法による抗体疑陽性例はかならずしも一致するものではないことが示された。このような判定成績は, 診断が困難となるだけでなく, ADウイルス感染豚を見逃すこととなる。いっぽう, ADウイルス非感染豚を淘汰することにもなる。ELISAと他の試験法との比較およびLA法と他の試験法との比較では, ELISAとLA法との一致率は95.3%を示した。しかし, 他の試験法との一致率はやや低下していた。以上の成績

から, ELISAおよびLA法はNT法による陽性限界を基準に考えられたため, NT法と同様に抗体検出率が低く示されたものと考えられた。

いっぽう, CNT法は補体を加え長時間感作することにより初期抗体(IgM), 補体要求性中和抗体^{1,8,11)}および遅作用補体要求性中和抗体^{8,12)}を検出することにより抗体検出感度と特異性を高められたものと考えられた。しかし, 本法は判定に時間と複雑な操作を必要とするため迅速性を必要とするADの診断には不適である。いっぽう, IIPSはCNT法とその成績がよく一致し, またLA法ほどの迅速性と簡便性はないものの抗体検出感度および特異性が高く, CNT法に代るADウイルス感染豚の摘発方法と思われる。しかし, 固相化プレートの作製に熟練を必要とする欠点がある。ELISAおよびLA法は迅速性および簡便性にすぐれているが精度および特異性に問題があるため, これらの改良が必要であろう。

稿を終えるにあたり, ご協力いただきました各県各位ならびに農林水産省家畜衛生試験場の窪道護夫博士, 平沼亨博士に深謝いたします。

引用文献

- 1) BITRCH V. and ESKIDSEN M.: *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 17, 41~49 (1982).
- 2) BROWN F.: *Intervirology.* 30, 181~186 (1989).
- 3) BRIAIRE J., MELOEN R. H. and BARTELING J. S.: *Zentralbl. Vet. Med. B* 26, 76~81 (1979).
- 4) FORSCHNER E., DOPATKA H. D., BUENGEN I., et al.: *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 88, 134~139 (1981).
- 5) MATTHEWS R. E. F.: *Intervirology.* 17, 1~200 (1982).
- 6) MOENNING V., WOLDESENBET P., FREY H. R., et al.: *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 17, 51~56 (1982).
- 7) MOUTOU F., TOMA G. and FORTIER B.: *Vet. Rec.* 103, 264 (1978).
- 8) SATO K., TANAKA Y., KUROGI H., et al.: *J. Clin. Microbiol.* 26-1, 79~81 (1988).
- 9) 柴田 勲, 深見 直, 神 馨, ほか: 日獣会誌 43, 111~114 (1990).
- 10) TOMA B.: *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 17, 65~74 (1982).
- 11) YOSHINO K. and TANIGUCHI S.: *Virology.* 22, 193~201 (1964).
- 12) YOSHINO K. and ISONO N.: *Microbiol. Immunol.* 22, 403~414 (1978).