

小林和夫博士による馬伝染性貧血ウイルスの in vitroでの培養の成功とその後の研究の発展

泉 對 博¹

1. はじめに

馬伝染性貧血(伝貧)の特徴は、貧血を伴う高熱、慢性的経過をとった場合の回帰熱、貧血、持続的なウイルス血症である³⁾。急性型の病変は血管透過性の失調に基づく組織の変成が主体で、脾臓は腫大し赤黒色を呈し、肝臓も腫大し著しい鉄沈着や出血が見られる。死を免れた感染馬は繰り返される発熱が徐々に軽度となり健康馬と見分けができなくなる場合がある。ほとんど臨床症状を示さない感染馬も存在する。どの様な経過をとるかは感染したウイルスの病原性や宿主の個体差で差はあるが、急性感染症の症状をとる場合があることが他のレトロウイルス感染症と異なる。

伝貧は馬属のみが感染する伝染性疾病として古くから記録があり、1904年には濾過性病原体による疾病であることが報告されている。日本では宝暦6年(1756年)に馬伝染性貧血と思われる疾病の記録がある。しかし国内における明らかな伝貧の発生は明治以降で、軍馬の需要と改良のために国や自治体が外国から多数の馬を購入したことに始まる。1883年にハンガリアから輸入した種牡馬や、1887～1888年に青森県が購入したカリフォルニア産種牡馬が伝貧で死亡している。1895年ごろから北海道日高および青森県で貧血と高熱を呈する「ぶらり病」と称される馬疫が多発した記録がある。伝貧は20世紀初頭には馬産地や育成地の馬に蔓延し馬産業に甚大な被害を与えるとともに、軍馬にも広がっている。馬は20世紀前半まで現在の自動車に相当する役目を持った重要な家畜であったため、世界各国で伝貧の制御は重要視されていた。しかし馬伝染性貧血ウイルス(EIAV)は馬属以外の動物には感染しないため、小動物を使用したモデル実験ができなかったことや、EIAVが増殖する培養細胞が発見されなかったことにより研究の進展がみられなかった。こうした中で日本では本疾病に関する研究が精力的に行われ、獣医伝

SENTSUI Hiroshi : Success of in vitro Cultivation of Equine Infectious Anemia Virus by Dr. Kazuo Kobayashi and Development of the Related Studies

1. 連絡先: 神奈川県藤沢市亀井野1866 日本大学生物資源科学部獣医学科 獣医伝染病学研究室
〒252-0813 TEL: 0466-84-3384

(2014年10月4日受付・2014年10月25日受理)

染病学の分野で世界に誇れる研究成果を挙げてきたと言える。

2. 20世紀前半までの馬伝染性貧血の研究

当時の研究は伝貧感染馬を摘発、淘汰するための正確な診断法の開発が中心であった。20世紀当初の陸軍の記録では、陸軍保有馬は伝貧汚染が激しく戦力に影響するほどであった。慢性経過をたどる伝貧の診断は困難で、削瘦馬、栄養不良馬、浮腫や可視粘膜に異常のある馬を摘発し、検温、一般臨床検査、赤・白血球数およびその比率、赤沈速度、血色素量で総合診断していた。そうした中で陸軍では1942年に肝臓穿刺法を採用し本疾病の摘発に努めた。生体から穿刺針で取り出された馬の肝臓小片を病理組織学的に観察し、血鉄症病変を診断する方法である。

これと並行して、獣疫調査所の石井進博士は末梢白血球を使用して鉄染色陽性となる細胞(担鉄細胞)を検出する診断法を発表した。伝貧馬は肝臓および脾臓に担鉄細胞が増多することが報告されていた。石井博士はそれが末梢血中に移行することを発見し、伝貧診断に有力な手がかりを与えた。²⁾ 凝固防止剤を添加した馬血液は30分ほど静置すると赤血球が沈殿する。その上清のプラズマ層を採取し、遠心して白血球を集め、スライドグラスに塗抹して鉄染色し、白血球10,000個に1個以上の陽性細胞が検出された場合は伝貧感染馬と診断した。担鉄細胞は急性型の発病馬や回帰熱により貧血を呈している馬では末梢血中に高率に出現するが、慢性に移行するに従って減少してくる。また、ピロプラズマ、トリパノゾーマ、線疫などでも出現し、必ずしも伝貧に限られたものではなかったが、診断基準となりうるというのが研究者の認めるところであった。担鉄細胞による診断は現在の診断技術から見ると特異的診断法とは言えないが、1941年に伝貧の診断基準に加えられ、1948年には家畜伝染病予防法施行規則の一項目となり、後述する寒天ゲル内沈降試験が開発されるまでの長い期間、伝貧の診断に使用された。

