

## 10 CSF 抗体検査の非働化条件の検討

○竹内 美穂

### 要約

豚熱ウイルス (CSFV) の血清抗体検査では、56℃、30 分間の非働化処理を実施するが、本条件では CSFV は完全に不活化しないと報告されており、検査室等の汚染が危惧される。汚染リスクを低減する条件検索のため、CSFV ワクチン株を用いたウイルス力価測定、抗体陽性血清を用いた中和試験及び ELISA 検査を実施した。56℃から 75℃の各温度設定の 30 分間処理では、75℃でウイルス力価が最も低下したが、65℃以上で抗体検査に影響が認められた。56℃、60℃、65℃のそれぞれについて、60 分から 180 分間までの時間設定で処理すると、全温度で時間の経過とともにウイルス力価は低下した。56℃では 180 分間加温してもウイルスは残存した。また、56℃及び 60℃では長時間の処理でも抗体検査に影響はなかった。さらに、75℃から 100℃の高温で、数十秒から数分間処理の短時間の加温でも抗体検査に影響が認められた。紫外線 (UV) を 60 分間照射した後に非働化処理を実施する条件では、ウイルス力価が検出限界以下に低下し、抗体検査結果にも影響は認められなかった。本条件について、容器の材質と形状の違いによる影響を確認したところ、ポリプロピレン製 (PP) の容器では、容器の形状による影響は認められなかった。以上より、PP 容器を用い 60 分間 UV 照射後に非働化する条件が最適と決定した。多検体を用いた確認試験でも、通常の非働化条件と同様の結果が得られ、ウイルス汚染リスク低減の可能性が示唆された。

豚熱 (CSF) は、RNA 型ウイルスのフラビウイルス科ペスチウイルス属のペスチウイルス C、豚熱ウイルス (CSFV) によって引き起こされる豚といのししの重大な家畜伝染病の一つである。CSFV は抗原的に単一だが、甚急性、急性、亜急性、慢性、遅発性といった様々な病態をおこし、ウイルス血症の期間も一定ではないことが報告されている<sup>1)2)</sup>。

家畜保健衛生所で実施する CSF 検査のうち、ELISA 検査は一般的な検査室で行われることが多い。また、検査前の事前処理として、血清中の補体成分を失活させる目的で 56℃・30 分間加温する「非働化」という処理を実施する。一方、CSFV に感染した豚やいのししの血液中には多量のウイルスが含まれているが、血液中の CSFV の完全な不活化には 68℃で 30 分間の加熱が必要であるとの報告<sup>3)</sup>がある。そのため、非働化処理では血清中の CSFV は死滅しない可能性が危惧された。当所において、CSFV ワクチン株

(GPE-株) を用いて、非働化と同様の処理を施した後にウイルス力価を測定したところ、50% 組織培養感染量 (TCID<sub>50</sub>/100 μL) は、10<sup>6.25</sup> TCID<sub>50</sub>/100 μL から 10<sup>5.25</sup> TCID<sub>50</sub>/100 μL と、わずか 10 分の 1 しか低下しなかった (図 1)。

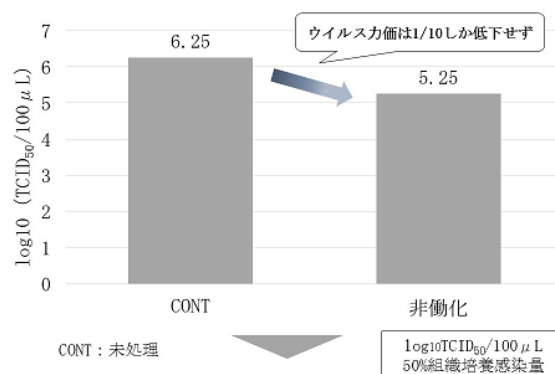


図 1 CSFV の非働化による影響

ELISA 検査は、血清の非働化、血清の希釈、添加、反応及び洗浄という行程で進行するが、血清中に 10<sup>6.25</sup> TCID<sub>50</sub>/100 μL のウイルスが含まれている場合、プレートに添加する時点で 10<sup>2.85</sup>

