

Development of novel diagnostic methods of Caprine arthritis-encephalitis virus infection

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小西, 美佐子, 白藤, 浩明, 木村, 久美子, 播谷, 亮, 亀山, 健一郎, 村上, 賢二 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002206

山羊関節炎・脳脊髄炎の新しい診断法の開発

小西美佐子¹⁾, 白藤浩明²⁾, 木村久美子³⁾, 播谷 亮³⁾, 亀山健一郎¹⁾, 村上賢二^{1)*}

(平成 22 年 8 月 17 日 受付)

Development of novel diagnostic methods of Caprine arthritis-encephalitis virus infection

Misako KONISHI¹⁾, Hiroaki SHIRAFUJI²⁾, Kumiko KIMURA³⁾, Makoto HARITANI³⁾,
Ken-ichiro KAMEYAMA¹⁾ & Kenji MURAKAMI^{1)*}

山羊関節炎・脳脊髄炎 (CAE) の新たな診断法として, ELISA 法およびリアルタイム PCR 法の開発を試みた。精製ウイルス (wCAEV) と大腸菌組換え蛋白質 (rPr55gag) を抗原とした二種類の ELISA 法 (wELISA および rELISA) を開発し, その精度を wCAEV を抗原としたウエスタンブロット法 (wWB) による野外血清 745 検体の検査結果を基に分析した。wWB に対する wELISA の感度・特異度は 80.4% および 78.0% であり, rELISA の感度・特異度は 78.2% および 61.1% と低かった。しかし, rPr55gag を抗原とした rWB の感度・特異度は, 93.0% および 96.3% と現行の CAEV 診断法である寒天ゲル内沈降試験と同等の精度を有することが分かった。このことから rWB は, 抗原調製に時間を要する wWB に代わる CAEV の確定診断法として利用可能と考えられる。また, 各抗原を用いて単クローン抗体およびウサギ免疫血清を作製した。各抗体は間接蛍光抗体法もしくは酵素抗体法において抗原と特異的な反応を示したことから, 病性鑑定等における抗原検出に利用可能と考えられる。さらに, CAEV のコア蛋白遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法は, 現行の nested PCR 法と同等の感度を有しており, 多検体の検査における活用が期待される。

緒 言

山羊関節炎・脳脊髄炎ウイルス (CAEV) は, 山羊に終生感染し, 慢性消耗性疾病を引き起こすレトロウイルス科レンチウイルス属のウイルスである。感染により成山羊は関節炎, 乳房炎および肺炎を, 幼若個体は脳脊髄炎を呈するが, 発症する個体は全体の 10% 程度とされる。さらに, CAEV に感染した個体が抗体を産生するまでに数ヶ月から数年, 発症するまでにも数年かかるため, 症状を基にした監視や, 一回のみの検査では本ウイルスの蔓延を見逃してしまう恐れがある。従って, CAEV のコントロールには, 定期的な抗体検査や遺伝子検査による

- 1) 動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム
〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
- 2) 動物衛生研究所 環境・常在疾病研究チーム (九州支所)
〒 891-0105 鹿児島県鹿児島市中山町 2702
- 3) 動物衛生研究所 細菌・寄生虫病研究チーム
〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5

* Corresponding author; Kenji MURAKAMI
Research Team for Viral Diseases, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0856, JAPAN
Tel: +81-29-838-7841
Fax: +81-29-838-7844
E-mail: muraken@affrc.go.jp