ウイルスは生きた細胞でしか増殖しないため、当時のウイルス研究では孵化鶏卵や実験動物を使用したウイルス培養が行われていた。EIAVでも放射線照射や免疫抑制剤を投与したマウスを使用して培養が試みられた。それらの研究成果の中には、マウス脳内接種を継代してマウス脳に順化したEIAVを作出した報告や、EIAV感染マウス脳から作製した抗原でEIAV感染馬血清に陽性反応を認めた等の、現在の視点から見ると明らかな誤報がある。小林博士がこれら材料を馬に接種してマウス脳内接種によるEIAV継代を学会発表で否定したところ、某研究者は怒ってしまい、その後会っても口をきいてくれなくなったそうである。

3. 馬伝染性貧血ウイルスのin vitroにおける培養の成功

日本で行われた最も世界に誇れる伝貧の研究成果は、1960年代に小林和夫博士が馬骨髓や馬末梢血から得た白血球でEIAVが細胞変性効果(CPE)を起こして増殖することを発見し、EIAVの培養や定量を可能としたことである。家畜衛生試験場(現・動物衛生研究所)には1955年から1982年まで本疾病研究のためのプロジェクトチームとして馬伝染性貧血研究部が設置されていた。

EIAVをin vitroで培養する研究は、「EIAVは馬にしか感染しないのでその培養には自然宿主である馬の培養細胞を使用する必要がある」と考えて行われた。当時の記録を見ると、家畜衛生試験場では培養用の組織を得るために子馬が定期的に殺処分され、培養できそうな組織はすべて採取し、様々な方法で培養されていた。⁴⁾ それら培養細胞に発熱時の馬血清を接種して観察したが、ウイルスの増殖を思わせるCPEは何も起こらなかった。ウイルス接種後の培養期間をいろいろと変えて盲継代を行い、それらの培養液を馬に接種することで継代できているかを確認したところ、2~3代以上は継代できず、研究者は途方にくれていた様である。こうした中で小林博士は骨髓から得た白血球でEIAVが培養できることを発見した。小林博士から聞いた思い出話は次のようである。

培養用の組織を採取するために放血死させた子馬の股骨を切断したところ、その馬は脂肪髄が少なく赤色髄が多かった。骨髓から培養細胞を採取する予定はなかったが、ついでに採取してトリプシン消化をして細胞を集めたところ、著しい量の脂肪が上層に浮いたが、洗浄して得た細胞は意外と量が多かった。骨髓細胞が簡単に培養できるという期待は無かったので、通常の組織細胞の20~30倍の細胞濃度で培養した。翌日液交換をして細胞を観察すると、円形の細胞が密に付着してシートを形成していた。そこで発熱馬血清を接種し無接種の対照細胞とともに観察したところ、約2週間後に細胞の委縮、円形化、脱落等のCPEと思われる変化が認められた。その培養液を馬に接種すると典型的な伝貧の症状を示した。⁵⁾ しかしこの方法ではその都度馬を殺処分しなくてはならないので、動物愛護や予算面で実用的ではない。小林博士は骨髓細胞の培養を何度か試みたそうであるが、骨髓細胞が初回と同様なきれいなsheetを形成してくれたことはほとんど無かったそうである。

小林博士が骨髓細胞の代用品として馬末梢血中の白血球に目をつけたことで伝貧の研究は確実に進展した。⁶⁾ 骨髓細胞はその形態から見て末梢白血球中の単球と類似している。体重500Kg程度の馬であれば、1週間に1度、1リットル程度(体重の1/500)の末梢血を採取しても健康を害することは無い。ヘパリンを加えた馬

