

ノダムラウイルスに関する研究

血清学的診断法の検討

佐藤 平二・山崎 康人
三浦 康男*・林 重美*

(昭和52年8月30日 受理)

Studies on Nodamura Virus

Evaluation of Serological Diagnostic Methods

Heiji SATO, Yasuto YAMAZAKI, Yasuo MIURA*
and Shigeyoshi HAYASHI*

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

緒 言

ノダムラウイルスは1956年 Scherer らが乳のみマウスを用いてコガタアカイエカから日本脳炎ウイルスの分離を試みていた際、日本脳炎ウイルス、Getahウイルスと共に分離されたもので^{14,15)}、アカバネウイルス¹²⁾を含む88の arbovirus, 42の enterovirus, 12の他のウイルスとの血清学的比較の結果、何れにも一致せず、新しい arbovirus とされた。

当時東京近郊の一年未満の幼豚の抗体調査により1956年81%, 1957年51%の中和抗体陽性例が報告されたが本ウイルスの病原性については明らかでなかった¹⁶⁾。しかしノダムラウイルスは蚊の体内で増殖し乳のみマウスに伝播することが証明されたが¹⁶⁾、エーテル・クロロフォルムに耐性であって一般の arbovirus に較べて異質であること¹⁵⁾、形態学的、理化学的性状では picornavirus に近いこと^{4,9,10)} 昆虫病原性があること^{2,3)} などの点で興味深いウイルスである。さらに本ウイルスは哺乳動物では乳のみマウスにのみ病原性であり¹⁶⁾ 組織培養細胞では BHK21 細胞にのみ、CPEを生ずることなく増殖する³⁾ といわれ、乳のみマウスにおける病変は中枢神経の壊死、後肢筋の変性および炎症がみられ後軀麻痺が現われるなど Cocksackie B 群ウイルス、Getah ウイルスのそれと酷似する^{13,16)}。このような特性から1972年から1974年にかけてわが国に発生した牛の異常産に関連があるのではないかと

考えられたこともあったが、牛の異常産の原因としては抗体調査の成績^{8,6)} や病原体分離の成功⁷⁾ などからアカバネウイルス説が定着した。このアカバネ病においてみられたように、orphan ウイルスであったアカバネウイルスが、分離後10数年たって動物病原性が確立した例は、他の多くの orphan ウイルスについても将来に備えて関心が払われている必要があることを示唆している。ノダムラウイルスについても同様のことが考えられるが、本ウイルスは宿主域が狭いこと、CPEをしめさないなどの特性から中和試験が困難なので補体結合反応または沈降反応などの方法が診断法として考えられる。すでに補体結合反応は Scherer ら¹⁵⁾ により行なわれ、沈降反応は Bailey ら²⁾ により行なわれているが、各種動物について多種の抗原を用いての反応条件の比較決定は試みられていないので、これらを明らかにし抗体調査、抗原検索に資することを目的として本実験が行なわれた。

材料および方法

1. 使用ウイルス

ノダムラウイルスは農林省家畜衛生試験場九州支場より分与されたもので、乳のみマウスで17代継代されたものである。本株は腹腔内接種により感染した乳のみマウスの後肢筋と脳の10%乳剤を3000 rpm 15分間遠沈した上清を-80°Cに保存したものである。

2. 使用動物

実験に用いられたマウスは gpc 系、CFW 系の conventional である。免疫血清作製用に Wister 系ラット、モルモットおよび日本白色種ウサギの成熟したものをを用いた。

* 農林省家畜衛生試験場九州支場（鹿児島市）
Kyushu Branch Laboratory, National Institute of Animal Health, Kagoshima shi, Japan.

3. 抗原作製法

補体結合反応 (CFT) とゲル内沈降反応 (GPT) 用抗原としてはウイルスを乳のみマウス腹腔に接種し発症後、後肢筋肉を採取し VBS⁺⁺ (NaCl 8.5 g, 5-5 ジエチルバルビツール酸 0.575 g, ジエチルバルビツール酸 Na 0.375 g, CaCl₂ 0.028 g, MgCl₂·6 H₂O 0.168 g/1000 ml) で 10% 乳剤を作製し、この乳剤に各種の処理を行なった。同時に非感染組織について同様の処理を行ない正常抗原を調製した。

a) 遠沈処理：10 倍乳剤の 3000 rpm 15 分間 遠沈した上清を遠沈処理抗原とした。

b) 凍結融解処理：10 倍乳剤をドライアイス・アルコールと流水による凍結融解を 5 回 繰返したのち 10000 rpm 60 分間 低温遠沈した上清を凍結融解抗原とした。

e) 超音波処理：10 倍乳剤を氷水で冷却しながら超音波発生装置 (MSE モデル 150W) で 20 KH/sec 10 分間の処理後 10000 rpm 60 分間遠沈して上清を分離した。

d) ダイフロン処理：遠沈抗原に 1/2 容のダイフロン S 3 (CCIF₂-CCIF) を加えてミキサーにより 2~3 分間隔で 4 回攪拌を繰返したのち 3000 rpm 15 分間遠沈し、中間層の組織由来変性蛋白を混じないように上層の抗原部を分離し、同様のダイフロン S 3 による処理を、中間層の出現がなくなるまで 4~5 回繰返した。

e) アセトン処理：遠沈抗原に 10 倍量の冷アセトン (-20°C) を加えてミキサーで 3 分間混合攪拌し、3000 rpm 15 分間遠沈沈渣を減圧乾燥し、これに原量の VBS⁺⁺ を加えて一昼夜溶解したのち 3000 rpm 15 分間遠沈した上清をアセトン 1 回処理抗原とした。アセトンを捨てた沈渣に再び 10 倍量のアセトンを加えて同様の処理を繰返したものをアセトン処理の回数に応じて 2 回処理、3 回処理抗原とした。

f) クロロフォルム処理：遠沈抗原にその 1/2 容、1/4 容、1/20 容の冷クロロフォルム (-20°C) をそれぞれ加えてミキサーで混合攪拌したのち 3000 rpm 15 分間遠沈してその上清を採取した。

