逆受身赤血球凝集反応による犬パルボウイルスの犬糞便からの検出

水越紀子* 桐沢力雄* 小沼 操* 川上善三*

(昭和 60 年 9 月 20 日受理)

Detection of Canine Parvovirus in Feces by the Reversed Passive Hemagglutination Test
NORIKO MIZUKOSHI et al. (Department of Veterinary Microbiology, The College
of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069)

SUMMARY

The reversed passive hemagglutination (RPHA) test was carried out for detection of canine parvovirus (CPV) in fecal specimens from dogs experimentally and naturally infected with CPV. Glutaraldehyde- and tannic acid-treated sheep red blood cells were sensitized with anti-CPV rabbit serum purified by affinity chromatography. The following results were obtained.

1) In experimentally infected animals, the RPHA positive reaction was observed in the feces, and the titer increased with developing clinical signs of the disease. CPV was isolated from these fecal specimens by inoculation of materials to culture cells.

2) In naturally infected animals, all the fecal specimens with a hemagglutination (HA) titer over 1:32 were positive for the RPHA test.

3) The specificity of the RPHA test was confirmed by using sheep red blood cells sensitized with CPV-negative serum, instead of positive serum.

From these results, the RPHA test was considered to be a useful diagnostic method for CPV infection because of its specificity, sensitivity and rapidity.

要 約

犬パルボウイルス (CPV) 実験感染犬および野外自然感染犬の糞より CPV を検出する目的で、逆受身赤血球凝集 (RPHA) 反応の応用を検討した。アフィニティークロマトグラフィーにより精製した抗 CPV 家兎血清を感作したグルタルアルデヒド、タンニン酸処理羊赤血球を用いて本反応を実施し、以下の結果を得た。

1) 実験感染例では臨床症状の発現とともに、発症犬の糞中の RPHA 価および赤血球凝集 (HA) 価は並行して上昇した。これらの糞からは、猫肺株化細胞 (FLF-3) 接種により CPV が分離された。

2) 野外例での HA 価 1:32 以上の糞は、すべて RPHA 価も陽性であった。

3) 対照として、CPV 陰性家兎血清を感作した羊赤血球を用いた RPHA 法を実施することにより本法の特異性が確認された。

以上のことから RPHA 法は CPV 感染を簡易に診断できる特異性の高い方法であることが示唆された。

犬パルボウイルス (CPV) の感染を受けた犬は糞中に多量のウイルスを排泄することが報告されている²⁾。いっぽう、本ウイルスは豚および猿の血球を凝集するため、犬における CPV の診断には一般に犬の糞中のウイルスを赤血球凝集 (HA) により検出する方法³⁾が用いられている。しかし、CPV の臨床症状がみられない犬の糞にも豚血球の HA を示す⁷⁾ものもみられ、その糞からウイ

ルス分離を試みても CPV は分離されず、他のウイルスが検出される⁴⁾場合もある。それゆえ CPV を診断するには、糞中に検出された HA 活性が抗 CPV 血清により特異的に阻止されることを確認しなければならない。

本報告では糞中に排泄される CPV の検出を迅速かつ確実にする目的で、タンニン酸処理羊血球の表面に CPV 特異抗体を感作して行う逆受身赤血球凝集 (RPHA) 反応について検討した。

* 酪農学園大学酪農学部 (北海道江別市文京台緑町 582-1)

1. 材料および方法

1) ウイルス

野外発症例の犬の糞から北嶋ら⁹⁾が猫肺株化細胞 (FLF-3) で分離した CPV を用いた。

2) 細胞と培養液

CPV の分離、抗原の作製には FLF-3 細胞を用いた。細胞増殖培養液として、ペニシリン 200 単位/ml, ストレプトマイシン 200 μ g/ml, カナマイシン 200 μ g/ml, アムホテリシン B 1.5 μ g/ml, 7.5% 炭酸水素ナトリウムを 1%, および牛胎児血清 (FCS) を 4% に含むダルベッコ変法イーグル MEM を用いた。ウイルス接種後の維持培養液としては上記の増殖用培養液の FCS を 3% に減少したものを使用した。