TCID<sub>50</sub>/100 μL のウイルスで汚染されている可能性がある。ELISA 洗浄時には、実験台への検体や洗浄液の飛散が認められるという八町ら<sup>4)</sup>の報告があることから、ウイルスによる実験台等への汚染が危惧された(図2)。このようなウイルス汚染の危険性を排除するため、様々な条件で試験を行い、汚染リスクを低減する方法について検討を行った。

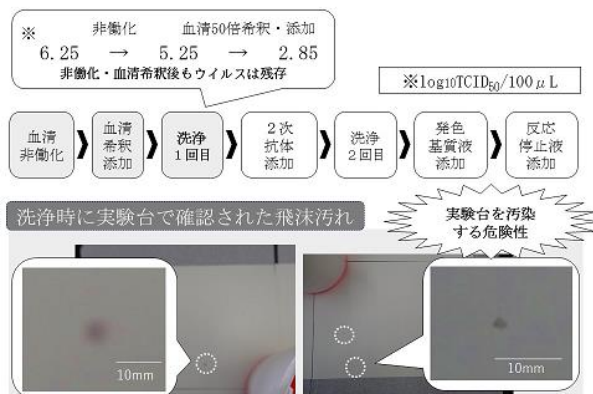


図2 ELISA検査の行程と洗浄時の実験台への汚染

## 材料及び試験方法

### 材料：

- 1 条件検討試験：ウイルスはCSFVのワクチン株であるGPE株を使用した。CPK-NS細胞を用いて測定したCSFVの50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>/100 μL)は、10<sup>6.25</sup>TCID<sub>50</sub>/100 μLであった。また、平成30年度戦略的監視・診断体制整備事業で配布された血清(陽性血清)をCSFV抗体陽性のコントロールとして検査に供した。陽性血清の中和抗体価は×1024(×512から×2048で変動あり)であった。
- 2 容器の形状及び材質の比較試験：CSFVワクチン株を検査に供した。
- 3 確認試験：平成8年度から平成9年度にかけて採材された、CSFVワクチン抗体陽性の血清(野外血清)18検体を検査に供した。

**検査方法：**検査に供したウイルス量は150 μL、血清は120 μLとした。「容器の形状及び材質の比較試験」を除き、容器は自立型の2mLス

クリューキャップチューブ(スクリーマイク)クロキャップチューブ(DNAローバイディング)、ザルスタット株式会社(東京)を使用し、ウォーターバスで加温を実施した。加温後はただちに氷冷し、ウイルス力価の測定は30分以内に実施した。

1 **ウイルス力価の測定(titration)：**CPK-NS細胞を用いて50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>/100 μL)を算出した。

### 2 抗体検査：

- 1) 中和試験：CSFVワクチン株及びCPK-NS細胞を用いて中和試験を実施し、抗体価 $\geq 2$ 以上を陽性と判定した。
- 2) ELISA検査：ELISAキット(豚コレラエライザキットII, JNC株式会社, 東京)を用いて抗体の有無を確認した。使用説明書のとおり、S/P値0.05未満を陰性、0.05以上0.1未満を疑陽性、0.1以上を陽性と判定した。

### 試験方法：

- 1 条件検討試験：以下の条件により、CSFVワクチン株を用いたtitration、陽性血清を用いた中和試験及びELISA検査を実施した。
  - 1) 「温度」条件の変更：56℃、60℃、65℃、70℃、75℃で30分間の加温処理を実施した。
  - 2) 「時間」条件の変更：56℃、60℃、65℃の各温度帯で60分、90分、120分、180分間の加温処理を実施した。
  - 3) 高温短時間加温＋非働化：75℃で1分間、1.5分間、2分間加温、80℃で30秒間加温、100℃で10秒間加温処理した後に非働化を実施した。
  - 4) 紫外線(UV)照射＋非働化：UVライトを15分間、30分間、60分間照射後に非働化を実施した。UV照射は安全キャビネット内で実施し、仕様書による安全キャビネット内の紫外線強度は作業台全域で