g) エーテル処理：遠沈抗原にその 1/2 容 1/4 容 1/10 容の冷エーテル (-20°C) を加えてミキサーで混合攪拌したのち 4°C に密栓して 1 夜放置した。翌日このエーテルと抗原の混合液をデシケーター内のシャーレに入れ減圧下でエーテルを蒸発除去したのち 3000 rpm で 15 分間遠沈した上清をエーテル処理抗原とした。

h) アセトン・エーテル処理：感染乳のみマウスの後肢筋に 20 倍量の冷アセトンを加えてホモジナイザーで磨砕し、これを 3000 rpm 5 分間遠沈し上清を除き、さらに原量のアセトンで抽出を 2 回繰返し、3 回目には冷アセトン・エーテルの等量混合液で抽出した。4 回、5 回目には冷エーテルのみを使用し、最後の遠沈後上清を捨て沈渣を減圧乾燥した。乾燥沈渣に原材料の 4 倍量の VBS⁺⁺ を加えて溶解し、4°C に 1 夜放置したのち 10000 rpm で 60 分間低温遠沈を行ないその上清をアセトン・エーテル処理抗原とした。

i) 凍結融解・クロロフォルム・ダイフロン処理：凍結融解処理抗原に 1/2 容のクロロフォルムを加えてクロロフォルム処理を行なったのちダイフロン処理を中間層の出現しなくなるまで繰返した。

j) 凍結融解・ダイフロン処理：凍結融解処理抗原をダイフロンで数回処理し中間層の出現しなくなるまでにしたものである。

k) クロロフォルム・ダイフロン処理：遠沈抗原を 1/2 容のクロロフォルムで処理したのちダイフロンで数回処理した。

l) 熱処理：遠沈上清を 50°C, 60°C, 70°C で 30 分ないし 180 分間加熱したのち 3000 rpm 15 分間遠沈しその上清を使用した。

4. 免疫血清の作製

a) マウス：gpc 系成熟マウスに遠沈抗原 0.2 ml を腹腔注射し、3 週後に再び 0.2 ml 注射し、その 7 日後にエーテル麻酔を施して心臓より採血し、血液量の 1/2 量の PBS を加えて血清分離を行ない、これを 2 倍希釈血清として -20°C に保存した。

b) ラット：ラットには遠沈抗原の 2 ml を腹腔内に接種した。4 週後に再び 2 ml 接種し、その 7 日後にエーテル麻酔を施して心臓より採血し、分離血清は使用まで -20°C に保存した。

c) モルモット：モルモットには遠沈抗原、凍結融解抗原、凍結融解・ダイフロン処理抗原、凍結融解・クロロフォルム・ダイフロン処理抗原、ダイフロン処理抗原、アセトン・エーテル処理抗原の 6 種類の抗原を用い、4~5 週間隔で腹腔に 2 ml 2 回注射し免疫前と注射後 1 週ごとに部分採血した。2 回目注射の 7 日後に心臓より全採血し、得られた血清は -20°C に保存した。

d) ウサギ：ウサギには凍結融解抗原とクロロフォルム・ダイフロン処理抗原を 6 週間隔で 2 回、2 ml ずつ耳静脈内注射した。免疫前と経過血清を 1 週ごとに分離し、ブースター注射後 7 日目に部分採血、10 日

目に心臓より全採血して血清は -20°C に保存した。

5. 野外血清材料

野外血清は鹿児島地方で採取した マウス 33 例, 馬 12 例, 山羊 60 例, 犬 51 例, 牛 445 例, 豚 280 例, 鶏 30 例の計 911 例であった。

CFT, GPT に用いられた実験動物血清と野外血清は, モルモット, 牛, 鶏血清では 56°C 30 分, マウス, ラット, 馬の血清では 60°C 20 分, 豚血清では 60°C 30 分, ウサギ, 犬の血清では 63°C 20 分の非働化を行なった。

6. 補体結合反応 (CFT)

CFT は反応液の全量を 0.6 ml とするいわゆる少量法⁹⁾を用い, 希釈液は VBS⁺⁺を使用した。抗原 4 単位, 補体 2 単位, 溶血系は 3 単位の溶血素と 2.5% 羊血球の等量混合液を用いた。牛の血清については間接補体結合反応を応用した¹¹⁾。すなわちマウス血清を指示血清として抗原 2 単位 (0.1 ml), 指示血清 2 単位 (0.1 ml), 補体 2 単位 (0.2 ml), 溶血系 0.2 ml 被検血清各希釈 0.1 ml を用いた。まず被検血清と抗原を 4°C で 24 時間感作したのち指示血清と補体を加えて 4°C でさらに 18 時間感作し, 溶血系を加えて 37°C 30 分感作のち判定した。CF 抗原価, CF 抗体価は 50% 溶血を示す血清の希釈倍数をもって示した。

7. ゲル内沈降反応 (GPT)

GPT では電気泳動用寒天 (栄研) を 1% の濃度に PBS に溶解し, 防腐剤として NaN_3 を 0.1% の割合

に添加し, スライドガラス ($2.5 \times 7.5\text{ cm}$) に 2 ml を流し, 各種処理抗原を用いて行なった。

実験成績

1. マウスにおける免疫反応の比較

a) 補体結合反応の特異性と反応の条件: 遠沈抗原と, この抗原で作製したマウス免疫血清を用いて 4°C 18 時間感作による CFT では抗原, 抗血清の濃い部分において弱い非特異反応または抗補体作用がみられたが希釈により消失し, ノダムラウイルスの特異的 CFT が観察された (Table 1)。本系による CFT の感作時間と感作温度を検討した所, Table 2 に示すように 4°C 18 時間が 37°C での感作に優り, 抗原価, 抗体価共に最も高い価が得られたので以後の CFT にはすべて 4°C 18 時間を感作の条件とした。

間接補体結合反応は牛の血清を用いる場合に必要なので, 家畜衛生試験場より分与された免疫牛血清とマウスで作った指示血清を用いて抗原単位と指示血清単位の最適な組合せを求めた。その成績は Table 3 に示すように抗原 2 単位, 指示血清 2 単位を用いた場合に 64 倍まで陽性を示し, Table 4 に見る如く, 正常マウス血清を指示血清の代りに用いた場合と非免疫牛血清では何れも陰性であり本反応が特異的であると考えられた。

b. ゲル内沈降反応の特異性: 遠沈抗原とマウス抗血清により GPT を行なったところ, 37°C において 2 時間後から沈降線が観察され 6 時間目までに略完全

Table 1. Complement fixation boxtitration with mouse antigen and mouse antiserum

Antigen dilution*1	Serum dilution								NrS*2	NS*3
	4	8	16	32	64	128	256	512		
1	4 *6	4	4	4	4	4	2	0	±	0
2	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0
4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0
8	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0
16	4	4	4	4	4	±	0	0	0	0
32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NrAg*4	1	0	0	0	0	0	0	0		
NAg*5	±	0	0	0	0	0	0	0		

*1: Centrifuged supernate antigen prepared from 10% emulsion of infected limb muscle.