3) 糞の採取と処理

糞希釈用液は、蒸留水 1l 当たり、イーグル MEM 7.52 g, グルタミン 0.24 g, トリプトースフォスフェイトブロス 2.95 g, グルタミン酸ソーダ 5 g, イーストエキストラクト 0.5 g, グルコース 1 g, 牛アルブミン 1 g, および抗生物質を細胞増殖用培養液の 10 倍量含む液を用いた。糞を希釈用液で 10% 乳剤に調整し、それを 4℃ 15 分間放置後、2,500 rpm 10 分間遠心した。ウイルス分離にはこの上清を 10,000 rpm 5 分間遠心し、さらに 0.45 μ m のフィルターをとおしたものを用いた。RPHA, HA 両反応には上清に 10% 量のクロロホルムを加え、4℃ に 15 分放置後 2,500 rpm 10 分間遠心した上清を用いた。

4) HA, 赤血球凝集抑制 (HI) 反应用豚赤血球の処理

アルセバ液を用いて採取した豚赤血球を pH 7.2 のリン酸緩衝食塩液 (PBS) で洗浄して 10% 血球浮遊液を作製した。これに 1% グルタルアルデヒド加 PBS を 10% の割合に加え、スターラーで攪拌しながら 4℃ 40 分固定した。これを再び洗浄して PBS で 10% に浮遊させ使用時まで保存した。

5) 被検血清の処理

血清は 56℃ 30 分非働化したのち、AZETAKA ら¹⁰⁾に従い血清 1 容に pH 7.0 の PBS 3 容, 25% カオリン 4 容を加え、室温に 2 時間置いた後遠心して上清を分離した。この上清にさらに豚血球 1 容を加え、4℃ に一夜放置後、再度遠心し、その上清を HA および RPHA 反応に用いた。

6) CPV 抗血清と対照血清

家兎の静脈内および腹腔内にそれぞれ 2 ml ずつ 3 回ウイルスを接種した。最後の免疫から 9 日目に抗体の上昇したことを確認してから採血し血清を得た。なお、対照として未接種の健康家兎より対照血清を採取した。それぞれの血清は 56℃ 30 分非働化したのち -20℃ に保存した。

7) アフィニティークロマトグラフィーによる CPV 抗体の精製

CPV 抗体の精製は、SATO ら¹¹⁾の方法に従ってアフィニティークロマトグラフィー法で行った。シアノジェンブロマイド活性化セファロース 4B の 3 g に精製 CPV (蛋白量 100 μ g/ml) を 10 ml 反応させて得た CPV 結合セファロース 4B に DEAE セルロースで精製した抗 CPV 家兎血清のグロブリン分画 10 ml を反応させた。反応後、結合抗体は 3 M のチオシアン酸カリウム液で溶出した。対照として CPV 未接種の健康家兎よりグロブリン分画を得た。健康家兎血清中にも CPV と反応する抗体が検出される例が認められたため、グロブリン分画を CPV 結合セファロース 4B にとし、CPV 抗体を除去し CPV とは反応しなくなったものを対照抗体として用いた。

8) グルタルアルデヒド、タンニン酸処理羊血球液の作製

10% 羊血球浮遊液 1 容と 1% グルタルアルデヒド加 PBS 1 容を 37℃ 20 時間反応させた後、蒸留水で 4 回洗浄して 10% 浮遊液を作製した。その浮遊液に等量の 50 μ g/ml のタンニン酸を加え、37℃ 15 分間反応させた。反応後再び蒸留水で 5 回洗浄し、PBS で 10% 浮遊液として使用した⁹⁾。

9) RPHA 法

アフィニティークロマトグラフィーで精製した CPV 抗体 80 μ g/ml を等量のグルタルアルデヒド、タンニン酸固定 10% 羊血球に加え、37℃ 1 時間攪拌し反応させた。その後 1,000 rpm 5 分遠心し、沈殿に 0.1% ゼラチン加 PBS を加え⁹⁾、37℃ で 15 分間反応させた。再び遠心をし、沈殿を 0.01% ゼラチン加 PBS に 1% となるように浮遊させ感作血球を作製した。なお、抗体感作量に関しては、0 μ g/ml~100 μ g/ml の範囲について検討したところ、50~90 μ g/ml が最適であり 80 μ g/ml を実験に使用した。

RPHA 反応はマイクロプレート法で行った。処理糞を 0.01% ゼラチン加 PBS で 2 倍階段希釈し、それに抗体を感作した血球を等量加え室温に 90 分放置し凝集の有無で判定した。

RPHA 反応を行うに当たり、CPV 抗体感作血球を用いた RPHA (P-RPHA) 反応および対照として対照抗体を感作した血球を用いた RPHA (N-RPHA) 反応を行った。

10) HA および HI 試験

反応はマイクロプレート法により行った。血球は 0.5% 浮遊液を、CPV 抗原は 4 単位を用いた。反応後プレートを 4℃ に 4 時間置いて対照血球が完全に沈降したことを確認して判定した。

11) ウィルス分離

FLF-3 細胞を用い, 細胞培養開始後 50% 単層が形成された⁹⁾ とき糞乳剤を 0.2 ml 接種, 3 日間培養, その上清の HA が 1:128 以上のものをウィルス分離陽性とした. その他のものについては 3 代継代し, HA がないことを確かめて分離陰性とした.

