

イヌアデノウイルスのブラック形成能

望月雅美・盛満 稔*・佐藤平二

(家畜微生物学教室)

昭和58年8月9日 受理

Plaques Formed by Canine Adenovirus Serotypes in MDCK Cell Culture

Masami MOCHIZUKI, Minoru MORIMITSU* and Heiji SATO

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

緒 言

イヌの著明なウイルス性疾患として、狂犬病、ジステンパー、およびイヌ伝染性肝炎 (ICH) があげられる。後二疾病は依然、臨床上認められるものの、有効なワクチンの開発・汎用とともに、古典的なものとなりつつある。一方、他家畜の場合と同様に、幼獣の下痢症や呼吸器疾患が主要なウイルス病となってきており、その例が、イヌパルボウイルス感染症であり、“Kennel Cough” と称される症候群である。

イヌアデノウイルス (CAV) には、主として血球凝集阻止試験にて区別される CAV-1 と CAV-2 の2血清型がある¹⁵⁾。CAV-1 は ICH の病原ウイルスであり、CAV-2 は “Kennel Cough” 症候群の病因子の1つであり⁵⁾、Toronto A26/61 株で代表される⁸⁾。両ウイルス間の病原性の比較研究や、交差防御試験を含めた血清学的研究は、より安全・有効なワクチン開発のため数多く実施されているが^{3,4,6,7,9,10,15,16,19)}、その生物学的・物理化学的性状に焦点をあてた研究は少ない^{1,12,20)}。著者らは、CAV-1 と CAV-2 の生物学的性状を検討中、両血清型ウイルスのブラック形成能に極めて特徴的な相違を認めたので、その成績を報告する。

材料と方法

1. ウイルス

CAV-1 は、東京大学農学部家畜微生物学教室より分与された D43 株を、CAV-2 は、京都微生物化学研

本研究の概要は著者の一人、盛満 稔の修士論文の一部である。

* 現在、鹿児島県大口食肉衛生検査所 Kagoshima Prefectural Ōkuchi Meat Inspectional Center

究所より分与された OD-N 株¹⁷⁾ を用いた。両株とも正常イヌ初代、または2代目腎 (DK) 細胞にて培養し、2,000 rpm, 20 分間の遠心操作後、上清をブラック形成能検査用抗原とした。

2. 細胞培養

ウイルス抗原作成用の DK 細胞は、健康仔イヌより、トリプシン消化による常法に従って準備した。

ブラック法には、東京大学農学部家畜微生物学教室より分与された、イヌ腎細胞系である、Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いた。

DK 細胞には、仔牛血清 (CS) と 5% ラクトアルブミン水解物を 10% に添加した Hanks 液を、MDCK 細胞には CS とトリプトスリン酸ブロス液を 10% に添加した Dulbecco's modified Eagle's MEM 液を用いた。必要に応じ、両培地には、ペニシリン (50 IU/ml)、ストレプトマイシン (50 µg/ml) を添加した。

3. ブラック法

上記 MEM 増殖用培地に、HEPES (25 mM/ml) とアンフォテリシン B (2.5 µg/ml) を添加した開放系培地 (HEPES-MEM) を用いて、径 60 mm プラスチックプレートに MDCK 細胞を単層培養しウイルス接種を行った。

細胞表面を Hanks 液で洗浄後、2% に CS を含む HEPES-MEM で 10 倍階段希釈したウイルス液を 0.2 ml 接種した。37°C, 1 時間の吸着操作の後、未吸着ウイルスを Hanks 液にて洗浄除去後、HEPES-MEM に CS を 2%、アガロースを 1% に添加した重層培地を 5 ml 加えて、37°C で培養を開始した。必要に応じ、ウイルス接種後 5 日、10 日目に、二次および三次重層培地を各々 2 ml ずつ添加した。