*2: Normal serum.

*3: Substituted saline for antirum.

*4: Normal antigen.

*5: Substituted saline for antigen.

*6: 4 no hemolysis; 3 25% hemolysis; 2 50% hemolysis; 1 75% hemolysis; 0 100% hemolysis; ± 100—75% hemolysis.

Table 2. Effects of variable incubating conditions on complement fixation test

Incubation Temp. & Time	Antigen dilution	Serum dilution							NrS* ²
		8	16	32	64	128	256	512	
37°C 30 min.	8	4	4	3	0	0	0	0	0
	16	4	4	4	0	0	0	0	0
	32	4	4	4	0	0	0	0	0
	64	4	4	4	0	0	0	0	0
	128	4	3	3	0	0	0	0	0
	256	1	1	0	0	0	0	0	0
	512	0	0	0	0	0	0	0	0
	NrAg* ³	0	0	0	0	0	0	0	0
37°C 60 min.	8	4	4	3	0	0	0	0	0
	16	4	4	4	0	0	0	0	0
	32	4	4	4	0	0	0	0	0
	64	4	4	4	0	0	0	0	0
	128	4	4	4	3	0	0	0	0
	256	3	3	1	0	0	0	0	0
	512	0	0	0	0	0	0	0	0
	NrAg	0	0	0	0	0	0	0	0
37°C 90 min.	8	4	4	4	0	0	0	0	0
	16	4	4	4	0	0	0	0	0
	32	4	4	4	1	0	0	0	0
	64	4	4	4	3	0	0	0	0
	128	4	4	4	1	0	0	0	0
	256	4	4	2	0	0	0	0	0
	512	1	0	0	0	0	0	0	0
	NrAg	0	0	0	0	0	0	0	0
4°C 18 hr.	8	4	4	4	4	1	0	0	0
	16	4	4	4	4	4	0	0	0
	32	4	4	4	4	4	0	0	0
	64	4	4	4	4	4	0	0	0
	128	4	4	4	4	4	2	0	0
	256	4	4	4	4	4	1	0	0
	512	4	2	2	0	0	0	0	0
	NrAg	0	0	0	0	0	0	0	0

*1: Centrifuged supernated antigen Lot 2 prepared from 10% emulsion of infected limb muscle.

*2: Normal serum.

*3: Normal antigen.

Table 3. Optimal combination of antigen and indicating serum in indirect complement fixation test

Combination of Ag.* ¹ and Ab.* ² (IS)* ³			Bovine serum dilution							NS* ⁴	NAG* ⁵	NC* ⁶
			8	16	32	64	128	256	512			
4 unit	4 unit		0	0	±	±	4	4	4	0	0	4
2 unit	2 unit		0	0	1	1	4	4	4	0	0	4
4 unit	2 unit		0	0	1	1	2	4	4	0	0	4
4 unit	2 unit		0	0	0	0	1	4	4	0	0	4

*1: Antigen.

*2: Antibody.

*3: Indication mouse serum.

*4: Substituted saline for antiserum.

*5: Substituted saline for antigen.

*6: No complement.

な反応がみられ、18時間後の反応とほとんど差が認められなかった。対照とした正常抗原、正常血清との間に沈降線は出現せずノダムラウイルスに特異的である

と思われた (Table 5).

c. 補体結合抗原の性状比較: 抗原作製法のうち乳剤の遠心沈澱、凍結融解、超音波処理の三つの CF 抗

Table 4. Indirect complement fixation test of bovine sera

Combination		Bovine serum dilution								NS* ¹	NC* ²
		1	2	4	8	16	32	64	128		
Ag. +	Bovine serm 1 + IS* ³	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4
Ag. +	Bovine serm 2 + IS	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4
Ag. +	BIS* ⁴ + IS	0	0	0	0	0	0	1	4	0	4
Ag. +	Bovine serm 1 + NrS* ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Ag. +	Bovine serm 2 + NrS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Ag. +	BIS + NrS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4

*¹: Substituted saline for antiserum.*²: No complement*³: Indicating mouse serum.*⁴: Bovine immune serum.*⁵: Mouse normal serum.

Table 5. Gel precipitation test with mouse antigen and mouse serum

Antigen dilution* ¹	Serum dilution						NrS* ²
	4	8	16	32	64	128	
2	+	+	+	+	—	—	—
4	+	+	—	—	—	—	—
8	+	—	—	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—	—	—
NrAg* ³	—	—	—	—	—	—	—

*¹: Original antigen was centrifuged supernate of 10% emulsion of infected limb muscle.*²: Normal serum.*³: Normal antigen.

原の抗原価の比較では三者の間に差はみられなかった (Table 6). 次に抗原精製用の有機溶媒の影響について比較した結果では、ダイフロン、クロロフォルム、エーテルの処理により抗原価は影響をうけなかったが、アセトン、アセトン・エーテル処理抗原は対照の遠沈上清抗原の 1/4 程度に力価が低下した (Table 7). 次に遠沈抗原の加熱の影響をしらべたが 50°C では 180 分、60°C では 120 分の加熱でも抗原価の低下は認められなかったが、70°C では 30 分で 1/4 に力価が低下した. しかし 150 分まで加熱を続けてもそれ以上の低下は認められなかった (Table 8).

2. ラットにおける免疫反応

ラットでは遠沈抗原により免疫血清を作ったが、この免疫血清は CFT では 256 倍を示し、非特異反応、抗補体作用は認められなかった. GPT ではラット血清と遠沈抗原との間に単一沈降線を形成し、血清の 64 倍希釈まで陽性を示し、正常抗原との間には沈降線の形成は認められなかった.