40  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> 以上であった。

2 容器の形状及び材質の比較試験：「UV 照射 + 非働化」の条件検討試験について、容器の形状と材質の違いによる影響を確認するため、CSFV ワクチン株を用いて titration を実施した。容器の形状と材質は以下のとおり。

- 1) 2mL スクリューキャップチューブ：材質はポリプロピレン製 (PP)
- 2) 1.5mL エッペンチューブ：材質は PP
- 3) 96 穴用 1.2mL マイクロチューブ：材質は PP
- 4) 1.8mL 細胞凍結用チューブ：材質は高密度ポリエチレン (HDPE)
- 5) ガラスバイアル瓶：材質はガラス

(図 3)

なお、自立しないチューブは UV が遮られないようテープで固定した。

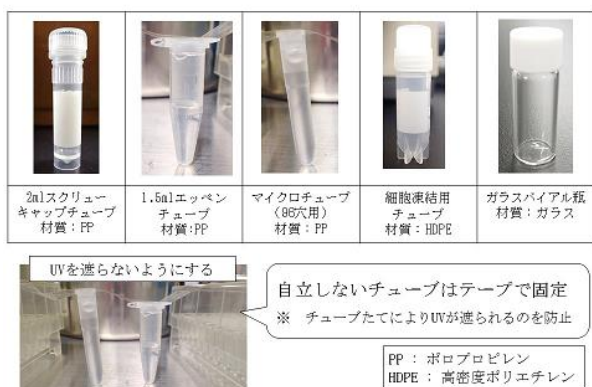


図 3 容器の種類

3 確認試験：条件検討試験において最適条件を決定後、複数検体への影響を確認するため、野外血清を用いて中和試験と ELISA 検査を実施した。

## 結 果

### 1 条件検討試験：

1) 「温度」条件の変更：ウイルス力価を測定した結果、コントロールである 56°C の  $10^{5.25}$ TCID<sub>50</sub>/100  $\mu$  L から 60°C では

$10^{1.875}$ TCID<sub>50</sub>/100  $\mu$  L と 2370 分の 1 に低下した。また、75°C ではウイルス力価は検出限界以下まで低下した。同様の条件による中和試験では、70°C で抗体価  $\times 4$  の低下が認められ、ELISA 検査では 65°C から S/P 値が低下した。また、70°C 以上に加熱すると血清のゲル状化し、検査に供することができなくなった (図 4、図 5)。

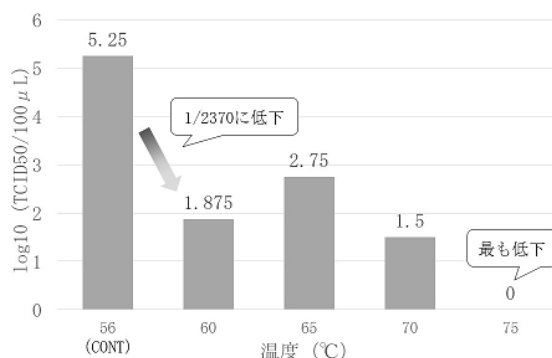


図 4 「温度」条件の変更 (titration)

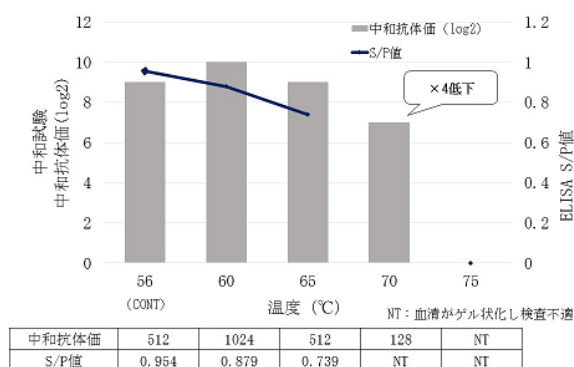


図 5 「温度」条件の変更 (中和試験・ELISA)