ブラック観察は、0.5% クリスタルバイオレット・10% フォルマリン液にて固定・染色後、実施した。

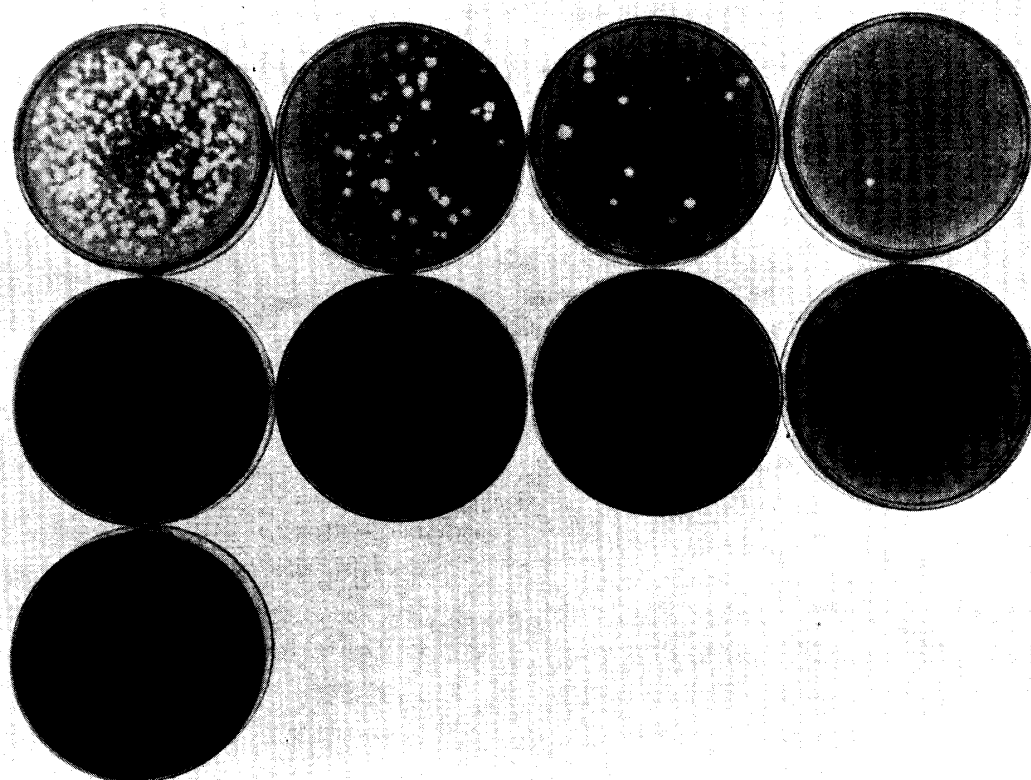


Fig. 1. Plaques of canine adenoviruses (CAV) in MDCK cell culture. Upper and middle rows show plaques of CAV-1, D43 strain and CAV-2, OD-N strain, respectively. From left to right of both rows, the dishes were inoculated with 0.2 ml of a 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} dilution of each virus. A bottom dish is uninfected cell culture control.

結 果 考 察

1. CAV-1, D43 株のプラック性状

D43 株は著明な CPE を伴って増殖したが、ウイルス接種後 7 日前後では明瞭なプラックは形成されなかった。接種後 12 日目以後には容易に認められるようになり、15 日目頃には Fig. 1 に示したごとく、大小不同 (直径 0.5~3 mm)、辺縁不整のプラックが観察された。

2. CAV-2, OD-N 株のプラック性状

OD-N 株の MDCK 細胞での増殖は、D43 株に比較すると悪く、CPE も弱・不明瞭であった。プラック出現態度は D43 株と類似しており、接種後 16 日目頃に、Fig. 1 に示したごとく、大小不同で、ウイルス感染病巣が抜けきらない、不鮮明・濃染性の「プラック」が観察された。

OD-N 株の「プラック」も不鮮明とはいえ、定量に用いることは可能であり、両株とも、CPE を指標とした 50% 組織培養感染価に比較し、約 3~12 倍高いプラック形成単位を示した。

1962 年、カナダで、喉頭気管炎を呈している犬より、イヌアデノウイルスが分離され、このウイルス (Toronto A26/61 株) がそれまで知られていた ICH (Rubarth's disease¹³⁾) ウイルスと血清学的に異なることが報告された^{8,15)}。その後、CAV-2 は肝炎を伴う症例には認められないこと、ICHV と同じ血清型のウイルス (CAV-1) が自然発生の気道疾患例からも分離され、実験的にも、CAV-1 をエーロゾル感染させると気道疾患が、静脈内接種すると ICH 病型が誘導されることが判明した¹⁹⁾。そして実験的に、CAV-1 は主として網内細胞や血管内皮細胞に親和性を有しているため、肝・腎・リンパ組織などを主に侵襲するが、感染経路によっては気道疾患もおこしうる。一方、CAV-2 は気道上皮細胞に対して親和性を有しているため“Kennel Cough”症候群の病因の 1 つとなると理解されている^{3,6,7,16)}。

ウイルス性疾患の臨床病型は、初期ウイルス感染の後、種々の要因、例えば、二次細菌感染、宿主の免疫

反応などの影響を受けて、複雑あるいは特徴的な様相を呈する場合が多いが、基本的には、ウイルス表在抗原と、それに特異的に結合する細胞側レセプターの有無による組み合わせに因る。すなわち、宿主細胞が特異的レセプターを有していなければ、ウイルスの標的細胞・器官とはならず、感染は成立しない。また、ウイルスの侵入は許容するものの、ウイルス遺伝子の完全な発現がおこらず、増殖が途中で停止したり、一部遺伝子のみの発現などにより、宿主細胞性状が変換する場合もある。