3. モルモットにおける免疫反応

モルモットでは 6 種類の抗原を用いてそれぞれ免疫

血清を作り、対応する抗原と経過血清との間におこる反応を比較した.

a) CFT: 経過血清における CF 抗体の発現は Fig. 1 に要約され、それによればアセトン・エーテル処理抗原以外は何れも 2 週目より順調な抗体価の上昇がみられ、ブースター注射後には 1024 ないし 2048 倍に達したがアセトン・エーテル処理抗原による抗体価は 256 倍に止った. このうち処理の過程に凍結融解を含んで作られた抗原ではブースター注射後の血清で低希釈部で弱い非特異反応が認められた. しかし、これらの非特異反応は血清の希釈により消失した.

b) GPT: 沈降抗体は免疫開始後 7 日目に発現し 8~32 倍に達していた. 最終的には 64~256 倍にまで達する (Fig. 2). ここでもアセトン・エーテル処理抗原は抗体産生能が弱かった. ブースター注射により力価は上昇するが、アセトン・エーテル処理以外の抗原による抗血清ではその低希釈部で複数の沈降帯を形成したが、高希釈では一本となった. また凍結融解抗原、凍結融解・クロロフォルム・ダイフロン処理抗原の二つの抗原で作った抗血清では 4 倍希釈で正常抗原

Table 6. Comparison of variable CF antigen preparations

Antigen preparations	Antigen dilution* ¹	Serum dilution				NrS* ²
		32	64	128	256	
Centrifuged antigen	32	4	4	4	0	0
	64	4	4	4	0	0
	128	4	4	4	0	0
	256	4	4	4	0	0
	512	4	4	0	0	0
	1024	1	0	0	0	0
	NrAg.* ³	0	0	0	0	0
Freez. & thaw. antigen	32	4	4	4	0	0
	64	4	4	4	2	0
	128	4	4	4	0	0
	256	4	4	4	0	0
	512	4	4	4	0	0
	1024	0	0	0	0	0
	NrAg.	0	0	0	0	0
Sonicated antigen	32	4	4	4	0	0
	64	4	4	4	0	0
	128	4	4	4	1	0
	256	4	4	2	0	0
	512	4	4	1	0	0
	1024	2	2	0	0	0
	NrAg.	0	0	0	0	0

*¹: Original concentration was supernate of 10 % emulsion of infected limb muscle.*²: Normal serum.*³: Normal antigen.

Table 7. Effects of organic solvent treatment on variable CF antigen preparations

Solvent	Treatment	Antigen dilution* ¹							NrS* ²
		16	32	64	128	256	512	1024	
Daiflon	1 * ³	4	4	4	4	2	0	0	0
	2	4	4	4	4	2	0	0	0
	3	4	4	4	4	4	1	0	0
Aceton	1	4	4	4	0	0	0	0	0
	2	4	4	4	0	0	0	0	0
	3	4	4	4	0	0	0	0	0
Chloroform	1/2vol.* ⁴	4	4	4	4	3	3	0	0
	1/4vol.	4	4	4	4	4	3	0	0
	1/20 vol.	4	4	4	4	4	3	0	0
Ether	1/2vol.	4	4	4	4	4	1	0	0
	1/4vol.	4	4	4	4	4	1	0	0
	1/20 vol.	4	4	4	4	4	0	0	0
Aceton and ether		4	4	4	0	0	0	0	0
Control* ⁵		4	4	4	4	4	±	0	0

*¹: Original concentration was supernate of 10 % emulsion of infected limb muscle.*²: Normal serum.*³: Number of repetition.*⁴: Volume used for treatment.*⁵: Original centrifuged antigen.

Table 8. Effect of heating on CF antigenicity of centrifuged supernate antigen*¹

Temperature	Time (min.)	Antigen dilution* ²								NrS* ³
		8	16	32	64	128	256	512	1024	
50°C	30	4	4	4	4	4	4	0	0	0
	60	4	4	4	4	4	4	0	0	0
	90	4	4	4	4	4	3	0	0	0
	120	4	4	4	4	4	3	0	0	0
	150	4	4	4	4	4	4	3	0	0
	180	4	4	4	4	4	4	0	0	0
60°C	30	4	4	4	4	4	3	0	0	0
	60	4	4	4	4	4	4	3	0	0
	90	4	4	4	4	4	4	0	0	0
	120	4	4	4	4	4	4	1	0	0
70°C	30	4	4	4	4	2	0	0	0	0
	60	4	4	4	4	1	0	0	0	0
	90	4	4	4	4	4	0	0	0	0
	120	4	4	4	4	0	0	0	0	0
	150	4	4	4	4	0	0	0	0	0
Control* ³		4	4	4	4	4	4	2	0	0

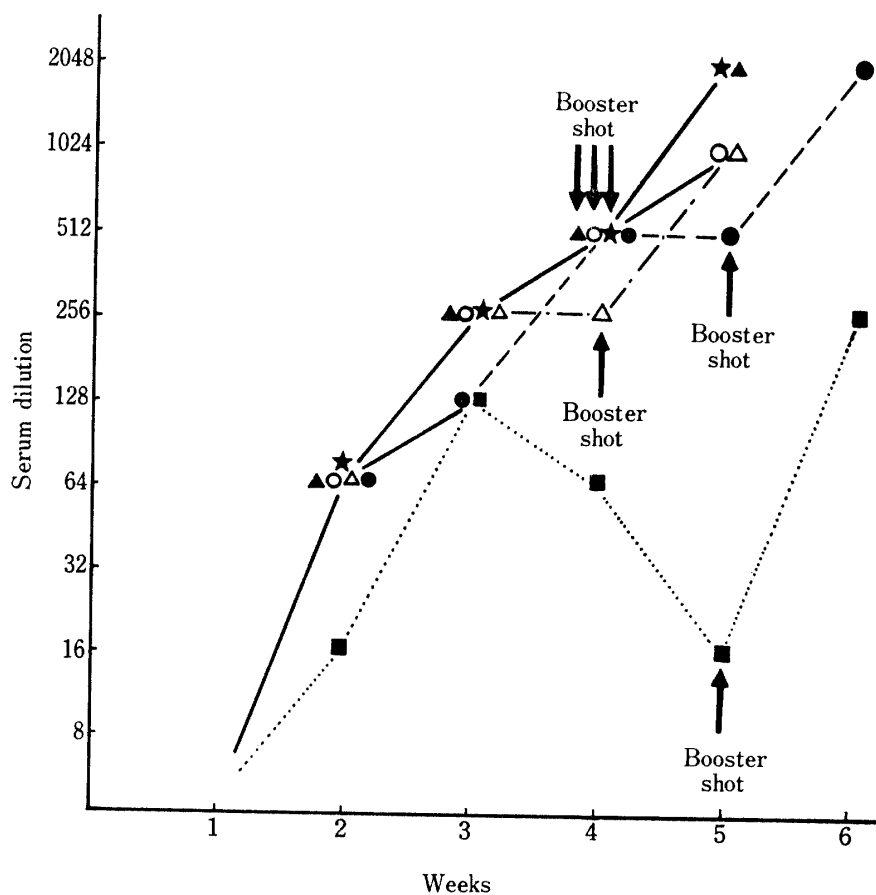
*¹: 4 unit of mouse antiserum were employed.*²: Normal serum.*³: Original centrifuged supernate of 10% emulsion of infected limb muscle.