2) 「時間」条件の変更：全温度で経過時間とともにウイルス力価は低下した。56°C では 180 分間加温しても検出限界以下にはならず、60°C と 65°C では 90 分間の加温処理で検出限界以下となった。同様の条件で抗体検査を実施した結果、56°C と 60°C では 180 分間加温しても中和抗体価及び S/P 値にコントロールとの差は認められなかった。一方、65°C の加温では、120 分間の加温で中和抗体価が低下し、ELISA 検査の S/P 値は全ての加温時間で他の温度帯よりも

低い値となった。また、65℃・180 分間の加温処理で血清のゲル状化が認められた (図 6、図 7)。

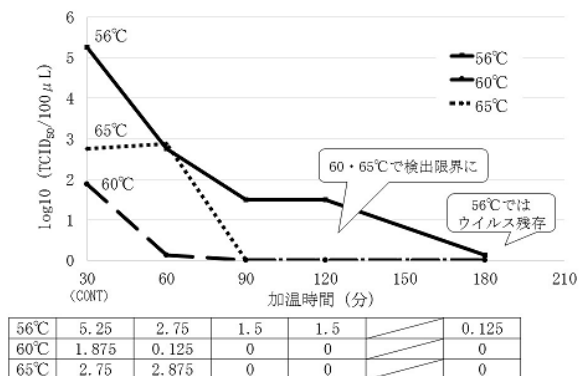
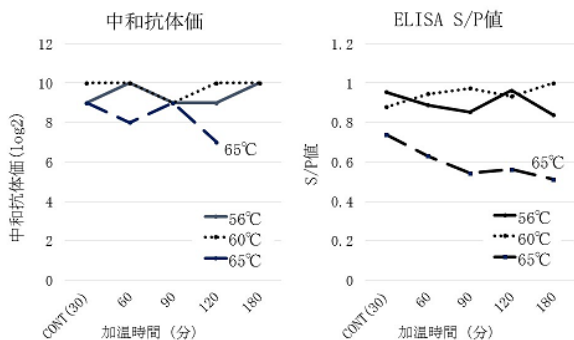


図 6 「時間」条件の変更 (titration)



\*65℃の180分間処理：血清がゲル状化し検査不適

図 7 「時間」条件の変更 (中和試験・ELISA)

3) 高温短時間加温+非働化：75℃・1 分間の加温処理を実施すると、コントロールの  $10^{5.25}TCID_{50}/100 \mu L$  から  $10^{2.5}TCID_{50}/100 \mu L$  に力価が低下した。さらに 30 秒ごとに加温時間を延長すると、 $10^{1.625}TCID_{50}/100 \mu L$ 、 $10^{0.125}TCID_{50}/100 \mu L$  と低下していった。また、80℃・30 秒間の加温処理では  $10^{3.25}TCID_{50}/100 \mu L$  に、100℃・10 秒間の加温処理では  $10^{3.375}TCID_{50}/100 \mu L$  に低下した。同様の条件で中和試験を実施した結果、75℃・2 分間の加温処理では中和抗体価が ×4 低下したが、その他の条件では中和抗体価の低下は認められなかった。ELISA 検査の S/P 値は、75℃の加温で加温時間の延長とともに低下が認められたが、その他の条件では低下は確認されなかった (図 8、図 9、図 10)。

4) UV 照射+非働化：ウイルス力価は、UV 照射時間の延長とともに低下していき、60 分間照射では検出限界以下となった。同様の条件で中和試験と ELISA を実施した結果、UV の照射時間を延長しても中和抗体価及び S/P 値に影響は認められなかった (図 8、図 9、図 10)。

