



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

鶏マクロファージおよび鶏由来リンパ性腫瘍細胞における鶏の伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの増殖について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 長野, 功, 平井, 克哉 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/5693">http://hdl.handle.net/20.500.12099/5693</a>

鶏マクロファージおよび鶏由来リンパ性  
腫瘍細胞における鶏の伝染性ファブリキ  
ウス嚢病ウイルスの増殖について

長野 功・平井克哉

家畜微生物学研究室

(1984年7月31日受理)

In Vitro Replication of Infectious bursal  
Disease Virus in Chicken Macrophages and  
Established Lymphoid cell lines

Iaso NAGANO and Katsuya HIRAI

*Laboratory of Veterinary Microbiology*

*(Received July 31, 1984)*

**SUMMARY**

The in vitro susceptibility of chicken macrophages and lymphoid cell lines to wild and egg-adapted strains of infectious bursal disease virus (IBDV) was investigated by immunofluorescence and virus titration as the infection criterion. Macrophages were not susceptible to infection by wild strain of IBDV. However, the cells were susceptible to infection by 4 egg-adapted strains of IBDV. Two of 4 bursa (B-cell)-derived lymphoid cell lines from an avian leukosis virus-induced tumor was highly susceptible to infection by wild and an egg-adapted strains of IBDV. Pretreatment of the lymphoid cells, with anti-immunoglobulin M (IgM) ( $\mu$ -specific) before inoculating them with the wild virus blocked the virus infection; no blocking occurred with anti-IgG ( $\gamma$ -specific) and anti-IgA ( $\alpha$ -specific). The relationship between the target cells for virus infection and those lymphoid cells that possessed surface immunoglobulin (SIg) was tested. Lymphoid cells were further divided into SIg(M)- and SIg(G)-bearing cells by immunoabsorbent columns employing anti- $\mu$  and anti- $\gamma$  specific sera coated with Sephadex. The SIg (M)-bearing lymphoid cells were highly susceptible. These results suggest strongly that SIg (M)-bearing B cells were the target cells for infection by IBDV.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (49) : 229-238, 1984.

**要 約**

免疫抑制機序解明のひとつとして、鶏マクロファージ及び鶏由来リンパ性腫瘍細胞におけるIBDウイルスの増殖からその標的細胞を知ろうと試み、以下の結果を得た。

1) 強毒ウイルスはマクロファージにおいて全く増殖しなかった。一方、鶏胚馴化ウイルスは全株よく増殖した。

2) 鶏胚馴化PV-1株は、マクロファージの細胞質内に集塊状または輪状に認められるウイルス特異蛍光抗原を感染8時間後から、凝集性または円形化のCPEを18時間後から発現し、液相ウイルスは9時間

後から現れ、24時間後では最高値の $10^{4.7}$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlに達した。

3) 鶏由来腫瘍細胞のうち SIg (M) [膜表面 IgM] 保有細胞の分布が高率な細胞株ほど、強毒ウイルスに対するウイルス特異蛍光抗原の陽性細胞出現率は高かった (TLT-1 > BK4484)。

4) 抗 $\mu$ 鎖血清で処理した TLT-1 及び BK4484細胞では強毒ウイルスの感染率は著明に低下したが、抗 $\gamma$ 鎖または抗 $\alpha$ 鎖血清処理細胞ではその低下が認められなかった。

5) TLT-1細胞を SIg の相違により分画し、強毒ウイルスを感染させた結果、ウイルス特異蛍光抗原の陽性細胞出現率は SIg (M) 保有細胞の分布が高率な分画ほど高かった。

以上の成績から、強毒 IBDウイルスの標的細胞はマクロファージではなく、SIg(M)-B細胞であることが強く支持された。

## 結 言

鶏の伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) はファブリキウス嚢 (BF) をはじめリンパ系組織の壊死性炎症で、ウイルス感染雛ではワクチンはじめ各種抗原に対する免疫が抑制される<sup>1,2,3)</sup>。Hirai *et al.*<sup>4)</sup> は、IBDウイルス感染雛では雛の感染日齢にかかわらず、B細胞が著明に減少することを報告した。Hirai & Calnek<sup>5)</sup> は、IBDウイルス強毒株がBF、脾臓、胸腺及び末梢血由来のリンパ球に感染することを明らかにし、その感染率はB細胞の臓器内分布と並行すること、また、BF由来のリンパ球を抗B細胞又は抗IgM血清で前処理すると、IBDウイルスは感染しないことから、ウイルスの標的細胞は膜表面にIgMをもつB細胞 [SIg (M)-B細胞] であることを示唆した。Nakai & Hirai<sup>6)</sup> は、BF及び胸腺からアフィニティ・カラムクロマトグラフィーを用いて高純度のリンパ球を分画し、これら分画細胞におけるウイルス感染率はSIg (M)-B細胞分画において最も高いことを述べた。また、Hirai *et al.*<sup>7)</sup> は、IBDウイルス感染1日齢及び4週齢雛のSIg-B細胞の変動について検討し、SIg (M)-B細胞はSIg (G)-B細胞より約48時間早く著明に減少することを報告した。これら一連の結果から、IBDウイルスの標的細胞はSIg (M)-B細胞であることを強く示唆した。上記の結果を更に支持するために、鶏のマクロファージ及び鶏の腫瘍細胞におけるIBDウイルスの増殖について検討し、IBDウイルスの標的細胞について考察した。