12) 感染実験

実験には臨床上異常がなく, HI 抗体価 1:80 以下の生後 4 週～8 週齢の子犬を用いた. CPV の存在が確かめられた糞材料を 2 ml 子犬に経口投与した. 臨床症状の観察は朝夕 2 回行い, 糞は 1 日 1 回採取した. 採取した糞はただちに希釈用液に浮遊し, 試験まで -80℃ に保存した.

2. 成績

1) 実験感染犬の RPHA 価

ウィルスを接種した子犬は全例, 元気消失, 食欲不振, 下痢, 嘔吐などの臨床症状を示した. うち重症の 3 頭は死亡し, 軽度の 3 頭は回復した.

図 1 に死亡した 3 頭の成績を示した. P-RPHA 価はウィルス接種後 1～2 日の潜伏期のうち臨床症状の出現に並行して上昇し, 重度の症状がみられた時, すなわち接種後 3～4 日にかけて 1,024 倍～4,096 倍に達した. 1 頭は P-RPHA 価が最高に達したとき死亡し, 他の 2 頭では最高値を示した 2 日後に P-RPHA の急激な下降がみられ, この時 2 頭は死亡した. P-RPHA 価が高く維持されている期間, ウィルスは分離陽性であった.

図 2 には回復した 3 頭の成績を示した. P-RPHA 価はウィルス接種後 2～3 日に上昇しはじめ, 3～5 日間持続した. 回復例では RPHA 価の出現, ウィルス分離および HA 価の出現は臨床症状に 1～3 日先行してみられ, RPHA 価および HA 価の出現期間も 1～3 日長い傾向があった.

P-RPHA 反応の特異性を確かめるのに, 対照として健康家兎の血清を感作した血球を用いる N-RPHA 反応を行った. 結果は図 1 および 2 に示すようにほとんどの例で RPHA 価が認められたが, いずれも 0～16 倍と低い値にとどまった.

2) 実験感染犬の HI 抗体価の推移

表 1 に実験感染した 6 頭の HI 抗体価の推移を示した. 死亡例では抗体価の上昇は認められなかったが, 回復例では全例, 620 倍～1,280 倍に達する高い抗体の上昇があり, CPV 感染があったことが確認された.

3) 野外例の RPHA 価

野外より採取した糞 31 例について行った RPHA と HA の結果を表 2 に示した. HA 価が 8 倍以下の 15 例ではその P-RPHA 価はすべて 2 倍未満であった. HA 価 32 倍以上の糞では P-RPHA 価はすべて 16 倍以上

表 1 犬パルボウィルス実験感染犬における HI 抗体価の推移

		HI 抗 体 価					
犬 No.	ウイルス 接 種 前	ウイルス接種後の日数					
		3	5-6	9	14	21	28
死亡例							
1	20*	20(5日)**					
2	20	20(5日)					
3	20	20(4日)					
回復例							
4	40	NT***	80	640	640	640	320
5	10	NT	NT	640	640	160	320
6	20	NT	640	1,280	1,280	320	160

注) *: HI 価 **: 死亡した日 ***: 試験せず

表 2 RPHA および HA による野外犬の糞からの犬パルボウィルス検出

HA 価	RPHA 価*		ウィルス 分離	検査頭数
	P-RPHA	N-RPHA		
<2	<2	<2	NT	7
2	<2	<2	NT	3
4	<2	<2	NT	3
8	<2	<2	NT	2
32	16	4	+	1
64	32	<2	-	1
128	64	<2	-	1
256	64	<2	+	1
	128	4	NT	1
	512	<2	NT	1
512	64	<2	NT	1
2,048	128	<2	-	1
	128	<2	NT	1
	256	<2	+	1
	256	16	+	1
4,096	1,024	2	NT	1
	1,024	4	NT	1
16,384	1,024	<2	NT	1
	2,048	<2	NT	1
32,768	4,096	<2	NT	1

注) *: RPHA は羊赤血球表面に犬パルボウィルス特異抗体 (P-RPHA) および対照抗体 (N-RPHA) を感作して行った

で両者の値は比例していた. 対照として調べた N-RPHA 価は高く 16 倍であり, その多くは陰性であった.