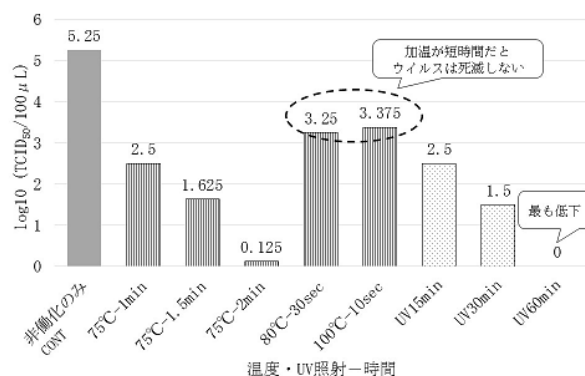


図 8 高温短時間加温・UV照射+非働化 (titration)

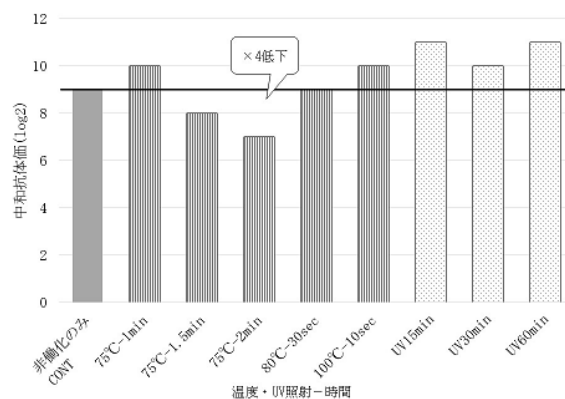


図 9 高温短時間加温・UV照射+非働化 (中和試験)

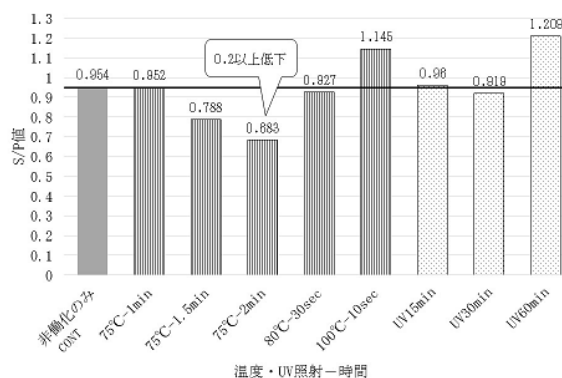


図10 高温短時間加温・UV照射+非働化 (ELISA)

2 容器の形状及び材質の比較試験：PP 製の容器では、形状によらず全ての容器でウイルス

力価が検出限界以下となった。一方 HDPE 製の容器とガラス製の容器では、それぞれ  $10^{1.875}$  及び  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/100  $\mu$  L のウイルスが検出された (図 11)。

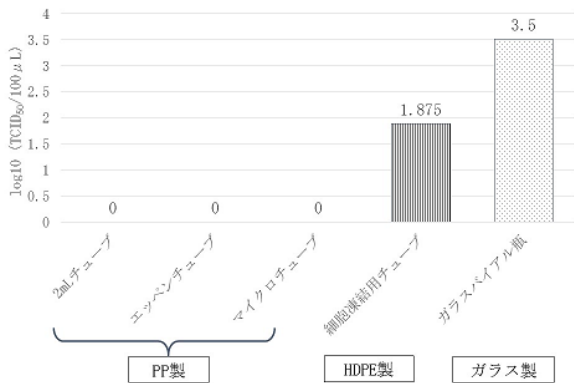


図11 容器の形状及び材質の比較試験

3 確認試験：「条件検討試験」及び「容器の形状及び材質の比較試験」の結果より、PP 製容器を用いて 60 分間の UV 照射後に非働化する条件を最適条件とし、野外血清 18 検体を用いた中和試験及び ELISA 検査を実施した。その結果、通常非働化と比較して中和抗体価及び S/P 値に大きな差は認められなかった (図 12、図 13)。

