

14. 「パッシブな」ウイルス分離法の検討

大分家畜保健衛生所

病鑑 ○長岡 健朗 病鑑 壁村 光恵

病鑑 内田 雅春

【はじめに】

近年、ウイルス病診断ではPCR法の重要度が増して来ており、病性鑑定マニュアルでも版を重ねる毎にPCR法で診断可能な疾病が増えている。PCR法で診断可能な疾病数は、牛ウイルス病では、第2版では4疾病だったものが、第3版では10疾病となり、近々出版予定の第4版ではこれがさらに増えるものと思われる(表1)。そのため、日常の検査業務の比重も遺伝子検査にシフトしてきており、ウイルス分離にかかる業務量は減少する傾向にある。

一方、病性鑑定マニュアルに記載されているウイルス分離法は目的ウイルスに特化しており、使用細胞や培養温度もまちまちで、培養法も回転培養といった労力を要するものが多く(表2)、これらの方法で可能性のあるウイルスをすべてカバーするようにウイルス分離することには限界がある。

しかし、ウイルス分離は(a)新種や変異株等、PCR法で診断できないようなウイルスの診断や(b)PCR法等で診断がついた症例でも、そのウイルスの抗原性や病原性等ウイルス性状の確認、の必要性から、決して重要度が減少しているわけではない。すでに診断がついたウイルスについては(b)の目的で、そのウイルスを積極的に分離するため、病性鑑定マニュアルに準拠した方法での「アクティブなウイルス分離」を、(a)の目的には広い種類のウイルスをカバーするような方法での「パッシブなウイルス分離」を使い分ける必要があると思われる。

今回、パッシブなウイルス分離法を検討し、病性鑑定でも応用したので報告する。

		第2版	第3版	第4版(未定)
1	ブルータンク	+	+	+
2	アカバネ	-	+	+
3	悪性カタル熱	+	+	+
4	チュウザン	-	-	+
5	BVD	+	+	+
6	IBR	-	+	+
7	BLV	-	-	-
8	アイノ	-	-	-
9	イバラキ	+	+	+
10	丘疹性口炎	-	+	+
11	BEF	-	-	+
12	RS	-	+	+
13	アデノ	-	-	+
14	コロナ	-	+	+
15	PI	-	+	+
16	ライノ	-	-	-
17	ロタ	-	-	+
比率		4/17	10/17	14/17

	細胞	培養法
ブルータンク	BHK, HL	37℃ 回転
アカバネ	BHK, HL	34℃ 回転
チュウザン	BHK, HL	37℃ 回転
BVD	BK, BT, MDBK	37℃
IBR	BK, BT, BFM	37℃または34℃ 回転
アイノ	BHK, HL	34℃ 回転
イバラキ	BHK, HL	37℃ 回転
丘疹性口炎	BT	37℃静置
BEF	BHK, HL, Vero	34℃ 回転
RS	BK, BT, Vero, ESK	34℃ 回転
アデノ	BK, MDBK(1, 2, 3, 型), BT(4, 5, 6, 7型)	37℃または34℃ 回転
コロナ	HRT	37℃ 回転
PI	BK, MDBK, Vero	37℃または34℃ 回転
ライノ	BK, MDBK	33℃ 回転
ロタ	MA104	37℃ 回転(トリプシン)

【材料および方法】

1. ウイルス分離

(1) 検査材料

①平成24年度の牛流行熱抗体検査

平成24年度の牛流行熱抗体検査の第Ⅱ期およびⅢ期に採材されたヘパリン血由来の血清および血球各81検体を用いた。

②呼吸器病病性鑑定例

2013年1月以降に病性鑑定依頼があった牛呼吸器病の5症例由来の鼻孔スワブ計34検体、全血計30検体についてパッシブなウイルス分離法でのウイルス分離を行った。PCR法等で診断がついた場合は、併せてアクティブなウイルス分離も行った。

(2) ウイルス分離方法

なるべく幅広いウイルスが分離できるように、6種の細胞を用いることにした。細胞の種類を増やしても、要する労力が増えないように、プレートは96穴のものを用いることとし、ウイルス接種や継代の操作も、図1に示したようになるべく簡易なものとした。使用する細胞については、今後もウイルス分離成績を評価し、より成績の良い細胞に入れ替える予定であるが、①平成24年度の牛流行熱抗体検査検体での検討ではBHK細胞、HmLu細胞、MDBK細胞、BFM細胞、BAT細胞、BK細胞を、②呼吸器病病性鑑定例ではHmLu細胞、MDBK細胞、Vero細胞、HRT細胞、BFM細胞、BAT細胞を用いた。培養はすべて37℃静置で行い、5～7日間観察し、2～3代継代を行った。これら検体はさらに1代継代し、接種2～3日後のプレートを80%アセトン液で固定、①平成24年度の牛流行熱抗体検査検体での検討では第Ⅱ期およびⅢ期の検体についてはそれぞれ第Ⅲ期およびⅣ期の血清を、②呼吸器病病性鑑定例の検体では、それぞれの個体の後血清を一次抗体として間接蛍光抗体法（IFA）を実施した。



