

## ゲタウイルスを用いたヒトインターフェロン測定を試み

小木曾 すばる<sup>1,3</sup>, 白井 淳資<sup>2</sup>, 土屋 佳紀<sup>2</sup>, 本多 英一<sup>3</sup>

(1 第一製薬東京研究開発センター)

(2 独立行政法人・農業・生物系特定産業技術研究機構・動物衛生研究所・海外病研究部)

(3 東京農工大学・農学部獣医学科・獣医微生物学研究室)

インターフェロン (IFN) の抗ウイルス作用を指標とした生物活性の測定は、感度が高く抗ウイルス活性を直接反映するため、従来用いられてきた測定法である。しかし測定に使用されるウイルスは水疱性口炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus: VSV) に代表されるような、わが国では重要な海外病病原体や、シンドビスウイルスのようにヒトに重篤な感染症を起こす病原体であるため、IFN の抗ウイルス活性を測定する場合はその安全性に配慮する必要がある。そこで、家畜や人に対して危険性の少ない国内病病原体のゲタウイルスを用いた IFN の抗ウイルス活性の測定を 50 % CPE 抑制-クリスタルバイオレット染色法を用いて検討した。ヒト IFN- $\alpha$  の測定では、FL 細胞 (ヒト羊膜由来株化細胞) を用いると、ゲタウイルスを使用した IFN の測定感度が VSV を使用した場合よりも高く、測定した製品に記載された力価と同程度の測定感度を示した。単層になった FL 細胞に IFN 処理する単層処理法で測定した IFN 力価が、IFN 処理と細胞培養を同時に行うまき込み法で測定した IFN 力価に比べ高かった。このことから、ゲタウイルスを使用した単層処理法を用いれば、少量のヒト IFN の検出が可能であることが示唆された。MDBK 細胞を抗ウイルス活性の測定に用いた場合、IFN の測定感度は VSV の方がゲタウイルスを使用した場合よりも高感度であったが、測定に使用する細胞数およびウイルス力価を調整すればゲタウイルスを使用した場合でも、VSV を用いた場合と同程度の IFN 力価を示した。これらの結果より、ヒト IFN の測定にはゲタウイルスが使用可能であることが示された。

## 序 文

インターフェロン (Interferon; IFN) はウイルス増殖を interference (干渉) する物質として発見されたサイトカインの一種で [Isaacs et al., 1957, Nagano and Kojima, 1954], 抗ウイルス活性, 細胞増殖の抑制, MHC クラス I・II 抗原の誘導, 単核食細胞の活性化など, 主に免疫に

関わる多彩な生理活性を持つ物質である。IFN は大きく I 型と II 型に区別され, I 型 IFN はさらに IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$ ,  $\tau$  というサブファミリーに分類されている [Meager, 2002]. 全ての I 型 IFN の 3 次元構造は類似しており, pH 抵抗性など物理化学的性質において共通点が多く, 同じ受容体, あるいはよく似た構造の細胞表面受容体ファミリーを介して作用することが知られている [Meager, 2002, Mogensen et al., 1999]. II 型 IFN は IFN- $\gamma$  ただ一種類で, I 型 IFN と異なる機能と構造を持ち, 異なる細胞表面レセプターを認識し結合するが, I 型および II 型とも抗ウイルス活性を示す [Auget et al., 1988, Branca and Baglioni, 1981, Meager, 2002].

IFN の定量には, 生物活性を指標として力価を測定するバイオアッセイと, 活性タンパク質量を直接測る ELISA 法が用いられている。ELISA 法は簡便かつ安全な方法で, 近年 IFN の活性型と非活性型を区別するモノクローナル抗体

連絡先 白井淳資

〒 187-0022 東京都小平市上水本町 6-20-1

独立行政法人・農業・生物系特定産業技術研究機構・動物衛生研究所・海外病研究部

TEL : 042-321-1441

FAX : 042-325-5122

E-mail : epz1js@affrc.go.jp

の作製が進んでおり、活性型 IFN の測定法として期待される [Pestka et al., 1983]. しかし一方で、ELISA 法は IFN の生物活性を直接反映しないという報告もあり [Jabs et al., 1999], IFN のバイオアッセイに完全に代わるものと考えすることはできない. バイオアッセイの特徴は、感度に優れ活性型分子の量を直接反映する点にある. 多様な IFN の生物活性の中で、そのうちのどれを測定の指標とするかによって、抗ウイルス活性測定法 (antiviral assay), 細胞増殖抑制作用測定法 (antiproliferative assay) 及び生物免疫測定法 (bioimmunoassay) など様々な検査法が使用されている [Meager, 2002, Rubinstern et al., 1981]. また細胞内シグナル伝達経路において IFN の誘導するタンパク質の酵素活性量を測る方法や、感度の高いレポーター遺伝子測定法 (reporter gene assay) も開発されている [Canosi et al., 1996, Lewis, 1995].

抗ウイルス活性測定法は従来から用いられてきた IFN 測定法で、現在でも IFN は抗ウイルス力価で表示するのが常法となっている [Meager, 2002, Meager et al., 2001]. この方法は感度が高く、極めて低濃度の IFN をも測定することができる. 抗ウイルス活性測定法では、種々の IFN 測定用のウイルス (チャレンジウイルス) と細胞を組み合わせ用いる. IFN 測定時に用いられるウイルスは水疱性口炎

ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus; VSV), シンドビスウイルス, 脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis Virus; EMCV), Mengovirus などである [小林茂保, 1984, Meager, 2002]. しかし、これらのウイルスの多くはわが国に存在しない海外病病原体であり、しかもほとんどが人へ感染する危険度の高い病原体である. 特に、通常抗ウイルス活性測定に用いられている VSV は家畜 (ウマ, ウシ, ブタ, ヒツジ, ヤギなど) に感染し畜産業に多大な被害をもたらす家畜の重要な疾病であるため、わが国では法定伝染病に指定されている. このためウイルスの使用にあたっては、家畜伝染病予防法 (昭和 26 年 5 月 31 日法律第 166 号, 平成 16 年 6 月 2 日法律第 68 号; 家畜伝染病予防法の一部を改正する法律により改正) の第 4 章: 輸出入検疫第 36 条輸入禁止の項で輸入禁止品として扱われ、試験研究に使用する際にも農林水産大臣の許可を要する. EMCV は、ピコルナウイルス科のカルディオウイルス属に属し、宿主域が広く特にブタに感受性が高い. 哺乳豚が感染すると心筋炎を起こしてほぼ 100% 突然死する. 離乳後の豚は不顕性感染であるが、妊娠豚が感染すると流産の原因となる. また、マウスやラットも高感受性動物で致命的である. さらに EMCV はブタからヒトに感染するとの報告もある [Brewer et al., 2001, Gajdusek, 1955]. 同様に海外病病原