Fig. 1. Complement fixing antibodies induced in guinea pig with variable antigens. Symbols: ○—○ 3000 rpm supernate; △- - -△ freez. & thaw.; ●- - -● Daiflon; ▲.....▲ freez. & thaw. & Daiflon; ★- - -★ freez. & thaw. chloroform & Diflon; ■.....■ acetone & ether.

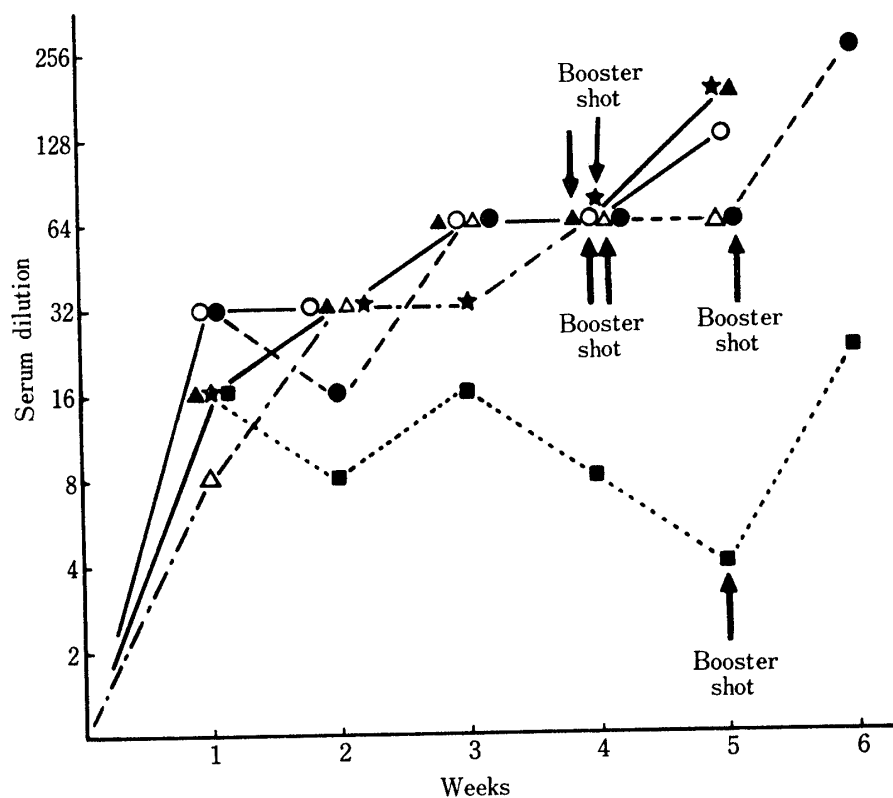


Fig. 2. Gel precipitating antibodies induced in guinea pig with variable antigens. Symbols: ○—○ 3000rpm supernate; △---△ freez. & thaw.; ●---● Daiflon; ▲-...-▲ freez. & thaw. & Daiflon; ★-...-★ freez. & thaw chloroform & Daiflon; ■.....■ acetone & ether.

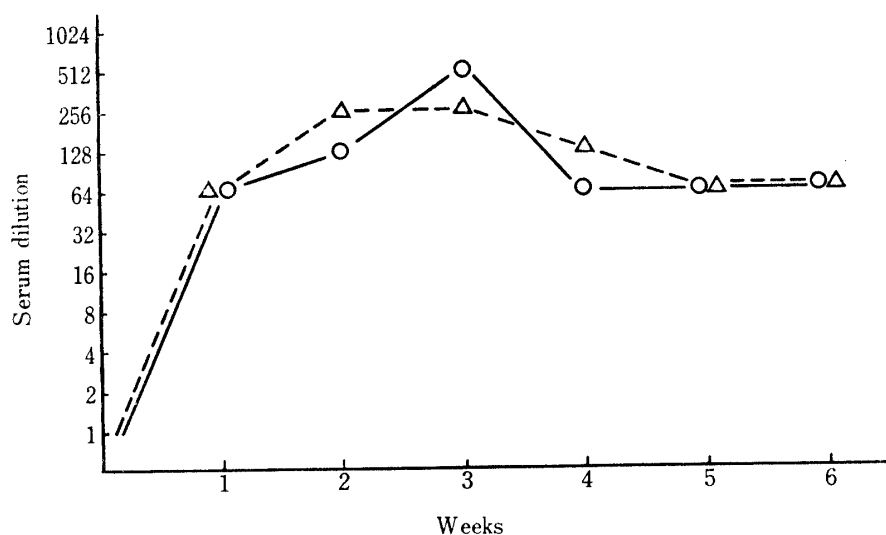


Fig. 3. Gel precipitating antibody response in rabbit against freeze & thaw antigen ○—○ and chloroform & Daiflon treated antigen △---△.