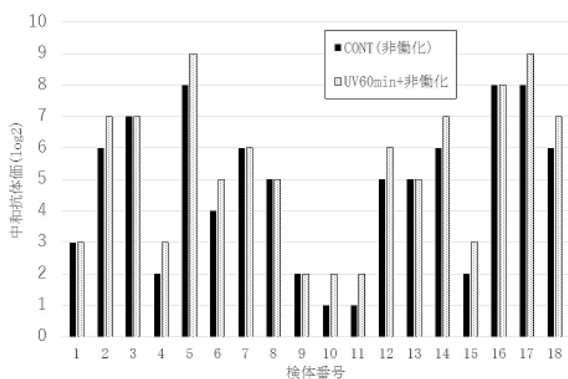


図12 60分間UV照射+非働化 (中和試験)

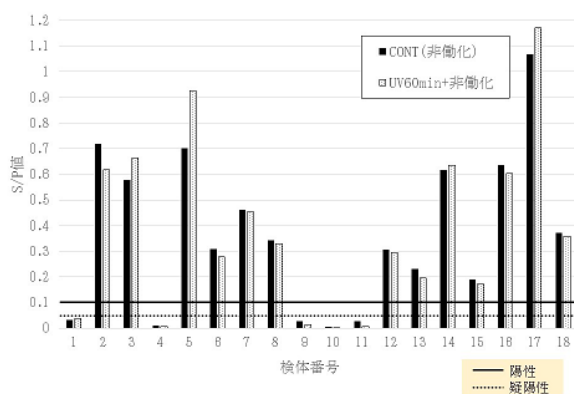


図13 60分間UV照射+非働化 (ELISA)

## 考 察

条件検討試験の結果より、70°C・30分間の加温でも CSFV は完全には死滅せず、65°C以上の30分間の加温はタンパク質の変性等の要因により血清抗体検査に影響を与えることがわかった。また、高温短時間の加温では、加温時間が短いと中心部まで加温されない影響のためかウイルスは死滅せず、反対に加温時間が長くなるとゲル状化により血清抗体検査に影響を与えることも判明した。一方、UV照射と非働化の組み合わせは、抗体検査に影響を与えずに最もウイルス力価が低下したことから、汚染リスクを低減する最適条件として決定した。UV照射では容器の形状や材質の違いによる影響も考えられるため、材質と形状の異なる容器を使用して追加試験を実施したが、容器の形状によらず、PP製チューブはHDPE製チューブ及びガラス製チューブと比較してUVを透過しやすいことがわかった。また、確認試験より、様々な中和抗体価の検体を用いても検査結果に影響を与えないことも確認した。ELISA検査の際は、PP製チューブを用いて60分間のUV照射後に非働化を実施することで、ウイルス汚染を低減して安全に検査を実施することができる。ただし、本検査結果は容量150  $\mu$  Lまでの試験結果であり、それ以上の容量については都度UVの照射時間を検討する必要がある。

現在、ELISAキットの使用説明書にUV照射の可否についての記載がないため、当所では多くのCSF陽性例が確認されているのしし検査について、検査を安全キャビネット内で行うようにし、ウイルス汚染を最小限に抑える対策を実施している。

## 引用文献

- 1) 小沼 操ほか:動物の感染症, 第二版, 近代出版, 東京 (2006)
- 2) OIE : Terrestrial Animal Health Code. 14th ed. World Organisation for Animal Health,

Paris (2005) .

- 3) 社団法人全国家畜畜産物衛生指導協会:豚コレラ(Classical swine fever). (社)全国家畜畜産物衛生指導協会, 東京 (2006) .
- 4) 八町慶史ほか:高病原性鳥インフルエンザ等の競合エライザ法における重要管理点の設定、平成 29 年度東京都家畜保健衛生業績発表会集録、24-27 (2017)