感染個体の摘発淘汰が重要となる。日本は長年, CAE 未発生国と考えられていたが, 2002 年に国内の大規模農場においてその存在が明らかとなった。我々は, 平成 15 ~ 16 年度の所内プロジェクトにおいて, 寒天ゲル内沈降試験 (AGID) による抗体検査法および nested PCR によるウイルス遺伝子検出法を開発し, わが国における CAE の診断法を確立した。しかし, AGID は操作が簡便である反面, 弱陽性の判定に習熟を要し, 抗原作製に大量のウイルス液が必要といった短所がある。また, nested PCR は反応に時間がかかる, コンタミネーションが起りやすい, という点から多数検体処理には不向きであった。一方で近年, 両検査法を用いた調査により CAEV の国内浸潤状況が明らかとなるにつれ, 大規模農場における CAE 清浄化の実施や, 陰性農場における定期検査のため, 群単位での検査依頼が増加している。本研究では, 現行の CAEV 検査法に代わり, 多検体処理が容易な方法を確立することを目的とし, ELISA 法を用いた抗体検査およびリアルタイム PCR 法による遺伝子検出法を開発を試みた。また, ELISA 法開発の上で作製された抗原を用い, 単クローン抗体およびウサギ免疫血清を作製し, 病理組織学的検索のツールとして使用する方法を検討した。

材料と方法

I. 抗体検出法の開発

A. 抗原作製

1. 精製 CAEV 抗原 (wCAEV)

国内で分離された CAEV40-8 株を羊胎児肺 (FLL) 細胞に接種し, 21 ~ 28 日後に培養上清を回収した。シヨ糖密度勾配遠心法により精製したウイルスを 1%TNE・Np-40 加 PBS により可溶化し, wELISA およびウエスタンブロット法 (wWB) 用抗原とした。

2. 組換え蛋白質抗原 (rPr55gag)

CAEV40-8 株感染 FLL 細胞より DNA を抽出し, PCR により CAEV のプロウイルス DNA からコア蛋白 (Gag) 前駆体 (Pr55gag) をコードする遺伝子 (gag) の全領域を増幅した。増幅した遺伝子を大腸菌発現ベクター (pColdTF, タカラバイオ) にクローニングし, 得られたプラスミドを用いて大腸菌 JM109 株を形質転換した。形質転換後の大腸菌に IPTG による発現誘導をかけ, 可溶性画分より回収した組換え蛋白質 (rPr55gag) を, rELISA および rWB 用抗原とした。また, 陰性対照として, 何もクローニングされていない pColdTF により発現させた蛋白質 (rPColdTF) を用いた。

3. AGID 用抗原

CAEV40-8 株感染 FLL 細胞の培養上清を硫酸アンモニウム沈殿法により濃縮し, AGID 用抗原とした。

4. 抗原特異性の確認

wCAEV, rPr55gag および rPColdTF について, SDS-PAGE ならびに一次抗体に抗 CAEV 抗体陽性ヤギ血清 (4,000 倍希釈), 二次抗体に HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (5,000 倍希釈) を用いた WB を行い, 抗原のサイズと特異性を確認した。

B. コントロール血清および被検血清

各 WB および ELISA 法の陽性血清には, 関節炎を呈し, 病理組織学的に手根関節の関節包膜に非化膿性炎症が認められ, AGID および nested PCR が陽性であった山羊の血清を用いた。陰性血清には, CAE の特徴的な臨床症状を示さず, 年に 2 回, 定期的に AGID による抗体検査を受け, 計 4 回の検査で陰性であった成山羊 2 頭の血清を用いた。また, rELISA および wELISA の精度の検証には, 11 県 16 農家から集められた山羊血清 745 検体を用いた。

C. ELISA 法の検証

1. 反応条件の検討

ELISA 法は, 常法の間接 ELISA 法に従って実施した。ELISA 法の抗原濃度, 一次抗体および二次抗体の希釈濃度は, 陽性血清を用いたボックスタイトレーションにより決定した。

2. 野外血清を用いた ELISA 法の精度の検証

山羊血清 745 検体について, wELISA, rELISA, AGID, wWB および rWB による検査を実施した。血清は, wWB で CAEV の構造蛋白である p16/19 (マトリックス/ヌクレオカプシド), p28 (カプシド) または gp90 (トランスメンブレン蛋白の重合体) のいずれかを検出した場合を陽性とした。wWB の結果に基づき, 各 ELISA 法の結果を two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) 法により分析した。各 ELISA 法についての TG-ROC 曲線から ELISA 法のカットオフ値を決定し, その値における感度・特異度を比較した。また, wWB の結果と rWB, AGID, rELISA および wELISA の結果をそれぞれ比較し, κ 係数により検査法の一致度を評価した。