の血液は約30分静置しておくで赤血球が沈みプラズマを採取できる。これを遠心して白血球を集め、牛血清を50%含むEagle MEMに浮遊して培養する。翌日培養ビンを軽くゆすって培養液とともに浮遊細胞を吸引除去し、新しい培養液を入れてガラス面に付着した細胞の培養を続ける。2～3日後に細胞がガラス面に付着して培養できていることを確認してウイルス液を接種する。すると骨髓細胞と同様に培養白血球にCPE生じEIAVが増殖する(写真1)。

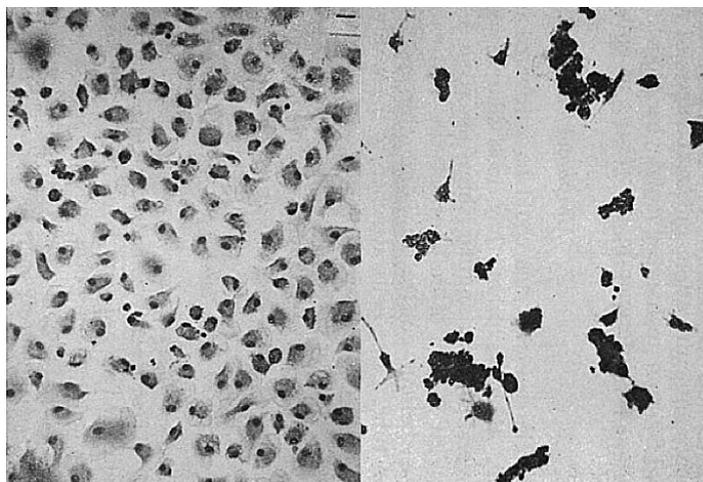


写真1

馬白血球培養の秘訣は白血球供給馬と培養用血清供給牛の選択である。ほとんどの馬の白血球は培養後1週間以内で試験管のガラス壁から脱落してしまうが、特定の(培養する馬白血球と相性の良い)牛血清を使用して培養すると、3～4週間培養を維持できる個体がある。この様な白血球を持った馬を常時1, 2頭飼育し、培養に適した血清を提供できる牛も飼育しておくで、EIAVも通常のウイルス病と同様な手法で研究できるようになる。⁷⁾ 小林博士の根気がこのような培養法の確立に結びついたと思う。しかし馬白血球培養を使用したEIAVの培養と定量は、どこの研究所でも簡単にできるというものではなかった。家畜衛生試験場の様に多数の馬と牛を飼育して、それらの白血球と血清を試験的に組み合わせて培養し、長期間培養が可能な白血球採取用の馬と培養用血清を採取できる牛を選ぶことができる所では可能であるが、大学や一般の研究機関では無理である。従ってしばらくの間は、馬白血球培養を用いたEIAVの定量は諸外国の研究者から信用されなかった。しかし後述するように、馬白血球培養を用いることによりEIAVの

中和試験，補体結合試験，寒天ゲル内沈降試験などの血清学的試験が開発され、伝貧の発病機序や免疫の研究が大きく発展した。筆者は家畜衛生試験場に採用され、研修が終わって半年後に馬伝染性貧血研究部に配属されたときに、真っ先にこの白血球培養法を室長の甲野雄次博士から伝授された。

4. 小林博士の業績に続いた様々な研究

(1) EIAVの定量

馬白血球培養を用いることでEIAVの定量が可能となった。⁷⁾ この技術を使用してEIAV感染馬の発病メカニズムが解明されていった。小林博士は甲野博士と共同で発熱時や慢性経過をした馬の血液や臓器ごとにウイルス量を調べ、発熱と血清中のウイルス量が相関していること、無熱期でも末梢血中にウイルスが存在すること、発熱期の馬では病変が顕著に表れる脾臓や肝臓に大量のウイルスが存在することなど、現在の教科書に記載されている伝貧の特徴を明らかにしていった。⁹⁾