との間に沈降線が生じた。

4. ウサギにおける反応：凍結融解抗原とクロロフォルム・ダイフロン処理抗原により作製した抗血清は

何れも抗補体作用のため CFT は行なえなかった。しかし GPT では1週目より抗体の上昇が初まり、2～3週目にはかなり高い力価を示し、6週目まで64倍を

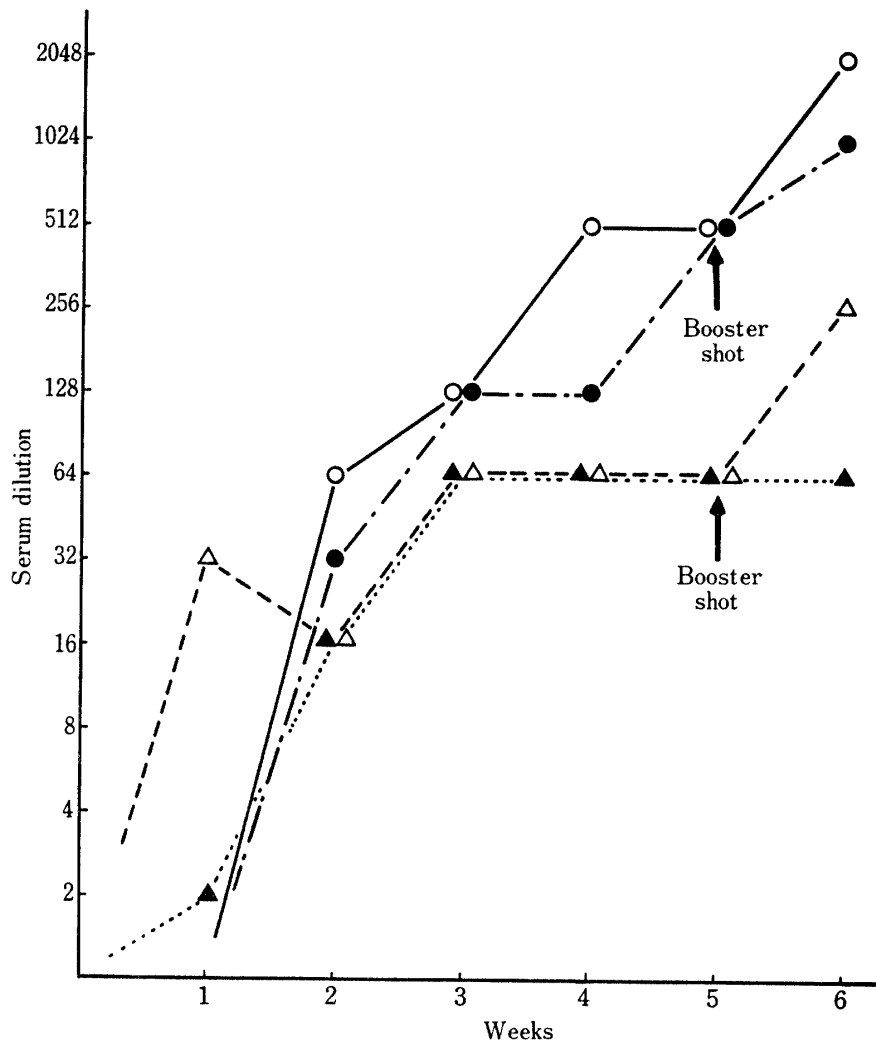


Fig. 4. Effects of 2-mercaptoethanol treatment on complement fixing and precipitating antibody. Symbols : ○—○ nontreated CF antibodies; ●---● post-treated CF antibodies; △····△ nontreated GP antibodies; ▲.....▲ post-treated GP antibodies.

維持した。

5. 補体結合抗体と沈降抗体の比較

CF 抗体と GP 抗体の推移と抗血清の 2-メルカプトエタノール処理の影響についてはダイフロン処理抗原とその抗血清について調べた。それによれば GP 抗体は 1 週後に出現するのにに対し CF 抗体は 2 週後から認められるようになった。両者の力価の差は CF 抗体価の方が沈降抗体価の 4 倍ないし 8 倍高い。(Fig. 4) 経過血清を 2-ME で処理したのち CFT, GPT を行ない処理前のものと対比した成績によれば CF 抗体が終始 2-ME の処理により力価に影響を受けなかったのに対し, GPT においては 1 週後の抗血清が 2-ME 処理により沈降線の消失を来し, この時期の GP 抗体は IgM 部に活性をもつことを伺わせた。しかし 2

週以降は 2-ME の影響がみられなかった (Fig. 4)。

6. 野外血清材料の調査成績

抗体調査にはダイフロン処理抗原を用いて CFT および GPT を行なった。CFT の成績は, マウス 33 例, 馬 12 例, 牛 145 例の血清はすべて陰性であった。山羊血清は 60 例中 5 例に抗補体作用がみられ残りはすべて陰性であった。この抗補体作用はカオリン処理によっても除去できなかった。豚血清 280 例では 38 例に抗補体作用が認められた他はすべて陰性であった。GPT の成績もすべて陰性であった (Table 9)。

考 察

ノダムラウイルスはわが国のコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) より分離され豚にも抗体の

Table 9. Results of serological survey for Nodamura virus in variable animals

Animals	CFT*1			GPT*2
	<1:4	Nonspecific	Anti C'/*3	<1:4
Cattle	145 *4 145			445 445
Goat	55 60	5 60		60 60
Horse	12 12			12 12
Dog	14 51		37 51	51 51
Pig	242 280		38 280	280 280
Mouse	33 33			
Fowl				30 30

*1: Complement fixation test with Daiflon treated antigen.

*2: Gel precipitation test with Daiflon treated antigen.

*3: Anticomplement reaction.

*4: Denominator is number tested.