2. 蛍光抗体法二次抗体の検討

従来使用していたVMRD社の二次抗体は原液使用に調製されているため希釈ができず、ルーチンの検査ですべての検体についてIFAを行うことはコスト的に現実的でないので自作の抗ウシIgGニワトリ標識抗体および他ブランド(abcam社)の抗ウシIgG標識抗体の検討を行った。96穴プレートで細胞をシートさせた後既知の各ウイルスを接種、2日後に固定してそれぞれのウイルスに対する抗体を保有している血清を一次血清としてIFAを行った。検討にはウイルス(細胞)はBHV-1(MDBK細胞)、PI-3(MDBK細胞)、BRSV(Vero細胞)、BCV(HRT細胞)、AD-7(MDBK細胞)、BVDV(BFM細胞)を使用した。

【結果】

1. ウイルス分離

①平成24年度の牛流行熱抗体検査

第Ⅲ期の血球 1 例からBK細胞 3 代目でBVDウイルスが分離された。他の検体からはウイルスは分離されなかった（表 3）。蛍光抗体法でウイルスが摘発された例はなかった。

表3 流行熱事業抗体調査検体でのウイルス分離成績

材料	世代数	BHK	HmLu	MDBK	BFM	BAT	BK
第Ⅱ期	血球 (81検体)	1代	-	-	-	-	-
		2代	-	-	-	-	-
		3代	-	-	-	-	-
	血漿 (81検体)	1代	-	-	-	-	-
		2代	-	-	-	-	-
		3代	-	-	-	-	-
第Ⅲ期	血球 (81検体)	1代	-	-	-	-	-
		2代	-	-	-	-	-
		3代	-	-	-	-	BVDV
	血漿 (81検体)	1代	-	-	-	-	n/a
		2代	-	-	-	-	-
		3代	-	-	-	-	-
IFA	-	-	-	-	-	-	

n/a: NotApplicable

②呼吸器病性病性鑑定例

病性鑑定例では、5 症例のうち 1 症例でパッシブなウイルス分離法でウイルス分離が分離された（表 4）。この症例では鼻腔スワブ14検体中 2 検体で、BFM細胞でBHV-4ウイルスとBVDウイルスが分離され、そのうち 1 検体ではさらにBAT細胞で、BHV-4ウイルスが分離された。この症例では、鼻腔スワブ14検体中 4 検体でPCR法でBHV-1の特異遺伝子が検出されており、また抗体検査でもAD-7に対するIgM抗体が検出されており、多重のウイルス感染を受け、BRDCの状態になっていたものと思われる（表 5）。