(2) 血清診断法の開発

甲野博士はエーテル処理をしたEIAVを用いて補体結合(CF)試験による抗体測定を行い、EIAVの血清反応に関する世界で初めての信頼できるデータを示した。⁸⁾ この検査法は抗原検出にも使用できるので、EIAVを接種した馬白血球のCPEが特異的なものであるかの証明にも使用された。末梢白血球は培養しても分裂・増殖をしないので、一般の培養細胞と比較して不安定で長期間の維持が難しい。検査材料を階段希釈して培養白血球に接種すると、非特異的に細胞が変成を起こすこともある。しかしそれらは培養液中のEIAV抗原を検出することで、EIAVのCPEが非特異反応かを確認できる。⁷⁾ 例えば10倍階段希釈した検査材料を1希釈につき4本の小試験管に培養した馬白血球に接種し、CPEが起きた小試験管に等量のエーテルを加えて混合後液相を採取し、CF試験で液相中のEIA抗原を検出して特異的CPEであることを確認すれば、測定した感染価は信用できる。⁸⁾ 確かに面倒な測定法であるが、EIAVの定量が可能となったことは伝貧の研究発展に大きく貢献した。

中島博士は馬白血球で培養したEIAVを濃縮して抗原に使用して寒天ゲル内沈降試験を行い、担鉄細胞による診断では不可能であった慢性病馬の摘発を可能とした。¹⁵⁾ この診断法は簡便であり非特異反応を容易に識別できる(写真2)。また抗体価の低い感染馬の微弱陽性反応も観察者が少し経験を積めば見逃すことはない。米国のCoggins博士は感染馬の脾臓乳剤を抗原に使用して寒天ゲル内沈降試験を僅かの差で先に発表しているが、¹⁾ 寒天ゲル内沈降試験に使用できる量のEIAV抗

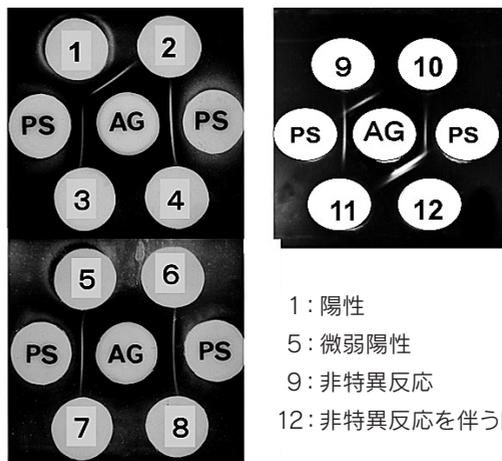


写真2

原を保有した脾臓を持ったEIAV感染馬を得ることは非常に困難で、恒常的に寒天ゲル内沈降試験用抗原を作製するには馬白血球培養が必要である。1978年に寒天ゲル内沈降試験が伝貧の診断法として取り入れられたことにより、日本国内からEIAV感染馬がほとんど摘発されてしまった。1950年代は年間100頭以上の感染馬が摘発されていたが、1984年以後の国内発生数は、1993年にそれまで検査からもれていた2頭が摘発されたこと、2011年に天然記念物として保護されている岬馬(宮崎県)で感染馬が摘発されたことを除くと、ゼロである。

(3) 抗原変異による持続感染機序の解明

甲野博士は白血球培養を用いて中和試験を行い、EIAV感染馬は中和抗体が上昇すること、回帰熱が起こると血液中のウイルス量が増加していること、再発時のウイルスはその時に血中に存在している抗体では中和されないこと、再発時のウイルスに対する抗体は後に産生されて来ることを発見した(表1)¹³⁾ 現在、1980年代

ウイルス	接種後日数					
	0	20	44	62	83	115
接種ウイルス	—	—	0.7	2.5	3.2	3.2
493/20V	—	—	1.0	1.5	1.5	2.5
493/44V	—	—	—	3.5	5.4	>5.4
493/62V	—	—	—	0.5	2.0	2.0
493/83V	—	—	—	—	0.5	3.5
493/115V	—	—	—	—	—	—

表1

に発生した後天性免疫不全症候群(AIDS)が現在大きな社会問題となっているが、甲野博士はEIAVが短期間に抗原変異をすることで宿主の免疫作用を逃れて持続感染することをAIDSウイルスに先がけて発見されている。しかしこの画期的な発見も最初に投稿した某学術誌では、①白血球培養は特定の研究室でしか成功していない、②特異的CPEと非特異の変性の区別が困難である、③この手法をウイルスの定量に用いた実験結果は信用できない、④ReviewerはEIAVの持続感染は変異ではなくブロッキング抗体によると考える、等のコメントを付けられRejectされたそうである。