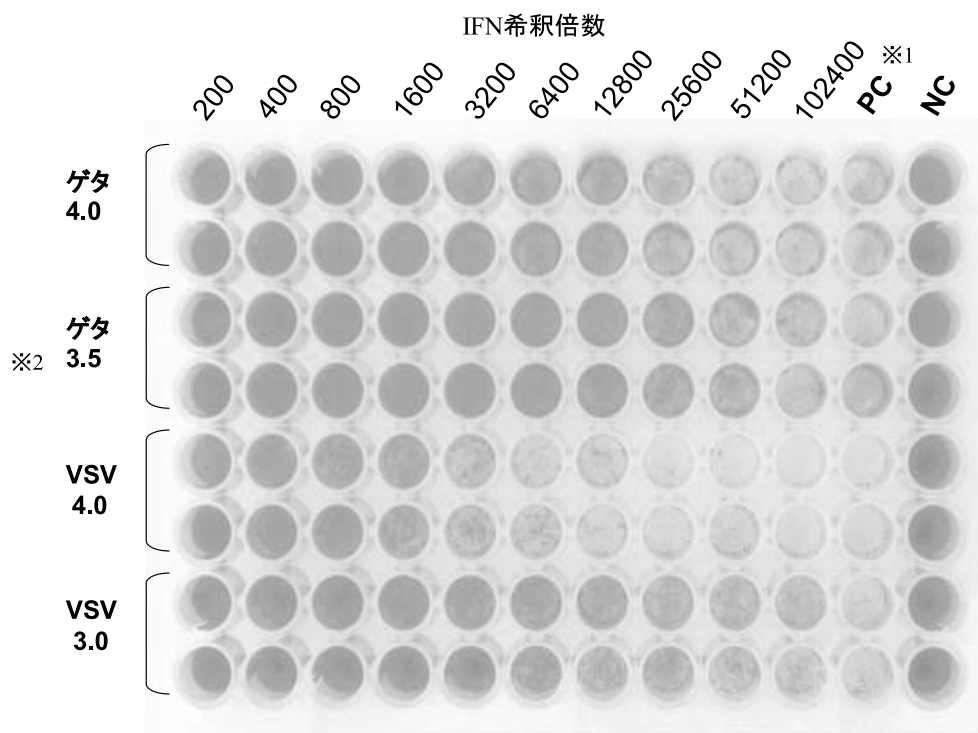
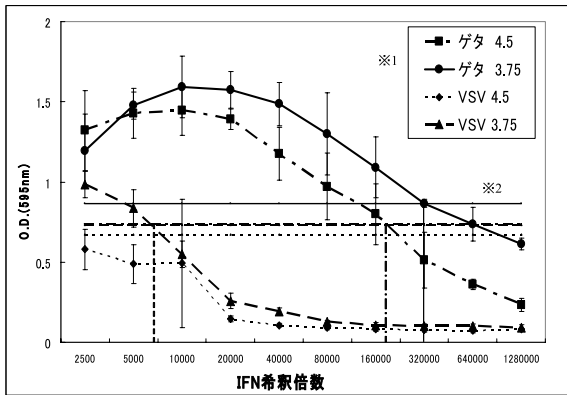


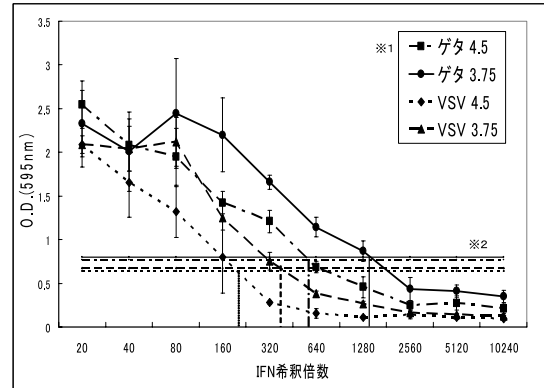
図 1 FL 細胞による天然ヒト IFN (HAYASHIBARA CO. LTD., Okayama, Japan) の測定例

※ 1. PC : 陽性対照、NC : 陰性対照

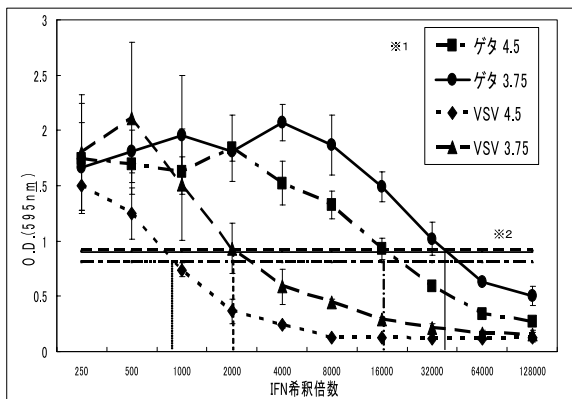
※ 2. 用いたウイルスとウイルス感染価を示す (logTCID<sub>50</sub>/0.1ml)



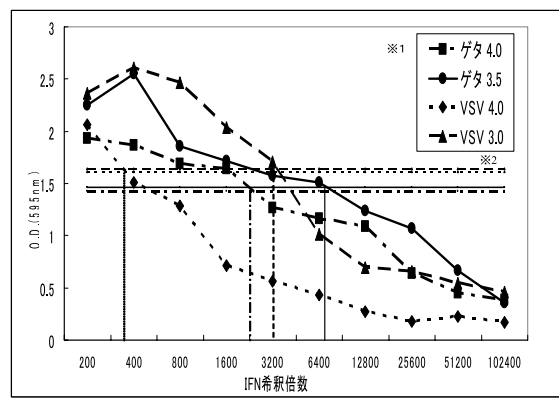
組換えヒト IFN- $\alpha$  (Pepero Tech EC Ltd, London, UK)



組換えヒト IFN- $\beta$  (Pepero Tech EC Ltd, London, UK)



組換えヒト IFN- $\gamma$  (Pepero Tech EC Ltd, London, UK)



天然ヒト IFN- $\alpha$  (HAYASHIBARA CO. LTD., Okayama, Japan)