証明されたウイルスである。本ウイルスは多くの節足動物体内で増殖し、ヨウシュミツバチ (*Apis melifera* ハチノスツブリガ (*Gelleria mellonella*) に麻痺をおこして致死の病原性を示し³⁾ ハチの致死の麻痺ウイルスに似ることが知られている¹⁾。

実験動物では乳のみマウスにのみ感染し、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) により乳のみマウス間の伝播も証明されており¹⁵⁾、節足動物媒介性の潜在的動物病原性ウイルスとして特異的な存在である。アカバネウイルスによる牛の異常産の発生の経験からも、このような orphan ウイルスに対する注意は必要なことであって抗体調査または血清学的診断法が明らかにされていることが望まれる。ノダムラウイルスは乳のみマウスにのみ病原性であり、組織培養細胞では BHK 21 細胞でのみ増殖可能でしかも CPE を示さないという性質から野外材料による中和抗体の検索などには難点があるので、実際的には CFT または GPT の応用が考えられるが、それらの反応に用いられる抗原の特異性、反応の諸条件などについての検討は必ずしも十分ではなかった。そこで本実験においては感染発症したマウス組織乳剤を出発材料として、各種の抗原分離法、精製法により多種類の抗原を調製し、マウス、ラット、モルモット、ウサギを用いて実験を行ない反応の諸条件について詳細な比較検討を行なった。最初にマウス抗血清と遠沈上清抗原により CFT の基本的条件をしらべた結果、4°C 18 時間の感作が最高の抗原

価および抗体価を与え、いわゆる Kolmer 法が適当であることが確認された。牛血清での CFT では補体希釈法、牛補体の利用などによらなくても、マウス抗血清を指示血清として、抗原 2 単位、指示血清 2 単位による間接法が可能ながわがわが本法が牛の抗体調査に応用できることが明らかにされた。マウス抗血清による GPT は 6 時間目に明瞭な特異的沈降線が出現し、短時間のうちに反応の判定が可能であることがわかった。感染組織から抗原を分離する際の処理法の間に差は認められなかったが、後述するように凍結融解処理は組織成分の誘出が多いようであった。各種有機溶媒による抗原の精製を比較すると、マウス抗血清に対する抗原価ではダイフロン、クロロフォルム、エーテル処理抗原とも CF 抗原価に差が認められなかったが、アセトン処理を行程に含む処理法では力価が 1/4 程度に低下し、アセトンにより CF 抗原の一部の除去または抗原の不活化が考えられた。抗原の熱に対する安定性の検討では 60°C 2 時間までの加熱には安定であったが、70°C の加熱では 30 分間で抗原価は 1/4 程度に低下した。しかしそれ以後 150 分間加熱を続けてもそれ以上の力価の低下はみられず 640 倍程度の力価を保持し、70°C を境に熱に安定な部分と不安定な部分に分れることがわかった。この二つの部分の抗原価から前述のアセトンに影響をうける部分と易熱性の部分が同一の物質である可能性があると考えられた。次に遠沈上清抗原でラットを免疫して得られた抗血清は

CFT で 512 倍 GPT で 64 倍という力価を示し、非特異反応の出現もなく免疫実験用にはラットも使用し得ることが明らかにされた。モルモットにおける 6 種類の抗原によるそれぞれの免疫血清と当該抗原との反応を経時的に比較すると、CFT では何れの抗原によっても 2 週目から抗体の出現がみられ、抗補体作用もなかったが、アセトン・エーテル処理抗原では他のものに比し CF 抗体価が低かった。ブースター後の血清では CF 抗体価が一段と増加されるが凍結融解を行なった 3 つの抗原による抗血清では正常抗原に対する非特異反応が認められるようになった。GPT においては 1 週目より抗体価が上昇しアセトン・エーテル処理抗原以外は高い GP 抗体が認められ、それらはブースター後の血清では低希釈部において 2～4 本の沈降線を発現した。またブースター後の血清のうち、凍結融解抗原、凍結融解・クロロフォルム・ダイフロン処理抗原によるものでは正常抗原との間に低希釈血清 (1:4) で非特異的沈降線がみられ、凍結融解処理は組織から望ましくない物質を遊離することが知られた。しかし、GPT では凍結融解後ダイフロン処理により非特異反応の出現は避けられるが、CFT ではダイフロン処理によっても除くことはできなかった。ウサギを凍結融解抗原、クロロフォルム・ダイフロン処理抗原で免疫した場合では前者の方が高い反応を示したがブースター後血清では 2～4 本の沈降線が低希釈部で出現し 4 倍以下の低希釈血清により正常抗原に対しても沈降線を作りモルモットにおけると同様の傾向がみられた。以上の結果から CFT および GPT の抗原としては 3000 rpm 遠沈抗原とダイフロン処理抗原が最も適しているように思われるが、3000 rpm 遠沈上清は精製処理が行なわれていないので、多種の動物血清を対象とする際にはダイフロン処理抗原の方がより適しているのではないかと考えられた。実験の結果から GPT では免疫開始 1 週後から抗体が検知されることが明らかとなり、GPT は感染初期の抗体検出に好都合であることがわかった。2-ME によるモルモット抗血清の還元試験の結果から免疫初期の沈降抗体は主に IgM に活性があり 2 週以降は IgG に活性が移行するのに対し、CF 抗体は IgG に活性があると推測された。このことは一般に小型ウイルスにおいては IgG のみが補体結合性である⁵⁾といわれるが、ノダムラウイルスが picornavirus に分類されている事実と矛盾はない。

最後にダイフロン処理抗原を用いて野外材料について行なった試験ではすべて陰性の成績であったが、

Scherer ら¹⁶⁾ の調査とは時間的、地域的な隔差があり、比較することは難かしいが、今後さらに動物の種類、検体数をふやして調査を続けると共に節足動物におけるノダムラウイルスの保有の状態をしらべるなどの必要があるのではないかと考えられた。

結 論

ノダムラウイルスに関する血清学的反応の諸条件および抗原性について検討したところ以下のような結果が得られた。

1. 補体結合反応は総量 0.6 ml, 抗原 4 単位 補体 2 単位, 溶血系として溶血素 3 単位および 2.5 % 羊血球の等量混合液を用い, 4°C 18 時間感作を行なう条件下で特異的な反応が得られた。
2. 牛の血清については抗原 2 単位, マウス抗血清 (指示血清) 2 単位を用いる間接補体結合反応により満足すべき成績が得られた。
3. 補体結合反応, ゲル内沈降反应用抗原としては感染乳のみマウスの感染筋組織の 10 % 乳剤遠沈上清およびそのダイフロン処理したものが最も適当であった。
4. ノダムラウイルスの補体結合抗原は 70°C 30 分で破壊される部分とそれに安定な部分に分かれることが知られた。
5. ノダムラウイルスに対するゲル内沈降抗体は感作後 1 週より出現するが, 補体結合抗体は 2 週より出現し, 感染初期の抗体の検出には沈降反応によるのが適当である。
6. ダイフロン処理抗原を用い補体結合反応およびゲル内沈降反応により家畜家禽および実験動物の抗体調査をしたところすべて陰性であった。