(4) 細胞性免疫による発病制御の発見

馬白血球培養でウイルス分離を行うと慢性無症状のEIAV感染馬からも常時ウイルスが分離される。なぜ発病しないのだろうかと当然疑問を持つ。こうした馬に細胞性免疫抑制剤である副腎皮質ホルモンやcyclophosphamideを投与すると、自然に起こる再発と区別できない発熱が例外なしに認められた(図1)。¹¹⁾ つまり慢性化したEIAV感染馬では細胞性免疫能が上昇しており、変異ウイルスの増殖を防いでいることが明らかとなった。当時はまだ細胞性免疫の研究が進んでなかったのでそれ以上の研究は行われなかったが、リンパ球表面抗原に対する各種モノクローナル抗体を使用した最近の研究では、EIAV感染馬の発熱が回復する場合はCytotoxic T細胞と思われるCD8+細胞の増加がみられるなど、細胞性免疫の関与を裏付ける興味ある知見が得られている。¹⁴⁾

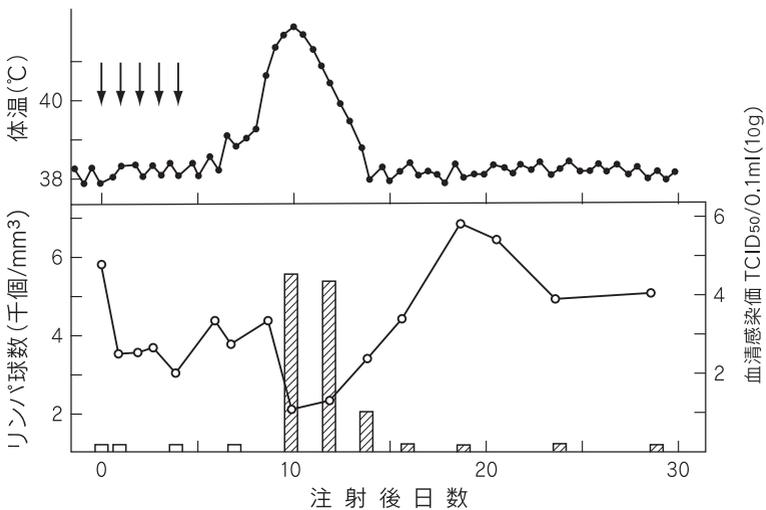


図1

(5) 理化学的性状と電子顕微鏡による形態学的性状の解明

中島英男博士は培養馬白血球で作製した高濃度の牛血清を含むウイルス液を濃縮精製し、田島正典博士と共同で電子顕微鏡による観察を行い、90~110nmのピリオンを多数観察した。¹⁸⁾ 更に感染細胞を電子顕微鏡で観察し、EIAVは細胞膜からbuddingにより形成されることを明らかにした(写真3)。また、様々な処理をしたウイルス液の感染価の変化を馬白血球培養により測定し、EIAVはエンベロープを持ち、紫外線照射に比較的抵抗性で、密度は約1.15g/mlと比較的軽く、DNA合成阻害剤で増殖が抑制されるRNAウイルスである等の理化学的性状を明らかにし、レトロウイルス科レンチウイルス属に分類されることを示した。