4) 実験感染例および野外例の RPHA 価と HA 価の関係

HA が陽性であった糞について P-RPHA 価と HA 価の相関関係を調べた. その結果は図 3 に示したように, 実験感染例は相関係数 $r=0.95$, 野外例では $r=0.97$ でそれぞれの間には高い相関が認められた.

3. 考 察

CPV に感染した犬は糞中に多量の ウィルス を排泄するので、そのウィルスを簡明に検出して診断する目的で RPHA 法の応用を試みた。その方法は SATO ら⁸⁾が牛のコロナウィルスの検出に用いたものに準じた。SATO ら⁸⁾

は $10^{8.5}$ TCID₅₀/0.1 ml のウィルスについては 128 倍、糞では 2 倍～8 倍の RPHA 価をそれぞれ得ているが、これに対し著者らの実験では HA 価 4,096 倍～8,192 倍の糞で RPHA 値 4,096 倍という HA 価に近い値を得た。これは SATO ら⁸⁾の場合には、コロナウィルスであるため糞を赤血球に吸着して糞中の非特異物質を除去し

図1 犬パルボウイルス実験感染犬における臨床症状の発現と HA, RPHA および細胞接種によるウィルス検出の比較 (死亡例)

図2 犬パルボウイルス実験感染犬における臨床症状の発現と HA, RPHA および細胞接種によるウィルス検出の比較 (回復例)

図3 犬パルボウイルス実験感染犬および野外犬の糞における RPHA 価と HA 価の関係

たのに対し, 著者らの場合は, パルボウイルスであるのでクロホルム処理を行ったということの差によるものであろう。

特異性を確かめるために N-RPHA を試みたところ, 少数例に非特異反応が認められた。成績は述べなかったが, この糞中の非特異物質は, 糞を 10,000 rpm 5分遠心し, 0.45 μ m のフィルターをとおしたのちゼラチン処理血球で数回吸収すると完全に除去できることが判明した。しかし同時に P-RPHA の反応性の低下も認められた。それゆえこの非特異物質の除去には他の方法の検討も必要であろう。

HA で反応がみられた糞について P-RPHA 価と HA 価との相関係数を求めたところ, 実験感染例 $r=0.95$, 野外例 $r=0.97$ で両者に高い相関がみられた。RPHA 法は HA 法と同程度に感度が高く, しかも特異性の面でも保証された CPV 検出法であることは明らかである。

SATO ら⁸⁾が牛のコロナウイルスで, 實方⁹⁾が人のロタウイルスで行った RPHA 法は, N-RPHA を併用していないため特異性に問題を残している。そのため實方⁹⁾は P-RPHA が特異抗体により抑制される事実を確認している。ところが著者らの方法は, P-RPHA 反応と N-RPHA 反応を併用しているため改めて特異性の面から検討することなく CPV の診断が行えるものといえ

よう。

CPV 感染犬の糞中には実験例にみられるように, 多量のウイルスが排泄されるため, RPHA 法は CPV の診断に野外で応用しても有用な方法であると考えられる。

引用文献

- 1) AZETAKA, M., HIRASAWA, T., KONISHI, S., et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 43, 243~245 (1981).
- 2) BURTONBOY, G., COIGEUL, F., DELFERRIERE, N., et al.: *Arch. Virol.*, 61, 1~11 (1971).
- 3) CARMICHAEL, L. E., JOUBERT, J. C. and POLLOCK, R. V. H.: *Am. J. Vet. Res.*, 41, 784~791 (1980).
- 4) CARMICHAEL, L. E., JOUBERT, J. C. and POLLOCK, R. V. H.: *Cornell Vet.*, 71, 408~427 (1981).
- 5) HERBERT, W. J.: Chap. 20. In *Immunochemistry*, WEIR, D. M. editor, 1~20, Alden Press, Oxford (1967).
- 6) 實方 剛, 吉田芳哉, 斎藤 譲, ほか: 医学のあゆみ, 109, 319~321 (1979).
- 7) 北嶋豊治, 比留間俊美, 桐沢力雄, ほか: 北獣会誌, 29, 254~258 (1985).
- 8) SATO, K., INABA, Y., TOKUHISA, S., et al.: *Arch. Virol.*, 80, 23~31 (1984).
- 9) SIEGEL, G. and KRONAUER, G.: *J. Gen. Virol.*, 46, 211~218 (1980).