## 材料及び方法

鶏及び受精卵：鶏及び受精卵は当教室で生産、維持しているSPFのものを用いた。

ウイルス：供試IBDウイルスの強毒株は当教室で分離されたGBF-1株<sup>8)</sup>である。鶏胚馴化株はPV-1株<sup>9)</sup>、RF-1<sup>10)</sup>、J-1株<sup>11)</sup>及び当教室で馴化したGBF-1E株である。GBF-1株は感染4日目の雛から無菌的に採取されたBFの10%の乳剤から、また各鶏胚馴化株は鶏胎児細胞 (CEF) で増殖したもつから得た。これらは使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

マクロファージの分離及び培養法：マクロファージの採取は馬場の方法<sup>12)</sup>に準じ調整した。培養後36時間までに5回にわたって非吸着細胞を除去するため、細胞面を数回 Hank's balanced salt solution (HBSS) により強く洗浄し、新しい培養液を入れた。マクロファージの純度は、約97%であった。

腫瘍細胞とその培養：腫瘍細胞はマレック病由来のMSB-1腫瘍細胞<sup>13)</sup>の1株と鶏リンパ性白血病由来腫瘍細胞 (BK4484<sup>14)</sup>、BK2544<sup>14)</sup>、1104X-5<sup>14)</sup>及びTLT-1<sup>15)</sup>の4株である。細胞の培養はHahnの培地<sup>16)</sup>を用い、継代は約 $1 \times 10^6$ /mlに調整し、48時間間隔で行った。

免疫グロブリンの精製：IgM及びIgGの精製は、Benedictの方法<sup>17)</sup>に、IgAはLevacq *et al.*の方法<sup>18)</sup>に準じて行った。精製IgM、IgG及びIgAの純度は、抗鶏全血清との間で免疫電気泳動を行い検討した<sup>5,6,7)</sup>。

不溶化抗原の作製：不溶化抗原は、Benedictの方法で得たIgM (IgAを含む) とIgGを用いて作製し、特異的抗H ( $\mu$ ,  $\gamma$ 及び $\alpha$ ) 鎖並びに抗L ( $\kappa$ 及び $\lambda$ ) 鎖の吸収に用いた。

各種抗血清の作製と精製：抗IgM、抗IgG及び抗IgA血清の各抗血清は、IgM、IgG及び抗IgAを各々 Complete Freund's adjuvant (CFA) と等量混合し、ウサギの四足蹠に2週間間隔で2回接種し、抗体価がゲル内沈降反応で、各々対応するIgに対し32倍以上に達していることを確認した後、全採血して得た。

特異的抗 $\mu$ 、 $\gamma$ 及び $\alpha$ 鎖血清は、抗IgM、抗IgG及びIgA血清から既報<sup>6,7)</sup>の方法に準じて作製した。

蛍光標識ヤギ抗ウサギIgG・Fc抗体の作製：ウサギIgG・Fcは、0.01MPB (pH 7.2) 平衡DEAEセルロース・カラムクロマトグラフィーによりウサギ血清からIgGを精製し、パパインで消化後作製した。更に、これをpH 4.0の酢酸緩衝液で溶解し、セファデックスG-200カラムクロマトグラフィーにより精製した。

ヤギ抗ウサギIgG・Fc血清はウサギIgG・FcをCFAと等量混合し、ヤギの筋肉内に接種してヤギ抗ウサギIgG・Fc血清を得た。

蛍光標識ヤギ抗ウサギIgG・Fc抗体は硫酸アンモニウムによる35%飽和沈澱法により抗ウサギIgG・Fc血清のIgG分画を精製し、Rabellino *et al.*の方法<sup>19)</sup>に準じ、このIgG分画をFluorescein isothiocyanate (FITC)で標識した。

蛍光標識抗IBDウイルス抗体の作製：抗IBDウイルス抗体は4週齢雛に、GBF-1株を約0.2ml経口投与し、1カ月経過した雛の耐過血清を用いた。上述のBenedictの方法により抗IBDウイルス血清からIgG分画を精製し、前述のRabellino *et al.*の方法に準じてF/Pモル比2.0の蛍光標識抗IBDウイルス抗体を得た。更に、非特異蛍光除去のため、肝臓のアセトン粉末で数回吸収操作を行った。標識抗体の特異性は、非標識抗体で感作後、続いて標識抗体で染色し、特異蛍光の発現が阻止されるかをみる二段式阻止試験法によって検討した。

細胞へのウイルス接種：マクロファージへのウイルス吸着は、48時間培養マクロファージの細胞面を3回HBSSで洗浄し、0.5mlのウイルス液を加え、5%炭酸ガス培養ふらん器内で37°C、60分間行った。吸着後、細胞面を2回HBSSで洗浄して未吸着ウイルスを除去し、4mlのHahnの培地を加え培養した。MOIは1:1及び1:10に調整した。ウイルス増殖は、経時的に採取した液相ウイルスの力価測定及び蛍光抗体法によるIBDウイルス特異蛍光抗原の検索によって判定した。

腫瘍細胞は48時間培養のものを用いた。強毒ウイルスの吸着は、 $2 \times 10^6$ 個の細胞を浮遊させたHahnの培地0.5mlと所定のMOIとなるように調整したウイルス液0.5mlとをよく混合し、37°C 60分間行った。吸着後、2回遠心洗浄して未吸着ウイルスを除去し、4mlのHahnの培地を加え培養した。ウイルス増殖は、経時的に一部の細胞を採取し、蛍光抗体法によるIBDウイルス特異蛍光抗原の陽性細胞の検索によって判定した。一方、PV-1株の増殖は、ウイルス特異蛍光抗原の陽性細胞の検索と液相ウイルスの力価測定によって判定した。

