

Title	酵素抗体法によるデングウィルスの迅速感染価測定法とその応用
Author(s)	奥野, 良信
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31572
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	奥野良信
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 3875 号
学位授与の日付	昭和 52 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	酵素抗体法による Dengue ウイルスの迅速感染価測定法とその応用
論文審査委員	(主査) 教授 深井孝之助 (副査) 教授 加藤 四郎 教授 岡田 善雄

論文内容の要旨

〔 目的 〕

Dengue ウイルス(DV)は東南アジア諸国において単なる Dengue 熱のみならず重篤な Dengue ショック症候群—Dengue 出血熱—を起こすにもかかわらず、その研究は十分には進んでいない。その理由の一つには感染価測定の困難なことがあげられる。先に五十嵐らは蛍光抗体間接法 (FA法) を用いたフォーカス・カウントによる Dengue ウイルス 4 型の迅速感染価測定法を発表し、Dengue ウイルスの定量は、より容易に且迅速確実に行える様になった。この研究は FA 法に比べて更にいくつかの長所を有する酵素抗体法の一つ Peroxidase・anti-peroxidase 法(PAP法)を感染価の迅速測定に応用し、その有用性を認めたものである。

〔 方法ならびに成績 〕

(方法)

細胞は BHK-21 細胞を使用。ウイルスは Dengue 1 型より 4 型(DV 1 ~ DV 4)までの 4 種を用い、それに対応する抗血清をウサギで作った。抗ペルオキシダーゼ血清をウサギで作り、PAP complex を Sternberger の方法に従って作成した。感染細胞の準備を Lab-Tek の 8 chamber tissue culture slide で行い、PAP 法と FA 法で染色した。PAP 法の場合、一次血清は抗 DV ウサギ血清を、二次血清は抗ウサギ IgG 羊血清を、三次血清は PAP complex をそれぞれ反応させ、次いでペルオキシダーゼ反応を行った。反応後エタノール系列で脱水し、カナダバルサムで封じ、通常の顕微鏡で観察した。FA 法の場合、一次血清は PAP 法と同様の血清を使用し、二次血清は FITC ラベル抗ウサギ IgG ヤギ血清を反応させ、緩衝グリセリンで封じ、蛍光顕微鏡で観察した。

(成績)

- (1) デングウイルス感染によるフォーカスはPAP法でもFA法でも確認でき、感染細胞細胞質中のウイルス抗原がはっきりと染色されていた。
- (2) PAP法とFA法に使用する抗血清の最適濃度を定める実験の結果、PAP法に使用する一次血清の濃度はFA法の場合と比較して4～16倍低濃度が良いことがわかった。
- (3) ウイルスの接種濃度を変え、その時出現するフォーカス数をPAP法とFA法で調べてみた。ウイルス濃度とフォーカス数はどちらの方法でも直線関係にあり、両法でのウイルス濃度対フォーカス数直線はほぼ一致し、PAP法によるフォーカスカウントによってもデングウイルスの感染価測定が可能であることが示された。
- (4) DV感染後に出現するフォーカス数を時間を追って調べてみた。この結果感染後40時間前後がフォーカスウントに最適であることがわかった。
- (5) 抗DV 4 ウサギ 血清によるDV 4 の中和試験をPAP法によるフォーカス・リダクションで行い、この方法で中和反応を行うことが可能であることが示された。
- (6) それぞれの型のウイルスに感染した細胞をホモとヘテロの抗DV血清でPAP法とFA法により染色してみた。その結果、型間の交差反応を示す染色パターンはPAP法でもFA法でも同様であり、PAP法の染色感度はFA法に比べ約4倍高いことが示された。又抗DV血清のそれぞれのHI価をDVの4つの型のヘモアグルチニンに対して測定し、染色感度とHI価は必ずしも平行していないことがわかった。このような所見は、DV抗原の染色にはHA抗原以外のものとそれに対する抗体が関与していることを示唆している。

〔総括〕

- (1) PAP法はFA法と共にデングウイルスの感染価測定に有効であり、その中和反応への応用も可能である。
- (2) PAP法はFA法にはないいくつかの長所をもつ。特に
 - a. 通常の顕微鏡で観察できるのでフォーカス・カウントが容易であり、血清疫学等特に多数の感染価測定に有利である。
 - b. 標本は安定でくり返して観察が可能であり、一連の結果の同時比較を行なうことができる。
 - c. PAP法の感度は同一一次抗血清を用いてのFA法の4～16倍高い。以上からPAP法は疫学的規模での応用に適した方法といえる。

論文の審査結果の要旨

著者は熱帯アジア諸国において、デング熱・デング出血熱の病源として重要であるデングウイルスの研究に着手し、先づ酵素標識抗体染色の手法であるPeroxidase・anti-peroxidase法(PAP法)を利用するフォーカス計数によってこのウイルスの感染価を、正確に且短時間内に測定する方法を確立し

た。続いてこの方法を用いて抗 Dengue ウィルス中和抗体をフォーカス減少法によって定量的に測定できることを示し、一方 Dengue ウィルス感染細胞の標識抗体による染色においてはビリオン表面抗原のみならず、他のウィルス抗原の関与をも示唆する結果を報告した。又上記方法を FITC 標識抗体による染色法と比較して PAP 法によるフォーカスの感染価指標としての妥当性を確認し、更に著者の確立した方法が疫学的利用の面をはじめとし、幾つかの点において FITC 法に勝ることを知った。

以上の結果は、Dengue ウィルス、および関連するフラビウイルス群ウィルスの研究における評価すべき所見であり、将来これらウィルスによる疾患の疫学、又その診断、予防等に貢献するものと期待される。