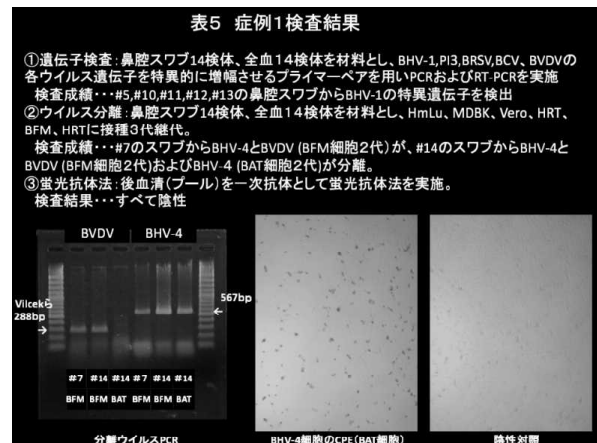
すべての症例で蛍光抗体法でウイルスが摘発された例はなかった。

パッシブなウイルス分離の他に 2 症例でBRSVに対する、他の 1 症例ではBCVに対するアクティブな分離を行ったが、いずれもウイルス分離陰性であった。

表4 呼吸器病性病性鑑定検体でのウイルス分離成績

鑑定の目的	病原診断	検体	アクティブ分離		パッシブ分離
			目的ウイルス	分離結果	
症例1 発咳・鼻汁の原因	BVD(分離)、 BHV4(分離)、 BHV-1(PCR)、 AD-7(抗体)	全血14検体、 スワブ14検体	n/a	n/a	BVD, BHV4
症例2 呼吸器ウイルス	RSP(PCR)	スワブ2検体	BRSV	-	-
症例3 呼吸器ウイルス、 マイコプラズマ検査	BCV(PCR)	スワブ2検体	BCV	-	-
症例4 ウイルス検査、 マイコプラズマ検査	BRSV (抗体、簡易検査)	全血8検体、 スワブ8検体	BRSV	-	-
症例5 発咳・鼻汁の原因	不明	全血8検体、 スワブ8検体	n/a	n/a	-

n/a: NotApplicable



2. 蛍光抗体法二次抗体の検討

VMRD社のものは非特異蛍光がきわめて低いものの、蛍光レベルも低く、ウイルスによっては蛍光像が見にくいものがあり、BHV-1ウイルスやPI-3ウイルスでは判定が困難であった。自作抗体はバックの非特異蛍光が強めであるものの、特異蛍光との区別は可能であり、コストが低いので、ルーチンの検査に使用可能であると思われる。今回新しく試したabcam社のものは800倍といった高希釈でも使用でき、また200倍希釈で使用すると他の2次抗

体で見にくかったBHV-1ウイルスやPI-3ウイルスでも明瞭な蛍光像が得られた。abcam社のものを800倍に希釈すると1検体あたりのコストは42円程度となりルーチンでの使用も可能と思われた。また、特に期待度が高い検体では200倍で使用する事とした(表6)。

表6 2次抗体比較まとめ

抗体	希釈	BHV	PI-3	BRSV	BCV	AD-7	BVD	1検体 (12ウェル) あたりコスト	備考
VMRD	1	▲	▲	○	○	○	○	1080円	0.05ml × 12ウェル × 18000円/10ml
自作	20	▲	▲	○	○	○	○	???	廃用予定鶏等 を使用
Abcam	200	○	○	○	○	○	○	168円	0.05ml × 12ウェル × 28000円/0.5ml /200
Abcam	800	▲	▲	○	○	○	○	42円	0.05ml × 12ウェル × 28000円/0.5ml /800

【考察】

今回、できるだけ労力をかけずに幅広い範囲のウイルスを分離する目的で96穴プレートを用いたパッシブなウイルス分離法を検討し野外材料で実施した。96ウェルプレートは、低コスト、簡便に多種の細胞を用いることができ、また、ウェル面積が小さいため、そのままアセトン固定した細胞で蛍光抗体法を行っても、必要な抗体量が少なくすむという利点があった。牛流行熱抗体検査の検体からは検査した162検体のうちウイルスは分離されたのは第Ⅲ期の血球からBK細胞3代目で分離されたBVDウイルス1例だけであった。なお、この個体は、Ⅳ期血清ではBVDVに対する抗体が上昇しており、また臨床的にも異常が見られなかったことからPI牛ではなく、不顕性の一過性の感染であったものと思われた。1例だけの分離例ではあるが、検体が健康な子牛由来のものであったことを考慮すると、今回のウイルス分離成績は決して悪いものではないと思われた。

病性鑑定例では、5症例のうち1症例でパッシブなウイルス分離法でBHV-4ウイルスとBVDウイルスが分離された。1症例から2種のウイルスが分離されたことから、96穴プレートを用いた分離法でも、採材や検体の取り扱いの状態が良ければ良好な分離率が得られるものと思われた。特にBHV-4ウイルスは、BAT細胞といったウイルス分離にあまり使用されない細胞から分離されており、使用する細胞の種類を多くしたことが、分離に成功した要因と思われた。また、今回の検討ではウイルスが分離されたのはすべて初代培養系の細胞であった。初代培養系の細胞は、幅広いウイルスに対する感受性を有していることは知られているが、継代可能数が限られているため、株化細胞と比べて使用しにくいという欠点がある。今回行った96穴プレートを用いた分離法では、使用する細胞量が少なくすむため、細胞を増やすための継代を少なく抑えることができるので初代培養系の細胞が使いやすいという長所もあった。

今回の検討では、蛍光抗体法でウイルスが摘発された例はなかったが、蛍光抗体法はBVDウイルスのNCP株やCPEが不明瞭なウイルスの摘発に有効と思われるので、今後も検討を続けたい。

今後も使用する細胞をより感受性の良いものに変える等の改善を行い、さらに分離率を上げるよう努力していきたい。

