

【背景と目的】

CPK-NS 細胞は無血清培養液で増殖可能な細胞で、豚熱ウイルス (GPE⁻株) が感染すると明瞭な細胞変性効果 (CPE) を示す¹⁾。当所が保有している入手先の異なる CPK-NS 細胞を確認したところ、細胞の形態や CPE の見え方が明らかに異なる 2 種類の CPK-NS 細胞の存在が判明した。豚熱の中和試験は豚熱及びアフリカ豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針 (防疫指針) に基づき、CPK-NS 細胞を用いて行っている²⁾が、使用する細胞株によって結果が異なる可能性がある。そこで、細胞株毎の発育性と中和試験結果の差を把握するために、2 種類の CPK-NS 細胞を用いて、細胞培養、豚熱ウイルス力価測定及び豚熱中和試験を行い、結果を比較した。

【材料と方法】

1 細胞培養

動物衛生研究部門から分与された CPK-NS 細胞 (A 株、平成 29 年度戦略的監視・診断体制整備推進事業) と他の都道府県から分与された CPK-NS 細胞 (B 株) の 2 種類の CPK-NS 細胞について、組織培養用プラスチックフラスコを用いて 37°C で密栓培養し、多数の特徴的な構造物 (ドーム) が出現した細胞を、細胞面の面積比 3 倍で継代、37°C で 7 日間密栓培養した。培養後 2 日目、4 日目、7 日目に観察し、細胞の形態を比較した。さらに、継続して 7 日間隔で培養、継代しそれぞれの細胞株の発育性や特徴を確認した。

2 豚熱ウイルス力価測定

A 株及び B 株について、無血清培養液で 10 倍階段希釈した GPE⁻株と細胞浮遊液を同時接種し、37°C、5%CO₂ 下で 7 日間培養した。それぞれの細胞について、CPE の出現を指標にウイルス力価を測定した。

3 豚熱中和試験

A 株及び B 株について、豚血清 60 検体を用いて中和試験を実施し、中和抗体価を比較した。中和試験は防疫指針の豚熱の診断マニュアルに従い実施した。

【結果】

1 細胞培養

培養後 2 日目では、A 株はコンフルエントに達し、B 株はサブコンフルエントの状態であった。培養後 4 日目では、A 株は細かいドームが出現し、B 株はコンフルエントに達しやや大きなドームが出現していた。培養後 7 日目では、A 株 B 株ともに培養後 4 日目と比

較してドームが増加していた。A株とB株の細胞の形態は明らかに異なり、A株では細かいドームが多数認められたのに対し、B株では非常に大きなドームが認められた（図1）。

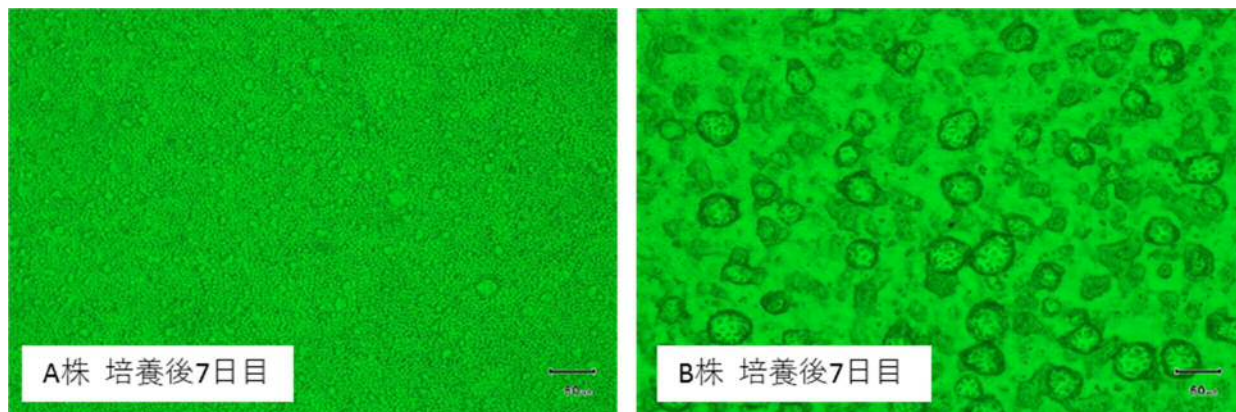


図1 CPK-NS細胞A株及びB株の形態（培養後7日目）

また、A株及びB株を継続して培養した結果、A株は増殖能力が低く、週3倍比継代では細胞数が徐々に減ってしまい、増殖できずに死滅する傾向が見られた。そのため、週2回程度の頻繁な液交換や、月に1回程度、週2倍比での継代が必要であった。一方でB株は増殖能力が高く、少ない細胞量で播種しても問題なく増殖し、週3倍比継代、週1回の液交換で十分な細胞量が維持されていた。