腫瘍細胞の抗血清処理：抗血清(抗 $\mu$ 、抗 $\gamma$ 及び抗 $\alpha$ 鎖血清)による処理は、 $1 \times 10^7$ 個のTLT-1及びBK4484細胞に各抗血清を1ml、対照はHBSS 1ml加え37°Cで90分間行った。このように処理された細胞は、直ちに、HBSSで2回遠心洗浄し、lymphocyte separation medium (LSM)による生細胞の分離を行い、 $2 \times 10^6$ 個の細胞にHahnの培地で調整した。

アフィニティ・カラムクロマトグラフィー：Schlossman *et al.*<sup>20)</sup>及び岸本ら<sup>21)</sup>の方法に準じて行った。即ち、セファデックスG200 1gに蒸留水100mlを加えて十分に膨潤させ、脱イオン水で洗浄後、冷蒸留水に懸濁させ50mlとし、0.2M NaOHでpH 10.5とした。これにブロムシアン(BrCN<sub>2</sub>, 4 mg/ml) 50mlを加え、1M NaOHでpH 10.5とした。反応中に溶液のpHは酸性へ移行するので、1M NaOHを少量ずつ加え、pH 10.5 $\pm$ 0.1の範囲内に保った。8~10分後、活性化されたセファデックスは、直ちに氷冷ホウ酸緩衝液(BBS, pH 8.3) 30mlを加え、マグネチックスターラーで攪拌しながら、直ちにあらかじめBBS (pH 8.3)で透析しておいた抗 $\mu$ あるいは抗 $\gamma$ 鎖血清20mlを加え、7°Cで14~16時間それぞれ攪拌した。

カラムは、12mlの滅菌済ディスポーザブル注射器を用いた。即ち、注射器の底に少量のガラス綿を詰めて3mlのPBSを加え、その上にセファデックス抗H鎖結合物を注入して8mlの高さまで詰め、滅菌PBS約100mlを空流し、無菌化した。次に2.5mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)-Hahn培地(鶏血清不含)を20~30ml空流させ、5%炭酸ガス培養ふらん器内37°C、60分間静置した。

細胞の分画はTLT-1細胞を2回HBSSにより遠心洗浄し、 $5 \times 10^7$ 個の生細胞をEDTA-Hahn培地(鶏血清不含) 1mlに浮遊させカラムに流した。次に、20mlのEDTA-Hahn培地(鶏血清不含)を0.3~0.5ml/分の流速で流し、流出してくる細胞を集めた。更に、セファデックス吸着細胞は、セファデッ

クスを1 mg Dextranase (Sigma) で23°C, 60分間消化して得た。このようにしてセファデックスに吸着した細胞を吸着分画, 吸着せず通過した細胞を通過分画とした。その後, 各分画細胞をHBSSで2回遠心洗浄しLSMによる生細胞分離を行い,  $2 \times 10^6$ 個の細胞に調整した。

ウイルス力価の測定: CEF細胞の細胞面をPBSで2回洗浄後, 10倍希釈した検査液の0.1mlを3枚の平板に接種した。37°C, 60分間の吸着後, 細胞面をPBSで3回洗浄し, 維持培地を加え, 7日間CPEの出現を観察した。ウイルス力価はTCID<sub>50</sub>/0.1mlで表わし, Reed & Muench 法<sup>22)</sup>により算出した。

蛍光抗体法: IB Dウイルス特異蛍光抗原の検索はウイルス接種後の腫瘍細胞の一部をカバーガラス上に塗抹乾燥し, また培養マクロファージのカバーガラスを採取し, 両細胞をアセトンで室温10分間固定後, 蛍光標識抗IB Dウイルス抗体を重層し, 湿箱内で37°C, 60分間染色して行った。未反応標識抗体はPBSで十分洗浄して除去し, 乾燥後, 緩衝グリセリン〔0.5M炭酸重炭酸緩衝液(pH 9.5) 1容と無蛍光グリセリン9容とを混和したもの〕で封入し, 蛍光顕微鏡(Nikon FT型)を用い鏡検した。IB Dウイルス特異蛍光抗原の陽性細胞出現率は, 1,000個以上の細胞を鏡検して算出した。

膜表面免疫グロブリンの検索は, 間接膜蛍光抗体法による生細胞染色にて行った。即ち, 生細胞 $5 \times 10^6$ 個をHBSS 0.1mlに浮遊させ, 各抗血清(抗 $\mu$ , 抗 $\gamma$ あるいは抗 $\alpha$ 鎖血清)を0.1ml加え, 4°C, 30分間一次反応を行い, 反応後, 遊離抗体を除去するため, HBSSで3回遠心洗浄した。次に, 蛍光標識ヤギ抗ウサギIgG・Fc抗体を0.1ml加え, 4°C, 30分間の二次反応を行い, 一次反応の場合と同様にHBSSで3回遠心洗浄した。染色した細胞を緩衝グリセリンで封入し, 蛍光顕微鏡を用い1,000個以上の細胞を鏡検した。

## 実験成績

### 1 マクロファージにおけるIB Dウイルスの増殖

マクロファージは培養48時間後にはほぼ単層になった。ウイルス特異蛍光抗原の検索及びCPEの出現から, 強毒ウイルスのGBF-1, GBF-3及びJ<sub>1</sub>株は5回の実験において, CPE及びウイルス特異抗原の出現がなく, 増殖は全く認められなかった。