MDCK 細胞は CAV-1 (D43 株) と CAV-2 (OD-N 株) に対するレセプターを有し、両ウイルスとも増殖可能であった。本研究で観察された両ウイルスのプラック性状の著しい相違は何に由来するのか正確に説明し得ないが、1つの可能性として、D43 株と比較して OD-N 株の CPE 発現が遅く、かつ不明瞭なことから、さらに感染病巣が完全に壁より離脱しないことから、OD-N 株は D43 株と同程度に MDCK 細胞に感染・増殖し、隣接細胞へと感染が広まる。一般にアデノウイルスの場合、子ウイルス合成・放出に長時間を要するが²⁰⁾、OD-N 株の場合は、未感染隣接細胞の世代時間と拮抗する程度に長いため、脱落細胞空隙を健康細胞にて補充されやすく、固定染色後、検出される病巣は、大部分のウイルス感染死細胞と一部分の健康細胞の混合集団であり、プラックとして抜けきらないと考えられる。一方で、MDCK 細胞はイヌ腎由来の細胞系であるが、継代が進んでいる現在、既に腎由来細胞の特性を失った全く別種の細胞集団と考える方が適当であるが、*in vivo* で考えられている両血清型ウイルスの細胞親和性や、標的細胞としての違いを反映している可能性もある。

数多いイヌアデノウイルスに関する研究の中で、プラック性状やプラック法を用いた報告は極めて少なく^{11,18)}、現時点では比較・検討できない。

著者らの研究の目的は、総合的な“Kennel Cough”の病因・発病機構の解明にある。本邦でも研究体制が整うにつれ、徐々にその病原ウイルスが検出されつつあり、その実体も理解されはじめた^{2,14,17)}。本実験では僅か2株しか用いられなかったが、初めて明らかにされた CAV-1 と CAV-2 のプラック形成能の差は、極めて有力な指標になり得ると考えられる。今後、多数の両血清型ウイルス株を用いて、本研究結果の普遍性の検討、および、同一血清型内に観られた大小のプラック形成を示すウイルスの有する生物学的意味の解明は必要であり、その過程で、イヌアデノウイルス感

染症の診断・予防衛生に有意義な知見が得られるものとする。

要 約

イヌ伝染性肝炎の病原ウイルスであるイヌアデノウイルス1型 (CAV-1) と“Kennel Cough”の病原体の1つであるイヌアデノウイルス2型 (CAV-2) の生物学的性状を比較研究中、両血清型ウイルスのプラック形成能に顕著な差を認めた。

イヌ腎細胞系である MDCK 細胞培養で、CAV-1 である D43 株は大小不同 (径 0.5~3 mm)、辺縁不整の典型的なプラックを形成したが、CAV-2 である OD-N 株は、ウイルス感染病巣が、固定染色後、抜けきらない、濃染性の「プラック」を形成した。

プラック法によるウイルス力価測定法は、従来の 50% 組織培養感染価測定法より鋭敏で、両血清型ウイルス間に認められたプラック形状の相違とともに、今後のイヌアデノウイルス感染症の研究上、極めて有用と考えられる。

謝辞 本研究に用いた D43 株、MDCK 細胞を分与下さいました東京大学農学部、小西信一郎教授、OD-N 株を分与下さいました京都微生物化学研究所、安食政幸博士に謝意を表します。

文 献

- 1) Adair, B.M.: Differences in cytopathology between canine adenovirus serotypes. *Br. Vet. J.*, **135**, 328-330 (1979)
- 2) Ajiki, M., Hiramatsu, M., Nakai, M., Sasaki, N., and Konishi, S.: Isolation and characterization of parainfluenza 5 virus from a dog. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **44**, 607-617 (1982)
- 3) Appel, M., Bistner, S.I., Menegus, M., Albert, D.A., and Carmichael, L.E.: Pathogenicity of low-virulence strains of two canine adenovirus types. *Amer. J. Vet. Res.*, **34**, 543-550 (1973)
- 4) Appel, M., Carmichael, L.E., and Robson, D.S.: Canine adenovirus type-2-induced immunity to two canine adenoviruses in pups with maternal antibody. *Amer. J. Vet. Res.*, **36**, 1199-1202 (1975)
- 5) Appel, M., Pickerill, P.H., Menegus, M., Percy, D.H., Parsonson, I.M., and Sheffy, B.: Current status of canine respiratory disease. 20th Gaines Veterinary Symposium, Manhattan, Kan., 15-23 (1970)
- 6) Bass, E.P., Gill, M.A., and Beckenhauer, W.H.: Evaluation of a canine adenovirus