2 豚熱ウイルス力価測定

同じウイルス液を用いてウイルス力価を比較した結果、A株でのウイルス力価は $10^{5.5}$ TCID₅₀/50 μ l、B株でのウイルス力価は $10^{5.6}$ TCID₅₀/50 μ lでおおよそ同じ力価を示した。A株とB株はともにCPEが認められたが、CPEの見え方が異なっていた（図2）。

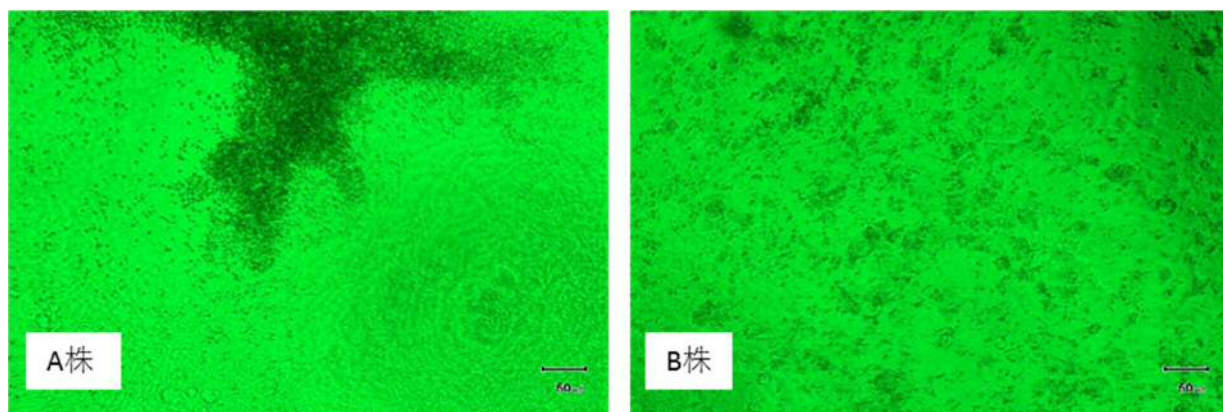


図2 CPK-NS細胞A株及びB株のCPE（GPE⁻株接種後7日目）

3 豚熱中和試験

A株とB株を用いて中和試験を実施した結果、A株よりB株の方がやや中和抗体価が高い傾向が認められた。両者には正の相関が認められ、相関係数は0.943であった（図3）。ま

た、中和試験では血清を含んでいるため血清を含まない場合と比較して CPE の見え方がやや異なっていた。A 株は低抗体価ではドームがつぶれてその周囲から CPE が出現する傾向があり、高抗体価では CPE が塊になりやすい傾向があり比較的判定が容易であった。一方で B 株の CPE は不明瞭な場合が多く判定に苦慮した (図 4)。