図 2 FL 細胞によるヒト IFN の測定例

- ※ 1. 用いたウイルスとウイルス感染価を示す (logTCID<sub>50</sub>/0.1ml).
- ※ 2. 陰性対照 OD + 陽性対照 OD の 1/2OD の値を測定サンプルの線種と同種類の線 (ゲタウイルス：●実線, ■一点鎖線, VSV：▲破線, ◆点線) で示す。

体のシンドビスウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に属し、蚊の吸血により媒介され、ヒトに感染し高熱、頭痛、皮疹および強度の関節痛などの症状をもたらす、好神経性のウイルスである [Kurkela et al., 2005, Laine et al., 2004]. また過去に IFN の測定に用いられていた西部馬脳炎ウイルスもトガウイルス科アルファウイルス属に属する海外病原体で、人に感染し非化膿性脳炎を起こすウイルスである [Charles and Calisher, 1994]. そこで本研究では従来のチャレンジウイルスに替わり、より安全性が高く特別な制限を受けることなく使用出来るウイルスを IFN 測定に使用できるか否かを検討した。

材料と方法

ウイルスおよび細胞：IFN 測定用チャレンジウイルスとして、VSV・ニュージャージー株 [Jenny et al., 1958] お

よびゲタウイルス・ハルナ株 [Matsuyama et al., 1967] を使用した。それぞれのウイルスは IFN 測定に使用する細胞で数回継代したものをを用いた。ウイルス増殖及び IFN 測定には、ヒト羊膜由来株化細胞である FL 細胞 [Imanishi et al., 1981] (CCL-62, DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO. LTD., Osaka, Japan), ウシ腎由来株化細胞の MDBK 細胞 [Stebbing N. and May L., 1982] をを用いた。FL 細胞および MDBK 細胞は 5% FCS 加 MEM 培養液により培養維持した。

IFN：測定に用いたヒト IFN は市販されている標準品を用い力価測定を行っている代表的な以下の製品を国際および国内標準品の代用として使用した。組換えヒト IFN- $\alpha$  (Pepero Tech EC Ltd, London, UK), 組換えヒト IFN- $\beta$  (Pepero Tech EC Ltd, London, UK), 組換えヒト IFN- $\beta$

表1 FL細胞およびMDBK細胞を用いゲタウイルスとVSVにより測定した市販ヒトIFNの測定結果

IFN	製造元	製造元が測定に用いた細胞とウイルス	製品に記載されている力価(U/0.1ml)	測定に用いた細胞	測定に用いたウイルスと力価(logTCID <sub>50</sub> /0.1ml)	測定法	測定力価(U/0.1ml)	相対感度*	
組換えヒトINF-α	Peppo Tech EC Ltd	記載なし	360,000	FL	ゲタウイルス	4.5	まき込み法	193,333	0.537
					ゲタウイルス	3.75		313,333	0.87
					VSV	4.5		—**	—
					VSV	3.75		6,250	0.017
					ゲタウイルス	4.5	単層処理法	2,400,000	6.667
					ゲタウイルス	3.75		3,200,000	8.889
					VSV	4.5		43,750	0.122
					VSV	3.75		100,000	0.278
天然ヒトINF-α	Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.	FL細胞—シンドビスウイルス	12,700	FL	ゲタウイルス	4	まき込み法	2,400	0.189
					ゲタウイルス	3.5		6,400	0.504
					VSV	4		350	0.028
					VSV	3		3,200	0.252
					ゲタウイルス	4	単層処理法	30,000	2.36
					ゲタウイルス	3.5		48,000	3.78
					VSV	4		2,250	0.177
					VSV	3		2,250	0.177
組換えヒトINF-β	Peppo Tech EC Ltd	記載なし	4,000	FL	ゲタウイルス	4.5	まき込み法	587	0.147
					ゲタウイルス	3.75		1,514	0.379
					VSV	4.5		200	0.05
					VSV	3.75		340	0.085
					ゲタウイルス	4.5	単層処理法	3,200	0.8
					ゲタウイルス	3.75		4,800	1.2
					VSV	4.5		500	0.125
					VSV	3.75		600	0.3
組換えヒトINF-β	PBL Biochemical Lab, Vero細胞 - VSV	記載なし	2,000	FL	ゲタウイルス	4	まき込み法	50	0.025
					ゲタウイルス	3.5		320	0.16
					VSV	4		30	0.015
					VSV	3.5		40	0.02
					ゲタウイルス	4	単層処理法	560	0.28
					ゲタウイルス	3.5		640	0.32
					VSV	4		60	0.03
					VSV	3.5		100	0.05
組換えヒトINF-γ	Peppo Tech EC Ltd	記載なし	40,000	FL	ゲタウイルス	4.5	まき込み法	19,200	0.48
					ゲタウイルス	3.75		37,066	0.927
					VSV	4.5		916	0.023
					VSV	3.75		2,000	0.05
					ゲタウイルス	4.5	単層処理法	101,333	2.53
					ゲタウイルス	3.75		181,333	4.53
					VSV	4.5		2,833	0.07
					VSV	3.75		3,533	0.0883
組換えヒトINF-γ	R&D System Inc.	HeLa細胞 - EMCV	10,000	FL	ゲタウイルス	4	まき込み法	4,000	0.4
					ゲタウイルス	3.5		9,600	0.96
					VSV	4		100	0.01
					VSV	3.5		200	0.02
					ゲタウイルス	4	単層処理法	16,000	1.6
					ゲタウイルス	3.5		22,400	2.24
					VSV	4		—	—
					VSV	3.5		250	0.025
組換えヒトINF-α	Peppo Tech EC Ltd	記載なし	360,000	MDBK	ゲタウイルス	4	まき込み法	50,000	0.138
					ゲタウイルス	3.5		70,000	0.194
					VSV	3.5		70,000	0.194
					VSV	2.5		120,000	0.333
					ゲタウイルス	4	単層処理法	28,000	0.156
					ゲタウイルス	3.5		40,000	0.222
					VSV	3.5		50,000	0.278
					VSV	2.5		80,000	0.444

\*相対感度=実測力価/市販品記載力価、\*\*：測定不能

(PBL Biochemical Laboratories, Piscataway, NJ, USA), 組換えヒト IFN- $\gamma$  (Pepro Tech EC Ltd, London, UK), 組換えヒト IFN- $\gamma$  (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) および天然ヒト IFN- $\alpha$  (HAYASHIBARA CO. LTD., Okayama, Japan) を実験に用い, 各製品はそれぞれ無血清培地 (MEM) で測定開始に用いる原液としての濃度に希釈し-80℃に保存したものを使用した。