鶏胚馴化ウイルスのPV-1, J-1, RF-1及びGBF-1E株は感染24時間後にウイルス力価がそれぞれ $10^{4.7}$ ,  $10^{3.7}$ ,  $10^{2.7}$ 及び $10^{2.2}$ TCID<sub>50</sub>/0.0mlであった。このように, 鶏胚馴化ウイルスは全株増殖した(表1)。

鶏胚馴化ウイルスPV-1株のマクロファージにおける増殖をより詳細に検討した(図1)。MOIが1の場合, CPEは感染約18時間後から細胞の凝集として認められ, 時間の経過に伴い, 約30時間後から細胞の円形化および壁面よりの離脱として観察された。ウイルス抗原は感染約8時間後から認められ, 初期では細胞質内に集塊状に, 後期ではほぼ輪状に観察された。ウイルス力価は感染9時間後から増加し, 24時間後には最高値の $10^{4.7}$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlに達した。MOIが10の場合, CPEは感染約12時間後から認められ, MOIが1の場合と同様に, 初期では凝集性として, 後期では細胞の円形化および壁面よりの離脱として観察された。ウイルス抗原は感染約4時間後から認められ, 初期では細胞質内に集塊状, 後期ではほぼ輪状に観察された。ウイルス力価は感染24時間後に, ほぼ最高値の $10^{6.5}$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlに達した。

### 2 鶏リンパ性白血病及びマレック病由来腫瘍細胞における鶏胚馴化ウイルスPV-1株の増殖

ウイルス感染72時間後におけるBK4484細胞の特異蛍光抗原陽性細胞の出現率は14.5%で, ウイルス力価は $10^{9.2}$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlであった。また, TLT-1細胞では陽性細胞の出現率は, 3.6%で, ウイルス力

表1 IB D鶏胚馴化ウイルスのマクロファージにおける増殖

ウイルス株	ウイルス力価 <sup>a</sup>	
	ウイルス感染後の時間	
	12	24
PV-1	1.2	4.7
J-1	0.7	3.7
RF-1	0.7	2.7
GBF-1E	0.5	2.2

a.  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

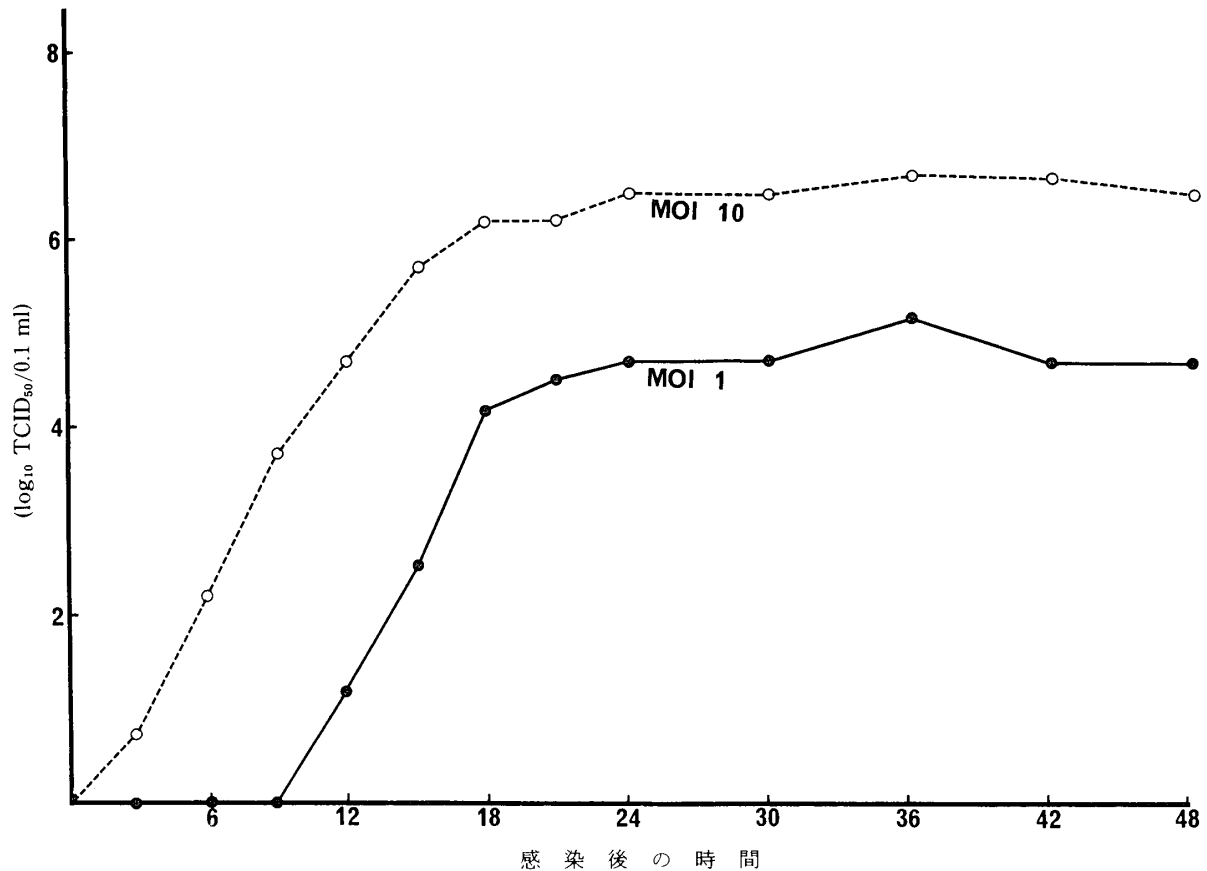


図1 IBD 鶏胚馴化ウイルス PV-1 株のマクロファージにおける増殖曲線

価は $10^{27}$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlであった。一方、BK2544, 1104X-5 及びMSB-1 細胞では、ウイルスの増殖が認められなかった(表2)。このように、5株の腫瘍細胞のうち、鶏胚馴化ウイルスPV-1株の増殖が認められたのはBK4484とTLT-1細胞の2株で、両細胞間におけるウイルス力価に相違が認められた。