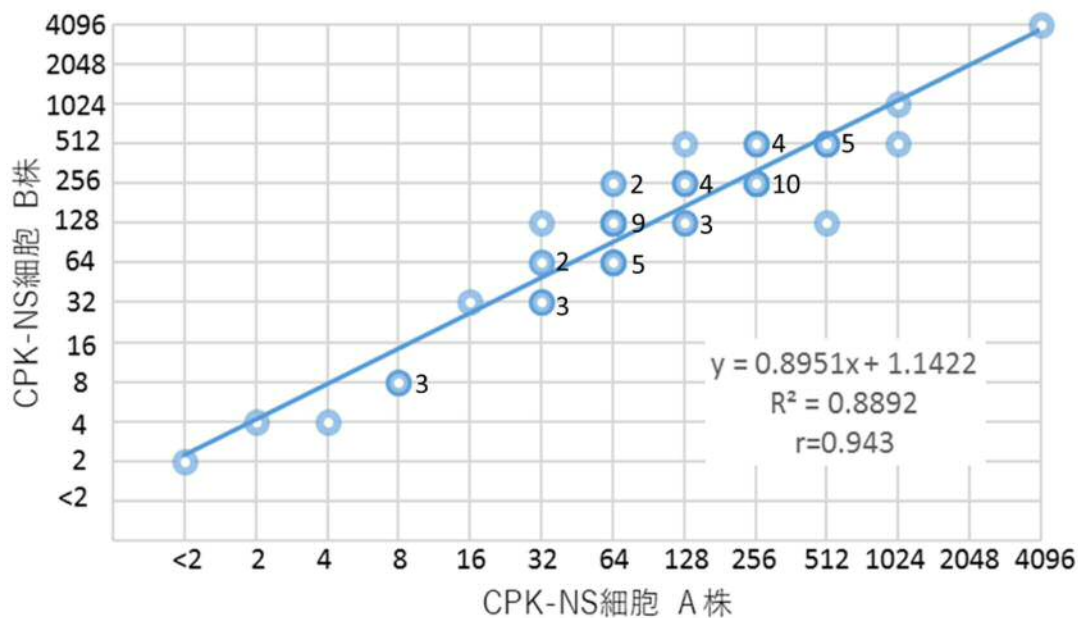


図 3 CPK-NS 細胞 A 株と B 株による中和抗体価の相関図
 プロットの右の数字は重なったプロットの個数を示す。

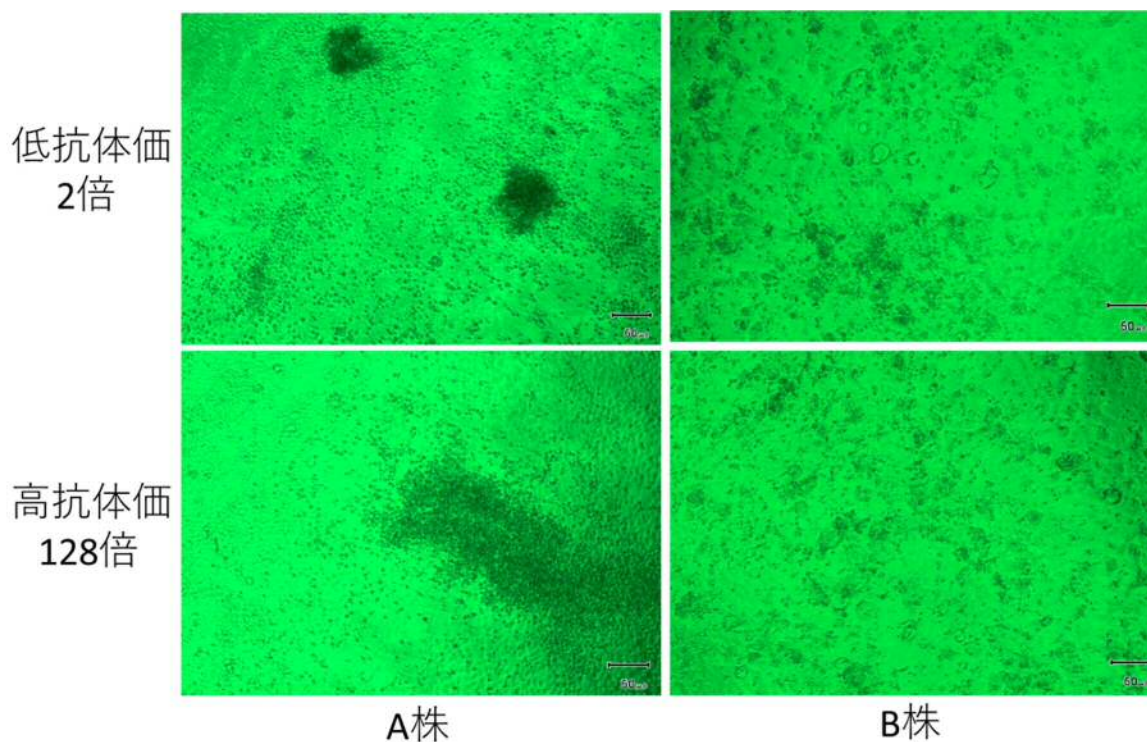


図 4 中和試験における CPE の比較
 CPE が出現したウェルの最低希釈倍率 (判定の境界部分) の画像。

【考察】

調査の結果、A株とB株は細胞の形態やCPEの見え方が明らかに異なっており、豚熱中和試験ではB株の方がやや中和抗体価が高い傾向が認められた。中和試験結果の差にはB株のCPEが不明瞭であったことが原因の一つと考えられ、検査者によって判定結果が大きく異なる可能性があると考えられた。A株とB株はともに無血清培養液で発育し、GPE⁻株の感染によりCPEを示すことから、元は同じCPK-NS細胞であったと考えられるが、継代中の培養条件の変化やコンタミネーション等の何らかの原因により細胞が少しずつ変化したと推察する。また、豚熱ELISA検査のS/P値と中和抗体価の関係について、都道府県ごとに相関が大きく異なるとされており³⁾、それぞれの都道府県で使用している細胞株の特徴の違いが中和試験の結果に影響を与えているという可能性も考えられる。今後はよりCPEが明瞭なA株を用いて中和試験を実施するとともに、防疫指針に定められたCPK-NS細胞の培養条件を守り、細胞の変化を最小限に抑えながら検査の正確性の維持に努めていく。

参考文献

- 1) Sakoda Y, et al. Establishment of a serum-free culture cell line, CPK-NS, which is useful for assays of classical swine fever virus. J Virol Methods, 75, 59-68 (1998)
- 2) 豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針 (2020)
- 3) 食料・農業・農村政策審議会 家畜衛生部会 第74回牛豚等疾病小委員会
配付資料 1-2 飼養豚等への豚熱ワクチン接種後の免疫付与状況等について (案)
(2021)