**IFN の測定:** 50% CPE 抑制-クリスタルバイオレット染色法を用い, それぞれの IFN についてまき込み法と単層処理法での測定を試みた [Rbinstein et al., 1981, 小林茂保, 1984]. まき込み法は, 培地で IFN 液を適当倍数に希釈し, 96 穴マイクロプレートで 2 倍段階希釈を行い, 細胞浮遊液を 2 倍段階希釈した IFN 液を入れた 96 穴マイクロプレートに 100  $\mu$  l/well ずつ加え, 炭酸ガスふ卵器で 37℃, 約 24 時間培養し, 単層細胞が形成されているのを確認した後にチャレンジウイルスを接種した. 対照として, ウイルス接種のみを行う陽性対照と, IFN (-)・ウイルス (-) の細胞を培養しただけの陰性対照を設けた. VSV およびゲタウイルスとともにそれぞれ 2 種類の感染価に調整したウイルス液を作製し, 各 well の上清を除去した後にウイルス液を 100  $\mu$  l/well ずつ接種し, 炭酸ガスふ卵器で 37℃一晩培養した. 測定は陽性対照に CPE が明瞭にあらわれた時点で, クリスタルバイオレットによる染色を行い, 陰性対照の OD 値と各感染価のウイルスのみを接種した陽性対照の OD 値を加算し, その値の 1/2 の OD 値に一致する IFN 測定サンプルの希釈倍数をもって, それぞれ IFN の測定値とした. 染色は 0.25% クリスタルバイオレット溶液 (10% メタノールおよび 7.5% ホルマリン含) を 100  $\mu$  l/well ずつ加え行い, 1~2 時間室温において固定・染色を確実に行った後水洗し, ELISA リーダーの波長 595 nm で OD 値を測定した. 得られたデータはパーソナルコンピューターにより回帰直線を求め, 1/2 OD 値, すなわち 50% CPE 抑制を示す IFN の希釈倍数の逆数をもって実測値とした (1/2 OD 値 = 50% CPE 抑制値 = 細胞コントロールの吸光度 + ウイルスコントロールの吸光度 / 2). 測定値の列によるばらつきを考慮し, 同一サンプルを必ず 2 列を用いて測定し, OD 値は 2 列の平均値をもってデータとした.

単層処理法は 96 穴マイクロプレートで細胞浮遊液 100  $\mu$  l/well を一晩培養して得た単層細胞に, 2 倍段階希釈した IFN 液を 100  $\mu$  l/well ずつ接種した後, 炭酸ガスふ卵器で 37℃一晩培養し, IFN で細胞を処理した. 翌日, まき込み法と同様にチャレンジウイルスを接種し, 一晩培養後, 0.25% クリスタルバイオレット溶液にて細胞を固定・染色し, まき込み法と同様に測定値を求めた.

## 成績

### FL 細胞におけるヒト IFN の測定

ゲタウイルスの感染価をそれぞれ 4.5 および 3.75 (logTCID<sub>50</sub>/0.1ml), 又は 4.0 および 3.5 (logTCID<sub>50</sub>/0.1ml), VSV の感染価はそれぞれ 4.5 および 3.75 (logTCID<sub>50</sub>/0.1ml), 又は 4.0 および 3.0 (logTCID<sub>50</sub>/0.1ml) に調整し, チャレンジウイルスとして接種した. 実際測定に用いたプレートの染色標本を図 1 に示し, 測定により得られた OD 曲線のグラフとそれぞれのヒト IFN の測定結果を図 2 に示した. その結果から, ゲタウイルスをチャレンジウイルスとして用いた方が VSV に比べウイルス増殖の抑制が強くなり, IFN の測定値が高く示された. 表 1 には測定を行った全ての成績を示し, IFN 測定感度の指標として, 市販品に記載されている力価と本試験による測定値を比べ, その値を相対感度 (測定力価/市販品力価) として表示した. 市販品は国際標準品に対応した価を示しているため, ここでは標準品の代用として測定の参照品として用いた. 全般的に単層処理法で測定した感度が, まき込み法のそれに比べ高値を示し, 最も高い感度を示したのは組換えヒト IFN- $\alpha$  (Pepro Tech EC Ltd, London, UK) を単層処理法で測定した場合で, 相対感度は 6.667~8.889 を示したが, ヒト IFN- $\beta$  は測定した 1 社の製品では単層処理法でも, 商品に記載された測定値よりも低い値を示した. なお, Pepro Tech EC Ltd 製品のヒト IFN- $\beta$  では, ゲタウイルスの単層処理法で相対感度 1.2 を示した. ヒト IFN- $\alpha$  は組換えのものも, 天然のものもゲタウイルスを用いてまき込み法および単層処理法いずれの方法でも, 高感度で測定することが可能であることが示された. またヒト IFN- $\gamma$  も 2 社の製品とも, まき込み法および単層処理法のいずれにおいても高感度で測定可能であった. 今回試みたすべてのヒト IFN 製品で, ゲタウイルスを用いた測定が, VSV を用いた場合に比べて感度が高く, ヒト IFN- $\alpha$  および  $\gamma$  ではまき込み法による測定が可能なが示された. FL 細胞でゲタウイルスを用いた IFN 測定の再現性を評価するため, 反復測定を行い, 変動係数を求めた. その結果, まき込み法における変動係数はヒト IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  共に 8% 未満であり比較的良好な成績を示した. 単層処理法では測定感度がまき込み法に比べて高いものの, ゲタウイルスを用いたときの変動係数の最大値は 10% を示し, まき込み法と比較して若干再現性の劣る結果となった.

