

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、ウイルス病の病性鑑定では遺伝子検査（PCR法）の重要度が増している。病性鑑定マニュアルでも版を増す毎にPCR法で判定可能な疾病が増えている。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。しかし、ウイルス分離は（a）新種や変異株ウイルス等のPCR法で診断できないようなウイルスの診断、（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等ウイルス症状の確認、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。一方、病性鑑定マニュアルにある牛ウイルスの分離法は、多くが回転培養であり、その使用細胞や培養温度も異なっており、網羅的に実施することは困難である。

（b）の目的で、すでに診断がついた等特定のウイルスを積極的に分離する場合の「アクティブなウイルス分離」と（a）の目的の「パッシブなウイルス分離」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として96ウェルプレートでのウイルス分離を行い、後血清を用いた間接蛍光抗体法を併用した方法を検討したので報告する。

【材料】1. 流行熱事業抗体調査検体：平成24年度事業で採取されたヘパリン血81検体×2期分の血漿および血球。2. 病性鑑定事例：平成25年1月以降に病性鑑定依頼があった牛呼吸器病の5症例の合計64検体（鼻腔スワブ34検体、全血30検体）。

【方法】96穴マイクロプレートを横置きにして、2列ずつBHK、HmLu、MDBK、BFM、BAT、BATの各細胞を作成し、ウイルス分離材料を接種した。2-3代継代を行い、それぞれ5-7日間CPEを観察した。必要に応じて、さらに1代継代、2-3日後にアセトン固定しそれぞれの個体からの後血清を一次血清とした蛍光抗体法を実施した。

【結果】1. 流行熱事業抗体調査：第3期血球からBVDV（BK）1株が分離された。2. 病性鑑定事例：1症例で14検体の鼻腔スワブからBVDV（BFM）2株およびBHV-4（BFM、BAT）2株が分離された。蛍光抗体法でのみ摘発された事例はなかった。

【まとめ・考察】不特定のウイルスをターゲットにしてウイルス分離を行う際は、多種の細胞を用いた方が有利である。回転培養等手間のかかる方法では細胞の種類を増やすのにも限界があるため、96ウェルのマイクロプレートを用いてウイルス分離を行った。また、マイクロ化したことによる分離率の低下を補うために、蛍光抗体法も検討した。流行熱事業の検体では、300以上の検体からのウイルス分離は1株のみであったが、対象が健康な子牛であることから決して悪い分離率ではないと思われた。病性鑑定事例では1症例で、14検体のスワブから2種4株のウイルスが分離され、検体の状態がよければ本法でも十分ウイルス分離ができることが示唆された。特に、BHV-4は通常あまりウイルス分離に使用されない細胞から分離されており、本法の応用によって分離することができたといえる。蛍光抗体法は今回は有効ではなかったが、BVDV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。