3 腫瘍細胞が保有する膜表面免疫グロブリン (SIg) と強毒ウイルスGBF-1株の増殖

鶏リンパ性白血病由来腫瘍細胞は、B細胞マーカーのSIgを有していることが知られているので、SIgと強毒ウイルスの増殖との関係について検討した(表3)。TLT-1及びBK4484細胞の各SIg保有細胞の出現率はμがそれぞれ20.4及び8.1%、γが1.3及び0.6%、αが1.2及び0.1%であった。ウイルス感染72時間後に特異蛍光抗原の細胞出現率は、それぞれ8.7及び4.2%であった。一方、BK2544, 1104X-5及びM

表2 腫瘍細胞におけるIBD鶏胚馴化ウイルスPV-1株の増殖

細胞株	蛍光抗原陽性細胞率(%)			ウイルス力価 <sup>a</sup>		
	ウイルス感染後の日数			ウイルス感染後の日数		
	1	3	5	1	3	5
BK4484	0.8	14.5	33.7	3.7	9.2	9.2
TLT-1	4.4	3.6	3.3	2.7	2.7	2.7
BK2544	0	0	0	0	0	0
1104X-5	0	0	0	0	0	0
MSB-1	0	0	0	0	0	0

a. log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

表3 鶏由来腫瘍細胞が保有する SIg と IBD 強毒ウイルス GBF-1 株の増殖

細胞株	SIg 保有細胞の出現率(%)			蛍光抗原陽性細胞率(%)		
	IgM	IgG	IgA	ウイルス感染後の日数		
				1	3	5
T L T-1	20.4	1.3	1.2	8.7	8.7	8.0
B K 4484	8.1	0.6	0.1	2.0	4.2	4.4
B K 2544	0.6	20.6	0	0	0	0
1104 X-5	2.7	3.8	2.7	0	0	0
M S B-1	0.1	0	0	0	0	0

S B-1 細胞における各 SIg 保有細胞率は $\mu$ がそれぞれ0.6, 2.7, 及び0.1%,  $\gamma$ がそれぞれ20.6, 3.8, 及び0%,  $\alpha$ がそれぞれ0, 2.7及び0%であった。これら3つの細胞におけるウイルス特異抗原の陽性細胞は, 感染24, 72及び120時間後に全く検出されなかった。

このように, SIg(M)保有細胞が高率な細胞株ほど, ウイルス抗原の陽性細胞出現率は高かった。一方, SIg(G)及びSIg(A)保有細胞の分布とウイルス抗原の陽性細胞出現率との間には明らかな関係は認められなかった。

#### 4 免疫グロブリンの抗血清で処理した細胞における IBD 強毒ウイルスの増殖

抗 $\mu$ 鎖血清処理 T L T-1 細胞における感染72時間後の陽性細胞出現率は, 対照が9.9%に対し, 0.9%であった。また, 抗 $\mu$ 鎖血清処理 B K 4484細胞における感染72時間後の陽性細胞は対照が2.6%に対し, 認められなかった(表4)。

抗 $\gamma$ 鎖血清処理 T L T-1 細胞における感染72時間後の陽性細胞出現率は, 対照が10.4%に対し, 10.2%で, 対照との間に差異は認められなかった。抗 $\gamma$ 鎖血清処理 B K 4484細胞における感染72時間後の陽性細胞出現率も, 対照が2.8%に対し, 2.8%であった。

抗 $\alpha$ 鎖血清処理 T L T-1 細胞における感染72時間後の陽性細胞出現率は, 対照が8.7%に対し, 8.9%で, 対照との間に差異は認められなかった。B K 4484細胞における感染72時間後の陽性細胞出現率も, 対照が2.7%に対し, 2.5%と, 対照との間に差異は認められなかった。

表4 抗血清処理した腫瘍細胞における I B D強毒ウイルス G B F-1 株の増殖

細胞株	処 理 <sup>a</sup>	蛍光抗原陽性細胞率(%)		
		ウイルス感染後の日数		
		1	3	5
T L T-1	抗 IgM ( $\mu$ 鎖)	1.0	0.9	0.7
	対 照 <sup>b</sup>	7.5	9.9	8.6
	抗 IgG ( $\gamma$ 鎖)	6.4	10.2	6.1
	対 照	6.5	10.4	6.9
	抗 IgA ( $\alpha$ 鎖)	6.9	8.9	7.1
B K 4484	対 照	7.3	8.7	7.1
	抗 IgM ( $\mu$ 鎖)	0	0	0
	対 照	2.4	2.6	2.6
	抗 IgG ( $\gamma$ 鎖)	2.2	2.8	3.1
	対 照	2.6	2.8	3.2
	抗 IgA ( $\alpha$ 鎖)	2.1	2.5	3.4
	対 照	1.9	2.7	3.2