### MDBK 細胞におけるヒト IFN- $\alpha$ の測定

MDBK 細胞を用いた場合のゲタウイルスによるヒト IFN- $\alpha$  測定条件を調べた結果, まき込み法でプレートに培養する細胞数を 40,000 個/well を超えないように設定し, ウイルス感染価を 3.5logTCID<sub>50</sub>/0.1ml 以上に調節することによって, VSV とほぼ同程度の感度で測定できることが示された (図 3). しかしゲタウイルスを用いた場合, 単層処理法においては常に, またまき込み法でも培養細胞数が多い場合は, ウイルスの CPE が明瞭に現れないかまったく現れな

いことがあり測定が困難であった。VSV を用いた場合は、まき込み法では培養細胞数に関係なく測定することが出来た。MDBK 細胞を用いた場合は、VSV を用いた測定がゲタウイルスを用いた場合に比べ感度が高かった。

判定時間の違いによる IFN 測定値の変動

判定時間の違いが IFN 測定に与える影響を調べるため、FL 細胞でウイルスチャレンジから 27 時間後および 48 時間後に判定を行った場合の測定結果を比較した。その結果、図 4 に示すように、ゲタウイルスでは、測定時間が 27 時間後でも 48 時間後でもほとんど変動が無く、48 時間後に判定した方が 27 時間判定後のそれに比べて多少低くなる傾向がみられたが値はあまり変わりがなく、測定時間が多少長くなってもあまり影響がないことを示した。しかし VSV を用いた場合は、48 時間後の判定では CPE が進み、測定値が 27 時間後判定の測定値の 1/20 にまで低下し、判定時間の超過により IFN の測定結果に大きな影響を与えることが示された。

考 察

研究や製薬開発、臨床検査などで、現在も IFN の抗ウイ

ルス活性の測定が頻繁に行われており、この IFN の抗ウイルス活性の測定は、チャレンジウイルスと呼ばれるある種のウイルスを IFN 処理後の細胞に接種し、そのウイルスの増殖抑制を指標に IFN 力価を測定する方法が用いられている [Meager, 2002, Meager et al., 2001, Rubinsterin et al., 1981]。抗ウイルス活性の測定は従来から行われてきた IFN のバイオアッセイの一つで、IFN の細胞処理、チャレンジウイルスの接種、実測力価の測定、標準 IFN の実測力価を用いたサンプルの補正力価算出という 4 つの方法から成り立っている。IFN をバイオアッセイで測定する以上、測定感度は測定条件によって変動する。そこで、未知濃度の IFN 試料を測定する際には、既知力価の標準品を同時測定して国際単位 (IU/ml) として補正する方法がとられている [小林茂保, 1984, Meager, 2002, 山崎修道, 1981]。今回の試験では国際標準の代替として、この方法により力価測定された市販品を標準品として使用し、ゲタウイルスが IFN の測定に使用可能であるかどうかを検討した。

IFN 測定時に用いるチャレンジウイルスには、従来から VSV、シンドビスウイルス、脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis Virus; EMCV)、Mengovirus などが使用されている [小林茂保, 1984, Meager, 2002]。しか

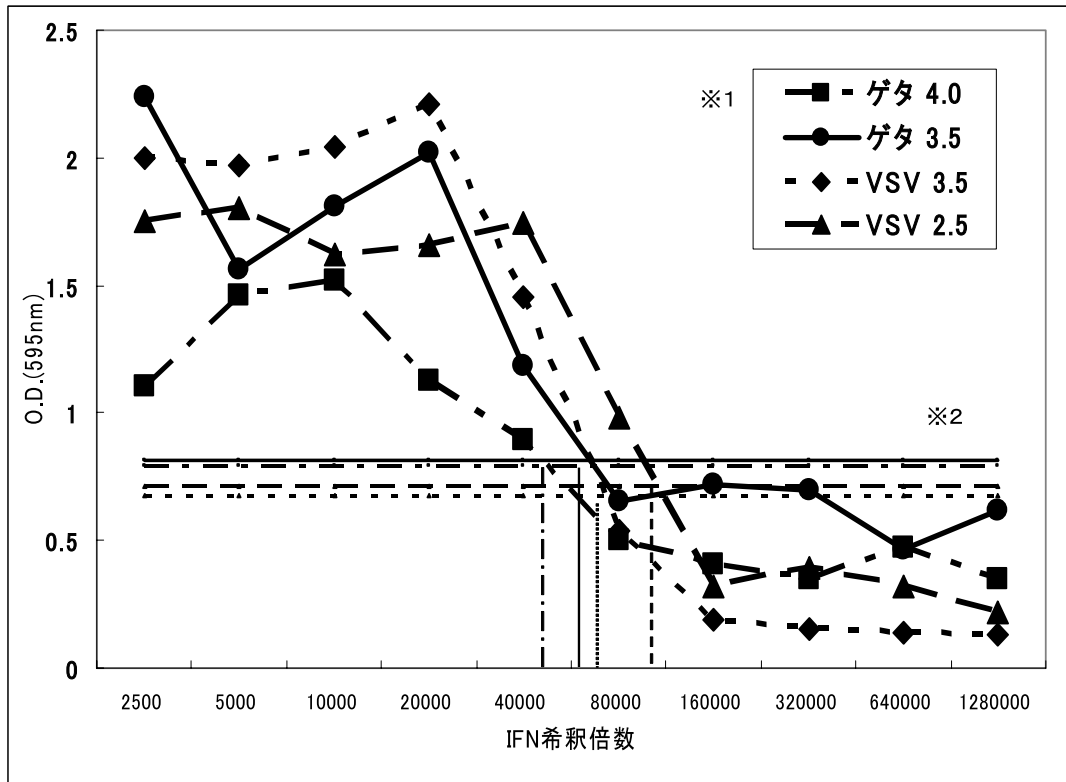


図 3 MDBK 細胞での組換えヒト IFN-α (Peprro Tech EC Ltd, London, UK) の測定
※ 1. 用いたウイルスとウイルス感染価を示す (logTCID<sub>50</sub>/0.1ml)。
※ 2. 陰性対照 OD + 陽性対照 OD の 1/2OD を測定サンプルの線種と同種類の線 (ゲタウイルス : ●実線 3.5logTCID<sub>50</sub>/0.1ml, ■一点鎖線 4.0logTCID<sub>50</sub>/0.1ml, VSV : ▲破線 2.5logTCID<sub>50</sub>/0.1ml, ◆点線 3.5logTCID<sub>50</sub>/0.1ml) で示す。

しこれらのウイルスの多くはわが国に存在しない海外病原原体であり、しかもほとんどがヒトに感染することからバイオハザードの点で問題がある。VSVはラブドウイルス科ベシクロウイルス属に属するウイルスで、家畜に感染し水疱性病変をもたらす口蹄疫類似疾病であるため国際獣疫事務局（Office International des Epizootie : OIE）の規定では危険度の最も高いリスト A の疾病に、またわが国では法定伝染病に指定されており農林水産分野では重要な病原体である。使用に際しては農林水産大臣の許可が必要であり、動物接種試験に際しては使用施設の制限もある。また 2004 年 6 月に成立した「武力攻撃事態等における国民の保護のための措置に関する法律（国民保護法）」に基づき、生物・毒素兵器の原料として使用しうる可能性のある生物剤・毒素に VSV は含まれており、その扱いおよび管理には万全を期すように経済産業省から通達を受けている。そして VSV の野外株は感染動物の水疱に直接触れる機会の多い農夫や獣医師などに発熱や悪寒、筋肉痛などインフルエンザ様症状をもたらす人獣共通感染症のウイルスとも言われている [Johnson et al., 1966]。