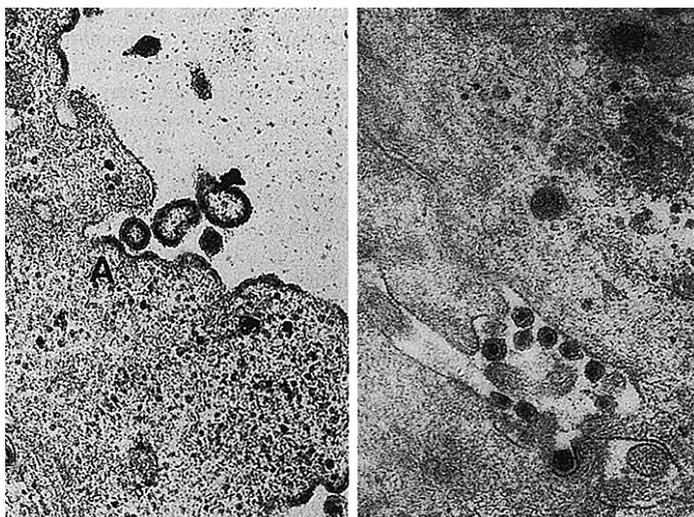


写真3

(6) 弱毒ウイルスの作製

伝染病対策として最初に行われるのがワクチン開発である。甲野博士と小林博士はEIAVを馬白血球培養で長期間継代することで病原性を消失した変異ウイルスを作製し、¹⁰⁾ この弱毒ウイルスを用いた感染防御、発病抑制実験を行っている。¹²⁾ これは生ワクチンで細胞性免疫も誘導するので不活化ワクチンと比べ防御範囲も広く、変異ウイルスによる発病も制御することが期待された。しかしこのウイルスで免疫した馬は同一系統の強毒ウイルスの攻撃には完全に抵抗性を示したが、中和試験で異なる抗原性を持つ異系強毒株の攻撃には全く防御作用を示さなかった。

この変異ウイルスは馬腎培養細胞でも増殖することが証明された。これは馬白血球培養細胞以外でのEIAVの初めての培養報告であり、ウイルスの大量培養、精製、濃縮を容易にした。約20年後に分子生物学的手法を用いてこの弱毒変異株の遺伝子解析した結果、LTR部分に大きな変異が生じていることが明らかとなった。¹⁹⁾

1980年代に中国で馬伝染性貧血ウイルスをロバの培養白血球で長期間継代して弱毒化し、ワクチンを作製することに成功したと発表した。海外への売り込みも行われ、このワクチンを購入して使用した国もあったようである。しかし基本的には上記の馬白血球継代弱毒ウイルスによる免疫と同じ原理であり、抗原性の異なるウイルスに対する防御能はないと思われる。1983年に中国は「伝貧の免疫に関する国際会議」を開き、この弱毒ウイルスが十分にワクチン効果を示していることを宣伝したが、中国以外の研究者が納得したとは思えなかった。残念ながらヒトの免疫不全ウイルスを含めて、レンチウイルスのワクチン開発は既存の技術では無理なようである。

(7) 赤血球凝集能の発見と貧血機序の解明

筆者も家畜衛生試験場に勤務していた時に伝貧研究に参加することができた。馬白血球培養で増殖させて得たEIAVが馬赤血球に対する凝集素を持つことを発見し、赤血球凝集(HA)素は抗原変異をするがその変異は感染性を支配している蛋白とは独立していること、HA素はウイルス表面に存在しており、糖蛋白が活性の重要部分を構成しており、その一部はノイラミン酸で覆われていることを発表した。実験感染馬の血清中には接種ウイルスに対する赤血球凝集阻止(HI)抗体が出現し、感染初期の馬血清を用いた交差HI試験では接種ウイルスのHA活性のみが阻止されるが、感染後長期間経過した馬の血清では他株のHA活性も抑制する抗体も出現していた。新鮮馬血清存在下でEIAVにより凝集させた赤血球を培養白血球に加えると速やかに貪食された。¹⁷⁾ つまりEIAVはHI抗体で不活化されないため、中和抗体の作用を逃れた変異ウイルスには元のHA素を維持しているものがあり、感染馬体内ではウイルスとHI抗体が共存していることになる。EIAVが赤血球に結合し、そこに抗体が結合し補体が活性化されることで溶血や白血球による貪食が起こるといふ、担鉄細胞の成因や赤血球寿命が短縮する一原因を明らかにすることができた。¹⁶⁾

(8) エイズのモデルとしての馬伝染性貧血の研究

中島博士らの開発した寒天ゲル内沈降試験が感染馬の診断法として取り入れられたことにより、日本国内からEIAV感染馬が摘発されてしまい、農林水産省の研

究機関で伝貧の研究を続ける必要性がなくなりました。長期間にわたり蓄積された実験馬の経過血清や変異ウイルスも冷蔵庫の奥にしまわれて、忘れられていくように思えた。しかし1980年代に発生したAIDSが大きな社会問題となり、その実験モデルとして馬伝染性貧血が再度注目されてきた。2003年から6年間、科学技術庁振興調整費によるエイズ研究グループ(井川洋二推進委員長)が生まれ、筆者もそこに参加することとなった。筆者はmolecularの研究分野に弱かったが、北海道大学免疫学研究所の生田和義教授や大学院学生の鄭永輝君に協力してもらい、EIAVの抗原変異のメカニズムについて分子生物学的に調べた。この研究材料には、小林博士や甲野博士が馬白血球培養によって実験感染馬から継時的に分離・クローニングし、フリーザーに20年以上も眠っていたウイルスを使用させてもらった。同一実験馬から発熱時ごとに分離したウイルスのenvelope部分の遺伝子には小単位遺伝子の挿入や欠損が起きており、それには一定の法則があることを発見した(図2)。²⁰⁾