a. 37°C, 90分処理    b. HBSS 1 ml 中に静置

表5 アフィニティ・カラムクロマトグラフィーによる SIg 保有 TLT-1 細胞の分画と各分画における IBD 強毒ウイルス GBF-1 株の増殖

分 画	SIg 保有細胞の出現率(%)		蛍光抗原陽性細胞率(%)			
	IgM	IgG	ウイルス感染後の日数			
			1	3	5	
抗 $\mu$ 鎖血清 結合カラム	吸 着	77.4	0.8	16.6	19.4	16.9
	通 過	7.5	3.0	1.2	1.8	1.7
抗 $\gamma$ 鎖血清 結合カラム	吸 着	11.2	16.5	2.5	3.5	4.2
	通 過	27.6	0.1	6.6	7.4	6.6

このように、抗血清で処理した TLT-1 及び BK4484 細胞は強毒ウイルスの増殖が抑制されたが、抗 $\gamma$ または抗 $\alpha$ 鎖血清で処理した細胞ではウイルスの増殖が抑制されなかった。

#### 5 アフィニティ・カラムクロマトグラフィーによる SIg 保有 TLT-1 細胞の分画と各分画における強毒ウイルス GBF-1 株の増殖

TLT-1 細胞の SIg 保有細胞率は、 $\mu$ が20.4%、 $\gamma$ が1.3%及び $\alpha$ が1.2%であった(表5)。

TLT-1 細胞をアフィニティ・カラムクロマトグラフィーで SIg の相違により分画し、各分画細胞における SIg 保有細胞率と強毒ウイルスの増殖について検討した。

抗 $\mu$ 鎖血清結合アフィニティ・カラムクロマトグラフィーによる吸着分画では、各 SIg 保有細胞率は $\mu$ が77.4%、 $\gamma$ が0.8%で、この分画におけるウイルス感染72時間後の陽性細胞出現率は19.4%であった。これに対し、通過分画では、各 SIg 保有細胞率は $\mu$ が7.5%、 $\gamma$ が3.0%で、ウイルス感染72時間後の陽性細胞出現率は1.8%であった。一方、抗 $\gamma$ 鎖血清結合アフィニティ・カラムクロマトグラフィーによる吸着分画では、各 SIg 保有細胞率は $\mu$ が11.2%、 $\gamma$ が16.5%で、ウイルス感染72時間後の陽性細胞出現率は3.5%であった。これに対し、通過分画では、各 SIg 保有細胞率は $\mu$ が27.6%、 $\gamma$ が0.1%で、ウイルス感染72時間後の陽性細胞出現率は7.4%であった。

このように、SIg (M) 保有細胞の分布が高率な分画ほど、ウイルス抗原の陽性細胞出現率は高かった。一方、SIg (G) 保有細胞の分布とウイルス抗原の陽性細胞出現率の間には明らかな関係は認められなかった。

## 考 察

IBDウイルス感染雛のBFを中心に電子顕微鏡及び蛍光顕微鏡による観察からウイルスの初感染細胞がリンパ球かあるいはマクロファージであるかについて論じられてきたが、未だ見解は一致していない。ウイルス粒子がBFのリンパ球及びマクロファージの両細胞質内に観察されると報告したのは Asdrubari & Mugghetti<sup>23)</sup>, Käufer & Weiss<sup>24)</sup>, Naqi & Miller<sup>25)</sup> 及び Mandelli & Valeri<sup>26)</sup> である。一方、リンパ球の細胞質内にウイルス粒子が認められないと報じたのは、Mandelli *et al.*<sup>27)</sup>, Lunger & Muddux<sup>28)</sup>及び Chivelle<sup>29)</sup> である。また、Chivelle<sup>29)</sup> はウイルス特異抗原が主にマクロファージの細胞質内に認められ、リンパ球の細胞質内には認められないことを報告した。一方、Müller *et al.*<sup>30)</sup> はウイルス特異抗原がマクロファージ、リンパ球及びその他の細胞の細胞質内に認められることを報告した。このように、IBDウイルスの初感染細胞についての見解は分かれている。しかし、Hirai *et al.*<sup>4)</sup> は、マクロファージを特異的に破壊するシリカを投与した雛にIBDウイルス強毒株を接種すると、B細胞の低下が対照とほとんど変わらないことを観察し、マクロファージは強毒ウイルスの標的細胞ではないことを示唆した。今回著者らの成績は、強毒ウイルスが培養マクロファージで全く増殖しなかったことを示した。このことは、IBDウイルスの初感染細胞がマクロファージでないことを *in vitro* の系から示唆している。Asdrubali & Mugghetti<sup>23)</sup> 及び Chivelle<sup>29)</sup> が示唆したように、マクロファージの細胞質内にIBDウイルス粒子及びウイル



ス抗原が認められるのは、ウイルスに感染し崩壊リンパ球をマクロファージが貪食した結果であると考えるのが妥当であろう。また、リンパ球の細胞質内にウイルス粒子及び抗原が認められないという報告の理由として、Chivelle<sup>29)</sup>は、ウイルス感染リンパ球が極めて初期に崩壊し、マクロファージに貪食されること及びウイルス粒子は感染の初期にリンパ球内に分散しその検出が困難であることなどを記載している。