本研究のチャレンジウイルスの候補として、ヒト IFN の測定に用いられているシンドビスウイルスと同じトガイ

ルス科アルファウイルス属に属するゲタウイルスを選択した。本ウイルスは日本国内に広く分布し、馬および豚に疾病を起こす。しかし病原性は弱く、馬は、発熱、発疹、浮腫を引き起こすことがあるが死に至ることはなく、ほとんどの感染馬が元気、食欲を保ったまま 1 週間ほどで回復する [Kamada et al., 1980, Kono et al., 1980, Sentsui and Kono, 1980]。さらに日本では不活化ワクチンが広く使用されているため、本病の発生はほとんどない。豚は本ウイルスの増幅動物と考えられ、妊娠豚の死産、新生豚の神経症状や死亡の原因となる [Izumida et al., 1988, Kawamura et al., 1987, Shibata et al., 1991, 豊満義邦, 1990, Yago et al., 1987] が、発生数はきわめて少なく大きな問題とはなっていない。ゲタウイルスの分布する地域に生息する動物の抗体価を調べた調査結果から、馬、豚の他に山羊、牛、犬、鶏、一部の野鳥などにもゲタウイルスが感染することが知られている [Li et al., 1992, Sanderson, 1969]。しかし、馬と豚以外の動物や人における病気の発生は報告されていない。ゲタウイルスを IFN 測定用のウイルスとして本試験に用いた理由は、シンドビスウイルスや西部馬脳炎ウイルスと同じトガイウイルス科アルファウイルス属に属するため、当ウイルスは種々の細胞での増殖能、高い IFN 感受性、明瞭な

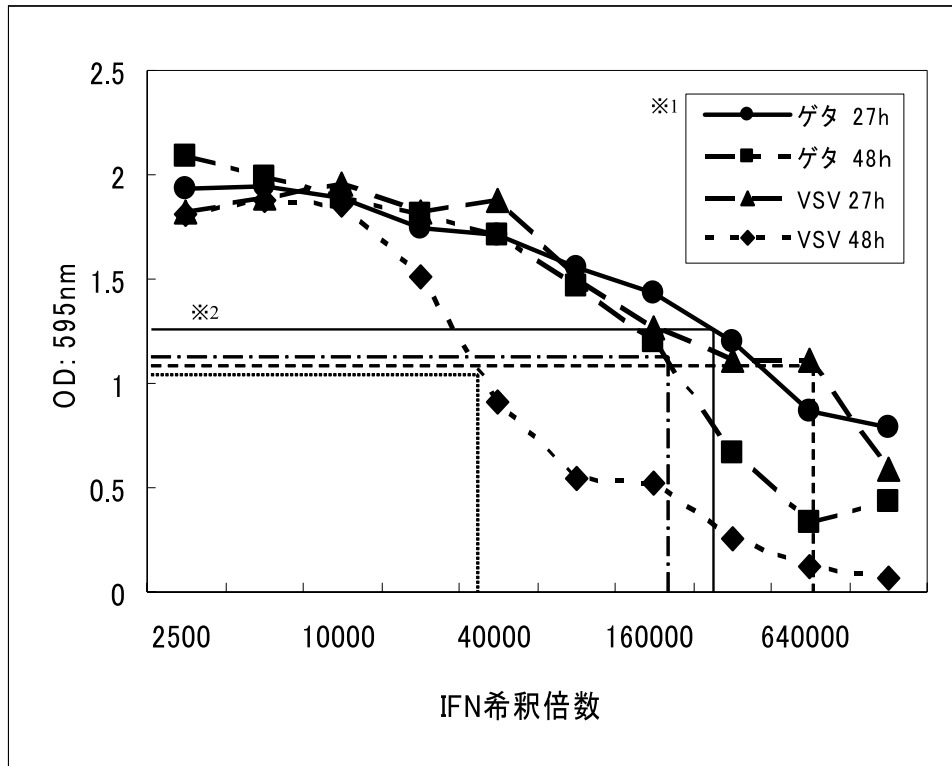


図 4 FL 細胞による組換えヒト IFN- $\alpha$  のウイルスチャレンジ後の測定時間の違いによる力価の比較

※ 1. 用いたウイルスとウイルス感染価を示す ( $\log_{10}TCID_{50}/0.1ml$ )。

※ 2. 陰性対照 OD + 陽性対照 OD の 1/2 OD を測定サンプルの線種と同種類の線 (ゲタウイルス: ●実線 27 時間後判定, ■一点鎖線 48 時間後判定, VSV: ▲破線 27 時間後判定, ◆点線 48 時間後判定) で示す。

CPEの出現というチャレンジウイルスに有利な条件を満たすのではないかと考えたからである。FL細胞はVSVやシンドビスウイルスとの組み合わせで抗ウイルス活性の測定に使用されており〔Meager, 2002〕, ヒトIFNによく反応すると思われるため, 今回ゲタウイルスを用いた測定に使用した。今回の試験ではゲタウイルスとその対照として, 一般的に多く利用されているVSVを使用した。

ヒトIFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ の測定結果は, VSVを用いた場合に比べゲタウイルスを用いた時の測定感度が高かった。単層処理法を用いると, ヒトIFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ともに高い感度で測定でき, まき込み法の2~6倍以上の力価を示した。単層処理法は感度が高いため実験サンプル中の少量のIFN測定には応用できるものと考えられる。今回単層処理法を測定試験に加えた理由は, ヒトIFN- $\beta$ の測定でまき込み法のみでは感度が低かったため, 単層処理法も行い, その他のヒトIFNについてもまき込み法に比べてどの程度感度が高いのかをみるために行った。ただ単層処理法は, 変動係数が10%を示す場合もあり再現性が劣ると考えられるため通常の測定法としては適さないと思われる。ヒトIFN- $\beta$ は, 製品や測定方法によっては実測力価が市販品力価を下回った。しかし, 市販品力価の測定手技が詳しく記載されていなかったため, 一概にゲタウイルスを用いた場合の感度が低いのか否かは判断できなかった。組換えヒトIFN- $\alpha$ および2社製造の組換えヒトIFN- $\gamma$ は, まき込み法で市販品に記載してある測定力価とほぼ同等の価を示した。ゲタウイルスにより天然ヒトIFN- $\alpha$ およびPepro Tech EC社製のヒトIFN- $\beta$ をまき込み法で測定した場合の測定値の相対感度は, それぞれ0.504および0.379で, 測定値が市販品の表示力価に比べ一桁だけ低いことを示すもので, 力価としては大きく違わないことを示唆している。このようなことと, 測定値の変動係数から良好な再現性を示すことから, FL細胞でゲタウイルスを用いたまき込み法は, 今後培養細胞数と接種ウイルス量をさらに詳細に検討すれば市販品に記載された力価と同等の価を示すことが可能であり, ヒトIFNの測定法として充分使用出来ると思われる。ゲタウイルスはFL細胞で増殖が良く, CPEが明瞭で感染細胞がプレート底からはがれ安いため, 従来の50%CPE抑制法の手法をそのまま用いることができた。FL細胞を用いた場合MDBK細胞を用いる場合と異なり, 培養細胞数の調整などの条件設定はあまり必要なく, 現在用いられているFL細胞とVSVのアッセイ系よりも, 高感度でかつ判定時間の影響を受けなかったことは, ゲタウイルスがIFNの抗ウイルス活性の測定に非常に有効であることを示している。

ヒト, プタおよびウシなどのIFN測定に幅広く使用されているMDBK細胞は従来VSVとの組み合わせで用いられてきた〔Lefevre et al., 1990, Meager, 2002, Rubinstern et al.〕。VSVはFL細胞を用いるよりもMDBK細胞との組み合わせの方が高感度であることが報告されており〔Tonew and

Gluck, 1986〕, 今回の結果からも同じ結果が示された。しかし, ゲタウイルスを用いたMDBK細胞でのIFN測定においても, 接種後24時間程度でCPEが出現するような培養細胞数とチャレンジウイルス接種力価を調整すればヒトIFN- $\alpha$ の測定が可能であることが示された。

本研究の結果よりゲタウイルスは, FL細胞を用いた場合, 高感度にヒトIFNが測定に使用可能なことが示唆された。一方, MDBK細胞を用いる場合, ゲタウイルスで高感度測定するためには培養細胞数の調製等の条件設定が必要であった。IFNの抗ウイルス活性の測定において, 実測値を変動させる要因として, 細胞種, ウイルス種, 培養細胞数(密度), ウイルス力価, 測定方法, 判定時間などが考えられる〔Meager, 2002, Rubinstern et al., 1981, Tonew and Gluck, 1986〕。これらの条件の設定によっては今回使用しなかった他種の細胞でもゲタウイルスの応用が可能であると考えられる。ゲタウイルスは, 実際に病気を起こすウマとブタ以外にも, ヤギ, イヌ, ニワトリ, 一部の野鳥などに感染し, 広い宿主域を持つことが知られている〔Li et al., 1992, Sanderson, 1969〕。したがって, ゲタウイルスは様々な動物の細胞に感染することができると考えられ, ヒト以外の各動物のIFN測定に使用できる可能性も充分にあると考えられる。

IFNの抗ウイルス活性の測定は, IFNの生物活性を直接定量する感度の高い測定法である。IFN測定用のウイルスは海外病原体や人獣共通感染症病原体のバイオハザード対策を考慮すれば, ゲタウイルスがIFN測定用のチャレンジウイルスとして優れていると本試験の結果から考えられる。さらにヒトIFNの国際標準品および国内標準品を用いて測定試験を行えば, 今後本法をIFN測定の標準法のひとつに加えることが可能となるであろう。今回の試験ではゲタウイルスをヒトIFNの抗ウイルス活性測定時のチャレンジウイルスとして十分に使用出来る可能性を示した。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり, 本文の内容について文書校閲をして頂き, 的確なご助言を賜った(独)農業・生物系特定産業技術研究機構, 動物衛生研究所, 企画調整部長の村上洋介博士に深謝致します。

## 文 献

- 1) Aguet, M., Dembic, Z. and Merlin, G: Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell*, 55, 273-280, 1988.
- 2) Branca, A.A. and Baglioni, C: Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature*, 294, 768-770, 1981.
- 3) Brewer, L.A., Lwamba, H.C., Murtaugh, M.P., Palmenberg, A.C., Brown, C. and Njenga, M.K: Porcine encephalomyocarditis virus persists in pig myocardium and infects human myocardial cells. *J. Virol.* 75,