PND region

```

V70 TGTCAAAAA GTTAAT GTTAGT GAGAGTACGGAA ----- TATTGG
      SU1      SU2      SU3      SU4

F1V TGTCAAAAA GTTAAT GTTAAT GAGAGTACGGAA TGTCAAAAA GTTAAT ----- GAGAGTACGGAA TATTGG
      SU1      SU2      SU2      SU4      SU1      SU2      SU4

F2V TGTCAAAAA GTTAAT GTTAAT GAGAGTACGGAA ----- TATTGG
      SU1      SU2      SU2      SU4

F3V TGTCAAAAA GTTAAT GTTAGT GAGAGTACGGAA TGTCAAAAA GTTAAT GTTAAT GAGAGTACGGAA TATTGG
      SU1      SU2      SU3      SU4      SU1      SU2      SU2      SU4

F4V TGTCAAAAA GTTAAT GTTAGT GAGAGTACGGAA ----- TATTGG
      SU1      SU2      SU3      SU4

F5V TGTCAAAAA GTTTAC GTTAAT GAGAGTACGAAA TATTTA--- GTTAAA GTTAAT GAGAGTACGGAA TATTGG
      SU1      SU2      SU2      SU4      SU2      SU2      SU4

```

図2

5. おわりに

これまでに多くの家畜伝染病が、診断、予防、治療技術の発達により克服されてきたが、その中には日本の研究者が大きな業績を上げたものがある。小林博士の馬白血球培養を用いたEIAVのin vitroでの培養の成功は、中村稔治博士の牛疫の家兎継代ワクチン、熊谷哲夫博士の豚コレラウイルス定量のEND法、家畜衛生試験場のウイルス研究グループらのアカバネウイルスをはじめとする節足動物媒介ウイルスによる牛に繁殖障害を起こす疾病の発見などとともに、日本の獣医学分野の研究者が行った世界に誇れる研究だと思う。日本が国内からEIAV感染馬がほ

ば完全に摘発されてしまい、産業動物の疾病として伝貧の研究を続ける必要性がなくなりました。しかしレトロウイルス、特にレンチウイルスによる疾病は、ヒトや動物で治療法のない難病として現在大きな問題となっている。今後、小林博士やその後に続いた諸先輩が行った研究成果がウイルス学や免疫学の分野で活用されていくことを願っている。

引用文献

- 1) Coggins, L., et al. : Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test, *Am J Vet Res*, 33, 11-18(1972)
- 2) 石井進ら：伝染性貧血馬ノ病理組織学的研究. V. 頸静脈血液中ニ於ケルジデロウチーてん(鉄細胞)ノ検出トソノ生前診断的価値ニ就テ, *日本獣医学雑誌*, 2, 531-557(1940)
- 3) Ishii, S. : Equine infectious anemia or swamp fever, *Adv Vet Sci*, 8, 263-298(1963)
- 4) 小林和夫：馬伝染性貧血ウイルスの培養に関する研究 I. 様々なウマ組織の培養によるウイルス累代培養試験, *ウイルス*, 11, 177-189(1961)
- 5) 小林和夫：馬伝染性貧血ウイルスの培養に関する研究 II. ウマの骨髓細胞培養に於けるウイルスの増殖, *ウイルス*, 11, 189-201(1961)
- 6) 小林和夫：馬伝染性貧血ウイルスの培養に関する研究 III. ウマ白血球培養に於けるウイルスの増殖, *ウイルス*, 11, 249-256.
- 7) Kobayashi, K., Kono, Y. : Propagation and titration of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture, *Natl Inst Anim Health Q*, 7, 8-20(1967)
- 8) Kono, Y., Kobayashi, K. : Complement fixation test of equine infectious anemia. I. Specificity of the test, *Natl. Inst. Anim. Health. Q*, 6, 194-203(1966)
- 9) Kono, Y. : Viremia and immunological responses in horses infected with equine infectious anemia virus, *Natl Inst Anim Health Q*, 9, 1-9(1969)
- 10) Kono, Y., Kobayashi, K. : Change in pathogenicity of equine infectious anemia virus during passages in horse leukocyte cultures, *Natl Inst Anim Health Q*, 10, 106-112(1970)
- 11) Kono, Y., et al. : Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs, *Natl Inst Anim Health Q*, 16, 8-15(1976)
- 12) Kono, Y., et al. : Immunization of horses against equine infectious anemia(EIA) with an attenuated EIA virus, *Natl Inst Anim Health Q*, 10, 113-122(1970)
- 13) Kono, Y., et al. : Serological comparison among various strains of equine infectious anemia virus, *Arch Gesamte Virusforsch*, 4, 202-208(1971)
- 14) Murakami, K., et al. : Reduction of CD4+ and CD8+ T lymphocytes during febrile periods in horses experimentally infected with equine infectious anemia virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 67, 131-140(1999)