I B Dウイルスの鶏胚馴化株は、C E F細胞他2・3の培養細胞でC P Eを伴い増殖する<sup>9,11,31)</sup>。著者らは、各種鶏胚馴化ウイルスが強毒ウイルスと異なり、培養マクロファージにおいて増殖することを明らかにした。Enjuanes *et al.*<sup>32)</sup>は、アフリカ豚コレラウイルスの強毒株はヒトの培養マクロファージにC P Eを示さず、増殖しないが、Vero細胞馴化株はC P Eを示すことを、Linderman *et al.*<sup>33)</sup>は、鶏のインフルエンザウイルスはマウスの培養マクロファージで増殖しないが、マウス馴化株は増殖することを報告した。即ち、I B Dウイルス強毒株及び鶏胚馴化株のマクロファージにおける増殖態度は、上述のアフリカ豚コレラウイルス並びに鶏のインフルエンザウイルスと類似し、細胞への馴化によりウイルスの宿主細胞域に変異が起きたと解されよう。

鶏由来腫瘍細胞のなかでI B D鶏胚馴化ウイルス及び強毒ウイルスが増殖する細胞はT L T-1及びB K 4484細胞の2株であった。両細胞における鶏胚馴化ウイルスの特異蛍光抗原の陽性細胞出現率は、T L T-1細胞よりB K 4484細胞の方が高かったが、強毒ウイルスではT L T-1細胞が逆に高かった。この理由は明らかでなかった。著者らは鶏由来の腫瘍細胞を用いて、SIg (M) 保有細胞の分布が高率な細胞ほどウイルス特異蛍光抗原の陽性細胞出現率が高く、SIg (G) 及びSIg (A) 保有細胞の分布と強毒ウイルスのそれとの間には明らかな関係が認められないことを示した。また、抗 $\mu$ 鎖血清で処理した細胞は強毒ウイルスの増殖が抑制され、抗 $\gamma$ 及び抗 $\alpha$ 鎖血清で処理した細胞では抑制されないことを示した。Hirai & Calnek<sup>5)</sup>は、I B D強毒ウイルスは鶏リンパ性白血病由来腫瘍細胞 (B細胞) で増殖するが、マレック病由来腫瘍細胞 (T細胞) では増殖しないこと、B F、脾臓、胸腺及び末梢血由来リンパ球でのI B D強毒ウイルス感染率はB細胞の臓器内分布と平行すること、また、B F由来リンパ球を抗B細胞血清及び抗IgM血清で前処理すると強毒ウイルスは感染しないことを報告した。Nakai & Hirai<sup>6)</sup>は、B F及び胸腺からアフィニティ・カラムクロマトグラフィーを用い高純度のリンパ球を分画し、これら分画細胞における強毒ウイルスの感染率はSIg (M)-B細胞の多い分画において最も高いことを述べた。また、Hirai *et al.*<sup>7)</sup>は、強毒ウイルス感染1日齢及び4週齢雛のSIg-B細胞の変動を観察し、SIg(M)-B細胞はSIg(G)-B細胞より約48時間早く著明に減少することを報告した。これらの結果から、彼らはI B D強毒ウイルスの標的細胞がSIg (M)-B細胞であることを示唆した。今回著者らの成績からも、この考えは強く支持された。

I B Dウイルス感染雛は、ワクチンはじめ異種抗原に対する抗体産生が抑制されることが報告されている<sup>1,2,3)</sup>。I B Dウイルスによる免疫抑制の機序については、最近、Nakai & Hirai<sup>6)</sup>及びHirai *et al.*<sup>7)</sup>は*in vitro*及び*in vivo*の実験系から、I B DウイルスによるB F内幼若SIg (M)-B細胞と末梢でSIgを持つ抗体産生前駆及び記憶B細胞の破壊が基本となることを示唆した。腫瘍細胞を用いた著者らの実験結果からもI B D強毒ウイルスの標的細胞がSIg (M)-B細胞であることを示唆し、I B Dウイルスによる免疫抑制機序の基本はSIg (M)-B細胞の直接的破壊によると考えられた。

## 謝 辞

本研究の一部は昭和58及び59年度文部省科学研究費一般研究 (B) No.58480082の補助金によって行われた。記して謝意を表したい。

## 文 献

- 1) Faragher, J. T., Allan, W. H. & Cullen, G. A. : Immunosuppressive effect of infectious bursal agent in the chicken. *Nature* **237** : 118-119, 1972.
- 2) Giambone, J. J., Edison, C. S., Page, R. K., Fletcher, O. J., Barger, B. O. & Kleven, S. H. : Effect of