- 11621-11629, 2001.
- 4) Canosi, U., Mascia, M., Gazza, L., Serlupi-Crescenzi, O., Donini, S., Antonetti, F. and Galli, G: A highly precise reporter gene bioassay for type I interferon. *J.Immunol.Methods*, 199, 69-76,1996 .
  - 5) Imanishi, J., Hoshino, S., Hoshino, A., Oku, T., Kita, M. and Kishida, T: New simple dye-uptake assay for interferon. *Biken J.*, 24, 103-108, 1981.
  - 6) Isaacs, A., Lindenmann, J. and Valentine, R.C: Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*, 147, 258-267, 1957.
  - 7) Izumida, A., Takuma, H., Inagaki, S., Kubota, M., Hirayama, T., Kodama, K. and Sasaki, N: Experimental infection of Getah virus in swine. *Nippon Juigaku Zasshi*, 50, 679-684, 1988.
  - 8) Jabs, W.J., Hennig, C., Zawatzky, R. and Kirchner, H: Failure to detect antiviral activity in serum and plasma of healthy individuals displaying high activity in ELISA for IFN-alpha and IFN-beta. *J. Interferon. Cytokine. Res.*, 19, 463-469, 1999.
  - 9) Jenny, E.W., Mott, L.O. and Traub, E: Serological studies with the virus of vesicular stomatitis. I. Typing of vesicular stomatitis by complement fixation. *Am. J. Vet. Res.*, 19, 993-998, 1958.
  - 10) Johnson, K.M., Vogel, J.E. and Peralta, P.H: Clinical and serological response to laboratory-acquired human infection by Indiana type vesicular stomatitis virus (VSV). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 15, 244-246, 1966.
  - 11) Kamada, M., Ando, Y., Fukunaga, Y., Kumanomido, T., Imagawa, H., Wada, R. and Akiyama, Y: Equine Getah virus infection: isolation of the virus from racehorses during an enzootic in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 984-988, 1980.
  - 12) Kawamura, H., Yago, K., Narita, M., Imada, T., Nishimori, T. and Haritani, M: A Fatal Case in Newborn Piglets with Getah Virus Infection: Pathogenicity of the Isolate. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49, 1003-1007, 1987.
  - 13) 小林茂保 インターフェロンの定量分析, 小林茂保. 編. 講談社 インターフェロンの科学, 11-20, 1984.
  - 14) Kono, Y., Sentsui, H. and Ito, Y. An epidemic of Getah virus infection among race horses : properties of the virus. *Res. Vet. Sci.*, 29, 162-167, 1980.
  - 15) Kurkela, S., Manni, T., Myllynen, J., and Vapalahti, O: Clinical and laboratory manifestations of sindbis virus infection: Prospective study, Finland, 2002- 2003. *J. Infectious Dis.*, 191, 1820-1829, 2005.
  - 16) Lefevre, F., L'Haridon,R., Borrás-Cuesta, F. and La Bonnardiere: Production, purification and biological properties of an Escherichia coli-derived recombinant porcine alpha interferon. *J. Gen. Virol.*, 71, 1057-1063, 1990.
  - 17) Lewis, J.A: A sensitive biological assay for interferons. *J. Immunol. Methods*, 185, 9-17, 1995.
  - 18) Li, X.D., Qiu, F.X., Yang, H., Rao, Y.N. and Calisher, C.H. Isolation of Getah virus from mosquitos collected on Hainan Island, China, and results of a serosurvey. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health*, 23, 730-734, 1992.
  - 19) Matsuyama, T., Nakamura, T., Isahai, T., Oya, A. and Kobayashi, M. Haruna virus, a group A arbovirus isolated from swine in Japan. *Gunma. J. Med. Sci.*, 16, 131-134, 1967.
  - 20) Meager, A. Biological assays for interferons. *J. Immunol. Methods*, 261, 21-36, 2002.
  - 21) Meager, A., Gaines Das, R., Zoon, K. and Mire-Sluis, A. Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alpha and omega. *J. Immunol. Methods*, 257, 17-33, 2001.
  - 22) Mogensen, K.E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G. and Uze,G. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J. Interferon. Cytokine. Res.*, 19, 1069-1098, 1999.
  - 23) Nagano, Y. and Kojima,Y. Immunizing property of vaccinia virus inactivated by ultraviolet rays.1954. *C. R. Sciences. Soc. Biol. Fil.*, 148, 1700-1702, 1954.
  - 24) Pestka, S., Kelder, B., Lamger, J.A. and Staehelin, T. Monoclonal antibodies can discriminate between some active and inactive forms of leukocyte interferon. *Arch. Biochem. Biophys.*, 224, 111-116, 1983.
  - 25) Rubinstein, S., Familetti, P.C. and Pestka, S. Convenient assay for interferons. *J. virol.*, 37, 755-758, 1981.
  - 26) Sanderson,C.J. A serologic survey of Queensland cattle for evidence of arbovirus infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18, 433-439, 1969.
  - 27) Sentsui, H. and Kono, Y. An epidemic of Getah virus infection among racehorses: isolation of the virus. *Res. Vet. Sci.*, 29, 157-161, 1980.
  - 28) Shibata, I., Hatano, Y., Nishimura, M., Suzuki, G. and Inaba,Y. Isolation of Getah virus from dead fetuses extracted from a naturally infected sow in Japan. *Vet. Microbiol.*, 27, 385-391, 1991.
  - 29) Stebbing N. and May L. Comparisons of dose-response data for various standard and recombinant DNA-derived human interferon. *J. Virol. Methods.*, 5, 309-315, 1982.
  - 30) Tonew, M. and Gluck, B. Interferon sensitivity of various cell lines. *J. Basic. Microbiol.*, 26, 173-179, 1986. (in Germany)
  - 31) 豊満 義邦, 長谷 学, 溝下 和則. 急死した新生子豚から分離したゲタウイルスの性状. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 43, 432-435, 1990.
  - 32) Yago, K., Hagiwara, S., Kawamura, H. and Narita, M. A Fatal Case in Newborn Piglets with Getah Virus Infection: Isolation of the Virus. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49, 989-994, 1987.
  - 33) 山崎修道 インターフェロンの測定法と問題点. *Pharma Medica*, 4, 111-118, 1986.

## Use of Getah virus for antiviral assay of human interferon

Subaru OGISO<sup>1,3</sup>, Junsuke SHIRAI<sup>2</sup>, Yoshinori TUCHIYA<sup>2</sup>, Eiichi HONDA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Tokyo Research and Development Center, Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd., 1-16-13 Kitakasai, Edogawa, Tokyo 134-8630

<sup>2</sup>Department of Exotic Diseases Research, National Institute of Animal Health, 6-20-1 Josui-honcho, Kodaira, Tokyo 187-0022

<sup>3</sup>Department of Veterinary Microbiology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183-8509

Antiviral assay is used routinely for measuring the biological activity of interferon (IFN). However, the challenge viruses used in these assays are considered dangerous to the animal industry and pose a risk of human infection. For example, the vesicular stomatitis virus (VSV) is an important exotic disease agent in domestic animals, and the sindbis virus provokes rash, arthralgia, and fever in humans. Therefore, biosafety needs to be considered when antiviral assays are performed. We chose Getah virus as a candidate challenge virus because it is less hazardous to animals and humans. Crystal violet staining 50% CPE inhibition antiviral assay of human IFN using Getah virus was studied. Antiviral assay using Getah virus and FL cells gave a higher titer of human IFN than did assay using VSV. The titer of human IFN  $\alpha$  was almost the same as that given by standardized control samples. The titer of human IFN by antiviral assay using Getah virus on the sheet method (IFN reacted the sheeted FL cells) was higher than those of the simultaneous reaction method (IFN reacted the suspending FL cells before sheeted). We therefore consider the sheet method useful for detection of small amounts of IFN. Antiviral assay using Getah virus on MDBK cells gave a lower titer of human IFN  $\alpha$  than did assay using VSV. However, the adjusting the number of MDBK cells and the titer of Getah virus to get the best condition for CPE appearance, gave similar results in the assays using Getah virus and VSV. We consider that Getah virus is a potentially useful challenge virus for antiviral assay of human IFN.