- 15) Nakajima, H., Ushimi, C. : Immunodiffusion studies of purified equine infectious anemia virus, *Infec Immun*, 3, 373-377(1971)
- 16) 泉對博 : 馬伝染性貧血の貧血機序 貧血発症におけるウイルスの病因的役割, *日本獣医師会雑誌*, 42, 523-529(1989)
- 17) Sentsui, H., Kono, Y. : Hemagglutination-inhibition tests with different strains of equine infectious anemia virus, *Am J Vet Res*, 42, 1949-1952(1981)
- 18) Tajima, M. et al. : Electron microscopy of equine infectious anemia virus, *J Virol*, 4, 521-527(1969)
- 19) Zheng, Y.H. et al. : Mutations occurring during serial passage of Japanese equine infectious anemia virus in primary horse macrophages, *Virus Res*, 68, 93-98.(2000)
- 20) Zheng, Y.H. et al. : In vivo dynamics of equine infectious anemia viruses emerging during febrile episodes : insertions/duplications at the principal neutralizing domain, *J Virol*, 71, 5031-5039(1997)

Summary

Success of in vitro cultivation of equine infectious anemia virus by Dr. Kazuo Kobayashi and development of the related studies

SENTSUI Hiroshi¹

The research on equine infectious anemia (EIA) has been performed eagerly all over the world, because the horses had been more important until the early 20th century than now for the transportation and in the army. In spite of the great efforts exerted by many researchers, noticeable results have not been obtained. They have used various experimental animals and tissue cultures to cultivate equine infectious anemia virus (EIAV), but they were all in vain. However, Dr. Kazuo Kobayashi succeeded to propagate EIAV in primary cultures of horse bone marrow cells and leukocytes, and made it possible to propagate EIAV in vitro and carry out serological tests.

Based on horse leukocyte cultures, serological tests and examinations such as neutralization, complement-fixation and agar gel immune-diffusion tests have been developed. Studies on the mechanisms of pathogenesis and immunity also greatly developed and many interesting findings have been published. Serologically, EIAV has at least two different antigens, associated with envelope and strain-specific, and with nucleocapsid and common to various strains. EIAV

induce rapid antigenic variation and serum antibodies from an infected horse can neutralize viruses recovered from prior, but not subsequent. The typical clinical symptoms of EIA, recurrent fever and viremia, are associated with the emergence of a novel antigenic variant of the virus.

The physicochemical and morphological properties of EIAV has been investigated using horse leukocyte culture and concentrated culture fluid of EIAV, and these results clarified that EIAV is classified in genus lentivirus in Retroviridae.

Almost all of EIAV infected horses have been disclosed and eradicated from Japan in current use of agar gel immune-diffusion test. EIAV is now treated as a good model for AIDS in studying mechanisms generating escaped retrovirus variants.

1. SENTSUI Hiroshi

Laboratory of Veterinary Epizootiology, Department of Veterinary Medicine, college of Bioresource Science, Nihon University.

1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-0880 Japan. Phone : +81-466-3384

E-mail: sentsui.hiroshi@nihon-u.ac.jp