- infectious bursal agent on the response of chickens of Newcastle disease and Marek's disease vaccination. *Avian Dis.* **20** : 534-544, 1977.
- 3) Hirai, K., Shimakura, S., Kawamoto, E., Taguchi, F., Kim, S. T., Chang, C. N. & Iritani, Y. : The immunodepressive effect of infectious bursal disease virus in chickens. *Avian Dis.* **18** : 50-57, 1974.
  - 4) Hirai, K., Kunihiro, K. & Shimakura, S. : Characterization of the immunosuppression of chickens by infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* **23** : 950-965, 1979.
  - 5) Hirai, K. & Calnek, B. W. : In vitro replication of infectious bursal disease virus in established cell lines and B lymphocytes. *Infect. Immun.* **25** : 964-970, 1979.
  - 6) Nakai, T. & Hirai, K. : In vitro infection of fractionated chicken lymphocytes in infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* **25** : 831-838, 1981.
  - 7) Hirai, K., Funakoshi, T., Nakai, T. & Shimakura, S. : Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens. *Avian Dis.* **25** : 484-496, 1981.
  - 8) Hirai, K., Shimakura, S., Chang, C. N., Adachi, Y., Kawamoto, E., Taguchi, N., Suzuki, Y., Itakura, C., Funahashi, F., Tsushio, Y. & Hirose, M. : Isolation of infectious bursal disease virus and distribution of precipitating antibodies in chicken sera. *Jpn. J. Vet. Sci.* **35** : 105-111, 1973.
  - 9) Petek, M., Dapile, P. N. & Cancellotti, F. : Biological and physico-chemical properties of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Avian Pathol.* **2** : 135-152, 1973.
  - 10) Nagabayashi, T., Izawa, H. & Soekawa, M. : The occurrence of cytopathic effect of an isolate of infectious bursal disease virus. *Kitazato Arch. Exp. Med.* **47** : 57-61, 1974.
  - 11) 若林忠男, 山口成夫, 川村 齊 : 伝染性ファブリキウス 嚢病ウイルスの細胞培養における増殖, 第79回日本獣医学会講演要旨, **85**, 1975.
  - 12) 馬場 威 : 'ニワトリのマクロファージ採取法', "免疫実験操作法B" 日本免疫学会編 915-916, 1975.
  - 13) Akiyama, Y. & Kato, S. : Two cell lines from lymphomas of Marek's disease. *Briken J.* **17** : 105-116, 1974.
  - 14) Hihara, N., Shimizu, T. & Yamamoto, H. : Establishment of tumor cell line cultures from chickens with avian lymphoid leukaemia. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, **14** : 163-173, 1974.
  - 15) Calnek, B. W., Murthy, K. K. & Schat, K. A. Establishment of Marek's disease lymphoblastoid cell lines from transplantable versus primary lymphomas. *Int. J. Cancer* **21** : 100-107, 1978.
  - 16) Hahn, E. C., Ramos, L. & Kenyon, A. J. : Lymphoproliferative disease of fowl : JM-V leukemic lymphoblasts in cell culture : Brief communication. *J. Natl. Cancer Inst.* **59** : 267-273, 1977.
  - 17) Benedict, A. A. : 'Production and purification of chicken immunoglobulins'. in "Methods in Immunology and Immunochemistry" Williams, C. A. and Chase, M. W. ed. Academic Press, New York **1** : 229-237, 1967.
  - 18) Levacq-Verheyden, A-M., Vaerman, J. P. & Heremans, J. F. : Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. *Immunology* **27** : 683, 1974.
  - 19) Rabellino, E., Colon, S., Grey, H. M. & Unanue, E. R. : Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I distribution and quantitation. *J. Exp. Med.* **133** : 156-162, 1970.
  - 20) Schlossman, S. F. & Lurie, H. : Specific purification of lymphocyte population on a digestive immunoabsorbent. *J. Immunol.* **110** : 314-315, 1973.
  - 21) 岸本忠三・平井義勝 : 'Affinity chromatography を応用した Immunoglobulin-bearing lymphocyte の除去' "免疫実験操作法B" 日本免疫学会編 1239-1246. 1978.
  - 22) Reed, L. J. and Muench, H. : A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27** : 493-497, 1938.
  - 23) Asdrubali, G. & Mugghetti, L. : Contributo alla conoscenza degli aspettiultrastrutturali della borsa di Fabrizio nella malattia di Gumboro sperimentale. *Nuova Vet.* **48** : 71-87, 1972.
  - 24) Kaufer, I. & Weiss, E. : Electronmicroscope studies on the pathogenesis of infectious bursal disease after intrabursal application of the causal virus. *Avian Dis.* **20** : 483-495, 1977.
  - 25) Naqi, S. A. & Miller, D. L. : Morphological changes in the bursa of Fabricius of chickens after inoculation with infectious bursal disease virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **40** : 1134-1139, 1978.
  - 26) Mandelli, G. & Valeri, A. : Reperti ultramicroscopici della borsa di Fabrizio nella malattia di Gumboro. *Folia Vet. Lat.* **2** : 785-821. 1972.

- 27) Mandelli, G., Rinaldi, A., Cerioli, A. & Cervio, G. Aspetti ultrastrutturali della borsa di Fabrizio nella malattia di Gumboro de pollo. *Atti. Soc. Itali. Sci. Vet.* **21** : 615-619, 1967.
- 28) Lunger, P. D. & Maddux, T. C. : Fine-structure studies of the avian infectious bursal agent. I. in vivo viral morphogenesis. *Avian Dis.* **16** : 874-893, 1972.
- 29) Chivelle, N. F. : Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen and thymus of the chicken. *Am. J. Pathol.* **51** : 527-551, 1967.
- 30) Müller, R., Käufer, I., Reinacher, M. & Weiss, E., : Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Zbl. Vet. Med. B,* **26** : 345-352, 1979.
- 31) Lukert, P. D. & Davis, R. B. : Infectious bursal disease virus : growth characterization in cell cultures. *Avian Dis.* **18** : 243-250, 1974.
- 32) Enjuanes, L., Cubero, I. & Viñuela, E. : Sensitivity of macrophages from different species to African swine fever (ASF) virus. *J. Gen. Virol.* **34** : 455-463, 1977.
- 33) Linderman, J., Deuel, E., Fanconi, S. & Hallar, O. : Inborn resistance of mice to myxoviruses : *J. Exp. Med.* **90** : 942-951, 1978.