- type 2 strain as a replacement for infectious canine hepatitis vaccine. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **177**, 234-242 (1980)
- 7) Cornwell, H.J.C., Koptopoulos, G., Thompson, H., McCandlish, I.A.P., and Wright, N.G.: Immunity to canine adenovirus respiratory disease: A comparison of attenuated CAV-1 and CAV-2 vaccines. *Vet. Rec.*, **110**, 27-32 (1982)
 - 8) Ditchfield, J., Macpherson, L.M., and Zbitnew Audrey: Association of a canine adenovirus (Toronto A26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("Kennel cough"). A preliminary report. *Can. Vet. J.*, **3**, 238-247 (1962)
 - 9) Emery, J.B., House, J.A., and Brown, W.R.: Cross-protective immunity to canine adenovirus type 2 by canine adenovirus type 1 vaccination. *Amer. J. Vet. Res.*, **39**, 1778-1783 (1978)
 - 10) Fairchild, G.A., Medway, W., and Cohen, D.: A study of the pathogenicity of a canine adenovirus (Toronto A26/61) for dogs. *Amer. J. Vet. Res.*, **30**, 1187-1193 (1969)
 - 11) Levine, S., Cabasso, V.J., Avampato, J.M., and Stebbins, M.R.: Plaque formation by infectious canine hepatitis (ICH) virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **100**, 600-602 (1959)
 - 12) Marusyk, R.G., Norrby, E., and Lundqvist Ulla: Biophysical comparison of two canine adenoviruses. *J. Virol.*, **5**, 507-512 (1970)
 - 13) Rubarth, S.: An acute virus disease with liver lesion in dogs (Hepatitis Contagiosa Canis). A pathologico-anatomical and etiological investigation. *Acta path. et microbiol. scand.*, **69**, 1-222 (1947)
 - 14) Shirota, K., Azetaka, M., and Fujiwara, K.: A case of canine respiratory adenovirus infection associated with distemper. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **42**, 265-270 (1980)
 - 15) Swango, L.J., Eddy, G.A., and Binn, L.N.: Serologic comparisons of infectious canine hepatitis and Toronto A26/61 canine adenoviruses. *Amer. J. Vet. Res.*, **30**, 1381-1387 (1969)
 - 16) Swango, L.J., Wooding, W.L., Jr., and Binn, L.N.: A comparison of the pathogenesis and antigenicity of infectious canine hepatitis virus and the A26/61 virus strain (Toronto). *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **156**, 1687-1696 (1970)
 - 17) Takamura, K., Ajiki, M., Hiramatsu, K., Takemitsu, S., Nakai, M., and Sasaki, N.: Isolation and properties of adenovirus from canine respiratory tract. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **44**, 355-357 (1982)
 - 18) Wooley, R.E., Brown, J., Scott, T.A., Lukert, P.D., and Crowell, W.A.: Effect of polyinosinic-polycytidylic acid in dogs experimentally infected with infectious canine hepatitis virus. *Amer. J. Vet. Res.*, **35**, 1217-1219 (1974)
 - 19) Wright, N.G., Cornwell, H.J.C., Thompson, H., Armitago Aileen, and Morrison, I.: Canine adenovirus respiratory disease: Isolation of infectious canine hepatitis virus from natural cases and the experimental production of the disease. *Vet. Rec.*, **90**, 411-416 (1972)
 - 20) Yamamoto, T.: Some physical and growth characteristics of a canine adenovirus isolated from dogs with laryngotracheitis. *Can. J. Microbiol.*, **12**, 303-311 (1966)

Summary

While an investigation was being carried out both on canine adenoviruses, *i.e.*, infectious canine hepatitis virus (CAV-1) and canine adenovirus type 2 (CAV-2; one of the casual agents of "Kennel Cough" syndrome), some significant difference came to be observed in the characteristics of plaques formed in MDCK cell cultures.

After staining with 0.5% crystal violet, D43 strain of CAV-1 formed typical plaques which were various in sizes (0.5-3 mm), showing irregular margins. On the other hand, OD-N strain of CAV-2 formed "plaque" similar to D43 strain both in size and in shape, though these were opaque and darkly stained.

It was assumed that the plaque assay which was more sensitive than the median tissue culture infective dose calculation by the limiting dilution method and the difference in the plaque characteristics ascertained in the present study, might be of some use for the further studies of canine adenovirus infections.