謝 辞

終りに 本研究の遂行に当り多大の御協力を賜った農林省家畜衛生試験場九州支場長石原忠雄博士に深甚の謝意を表明致します。

文 献

- 1) Bailey, L., Gibbs, A. J. and Wood, B. D.: Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera*). *Virology*, **21**, 390-395 (1963)
- 2) Bailey, L. and Scott, H. A.: The pathogenicity of Nodamura virus for insects. *Nature*, **241**, 545 (1973)
- 3) Bailey, L., Newman, J. F. E. and Porterfield, J. S.: The multiplication of Nodamura virus in insect and mammalian cell culture.

- J. gen. Virol.*, **26**, 15-20 (1975)
- 4) International enterovirus study group: Picornavirus group. *Virology*, **19**, 114-116 (1963)
 - 5) 国立予防衛生研究所学友会編：ウイルス実験学総論，丸善，東京（1967）
 - 6) Kurogi, H., Inaba, Y., Goto, Y., Miura, Y., Takahashi, H., Sato, K., Omori, T. and Matsumoto, M.: Serologic evidence for etiologic role of Akabane virus in epizootic abortion-arthrogryposis-hydranencephaly in cattle in Japan, 1972-1974. *Archives Virology*, **47**, 71-83 (1975)
 - 7) Kurogi, H., Inaba, Y., Takahashi, E., Sato, K., Omori, T., Miura, Y., Goto, Y., Fujiwara, Y., Hatano, K., Kodama, K., Fukuyama, S., Sasaki, N. and Matsumoto, M.: Epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle: Isolation of Akabane virus from affected fetuses. *Archives Virology*, **51**, 67-74 (1976)
 - 8) Miura, Y., Hayashi, S., Ishihara, T., Inaba, Y., Omori, T. and Matsumoto, M.: Neutralizing antibody against Akabane virus in precolostral sera from calves with congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome. *Archiv gesamte Virusforschung*, **46**, 377-380 (1974)
 - 9) Murphy, F. A., Scherer, W. F., Barrison, A. K., Dunne, H. W. and Gary, G. W., Jr.: Characterization of Nodamura virus, an arthropod transmissible picornavirus. *Virology*, **40**, 1008-1021 (1970)
 - 10) Newman, J. F. E. and Brown, F.: Evidence for divided genom in Nodamura virus, arthropod-borne picornavirus. *J. gen. Virology*, **24**, 371-374 (1973)
 - 11) 日本獣医師会：家畜衛生に必要な免疫の概念と術式，日本獣医師会，東京（1972）
 - 12) Oya, A., Okuno, T., Kobayashi, I. and Matsuyama, T.: Akabane, a new arbor virus isolated in Japan. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **14**, 101-108 (1961)
 - 13) Scherer, W. F.: Histopathology of Coxsackie and Coxsackie-like viruses. *Ciba found. study group No. 7. Virus meningoencephalitis*, p. 37-39, Spottiswoode, Ballantyne & Co. Ltd., London (1961)
 - 14) Scherer, W. F., Funkenbush, W., Buescher, E. L. and Izumi, Y.: Sagiyama virus, a new group A arthropod-borne virus from Japan. I. Isolation, immunologic classification, and ecologic observations. *Americ. J. Trop. Med. Hyg.*, **11**, 255-268 (1962)
 - 15) Scherer, W. F. and Hurlbut, H. S.: Nodamura virus from Japan: A new and unusual arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. *Americ. J. Epidemiol.*, **86**, 271-285 (1967)
 - 16) Scherer, W. F., Verna, J. E. and Richter, R. W.: Nodamura virus, an ether and chloroform-resistant arbovirus from Japan. *Americ. J. Trop. Med. Hyg.*, **71**, 120-128 (1968)

Summary

Nodamura virus is an unusual arthropod-borne orphan virus isolated from Japanese mosquitoes, because it was capable of multiplication in arthropods, and of being multiplied biologically by mosquitoes, but unlike other arbovirus, its infectivity is not inactivated by diethylether and chloroform.

From such characteristics as being arthropod-borne and developing paralysis of hind limb in the susceptible suckling mice, this virus was once suspected to be a causal agent of Akabane disease: epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome of cattle breaking out during 1972-1974 in Japan.

When Akabane virus was established as a causal agent of the disease, Nodamura virus still remains as an orphan virus.

However, it is important to pay attention on such a interesting arthropod-borne virus if we are reminded of Akabane disease story.

This paper deals with some attempts to show the methods for serological diagnosis or survey of Nodamura virus concerning the possible prevalence of the disease caused by Nodamura virus.

Complement fixation test and gel precipitation test with variable antigen preparations made directly from the infected mouse limb emulsion were tested under different conditions and the following results were obtained.

1) Optimum condition for CFT were ascertained to be tested by small amount method, using 4 units of antigen, 2 units of complement and hemolysin system consisting of 3 units

of hemolysin and equal amount of 2.5% sheep red cell. Optimum sensitization of the reacting system was to be kept at 4°C for 18 hours.

2) Indirect complement fixation test was available for bovine serum, under the condition of 2 units of antigen and 2 units of indicating mouse serum.

3) Centrifuged supernate of the tissue and the Daiflon treated emulsion supernate were supposed to be the most sensitive antigens for both CFT and GPT. Especially partially purified Daiflon treated antigen would be looked upon as an adequate antigen for practical survey of animals.

4) The complement fixing antigen of Nodamura virus consisted of two fractions such as heat stable and heat labile ones which were to be divided by being heated at 70°C for 30 minutes.

5) As for developing of antibodies, CF-antibody was detectable in the second week and later after inoculation, while GP-antibody was to be detected in the first week, and none of CF-antibody activity was noted to be in IgM fraction.

6) None of the positive serum was demonstrated from the 911 serum samples taken out of variable animals in southern Kyushu area.