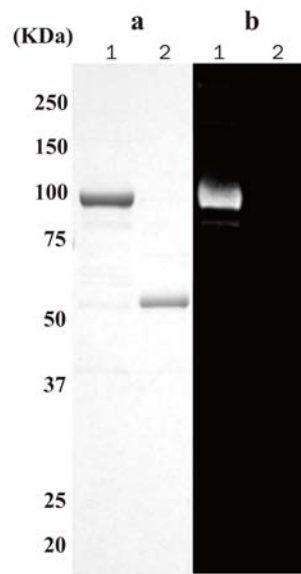


図1. rPr55gagの発現確認
 a: SDS-PAGEによる抗原サイズの確認。
 レーン1: rPr55gag (104.5kDa)
 レーン2: rPColdTF (53kDa)
 b: WBによる抗原特異性の確認。
 レーン1: rPr55gag (104.5kDa)
 レーン2: rPColdTF (53kDa)

II. 抗原検出法の開発

A. 単クローン抗体およびウサギ免疫血清の作製

wCAEV および rPr55gag に対する単クローン抗体 MAb194(抗 wCAEV 抗体) および MAb294(抗 rPr55gag 抗体) を作製した。また、同抗原をウサギ各1羽に接種し、得られた免疫血清を抗 CAEV 血清および抗 rPr55gag 血清とした。

B. 作製抗体による抗原検出

作製した各抗体は、wELISA, rELISA, 間接蛍光抗体法 (IFA) および酵素抗体法 (IPT) より抗原に対する特異性を確認した。IFA には CAEV40-8 株感染 FLL 細胞を用い、IPT には同細胞および非感染 FLL 細胞の凍結切片アセトン固定標本、ならびにホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。また、CAEV 感染および非感染山羊各1頭の関節および肺の凍結切片をアセトン固定し、同様に IPT を実施した。

III. 遺伝子検出法の開発

CAEV 遺伝子の gag 領域を標的としたプローブおよびプライマーを設計し、定量リアルタイム PCR 法を開発した。遺伝子コピー数の指標として CAEV の gag 領域をクローニングしたプラスミド DNA (pQE CAEVgag) を用いて標準曲線を作成した。pQE CAEVgag をテンプレートとし、nested PCR 法とリアルタイム PCR 法の検出限界を比較した。さらに、山羊胎児肺 (FGL) 細胞に CAEV40-8 株を接種し、接種後 1 ~ 5, 7, 10, 14 および

28 日目に培養上清から RNA, 感染細胞から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法, nested PCR 法および RT-PCR 法による CAEV 遺伝子検出を行った。また同時に、感染細胞をギムザ染色し、CAEV 感染によって形成される多核巨細胞を検出するシンシチウムアッセイを行い、各検査法における抗原検出時期を比較した。

結 果

I. 抗体検出法

A. 抗原の反応性

陽性山羊血清を用いた WB の結果、wCAEV 抗原では分子量約 90, 55, 28 および 20kDa の蛋白質が検出された。一方、rPr55gag は、分子量約 105kDa の蛋白質として検出された。rPColdTF は、SDS-PAGE では分子量約 53kDa のバンドとして確認されたが、WB では検出されなかった (図1)。陰性山羊血清は、これらのいずれの蛋白質とも反応しなかった。

表1. wWBにおいて検出された抗原の内訳

検出抗原			陽性サンプル数
gp90	p28	p16/19	
+	+	+	7 (1.9%)
+	+	-	140 (37.6%)
+	-	+	1 (0.3%)
+	-	-	184 (49.5%)
-	+	+	6 (1.6%)
-	+	-	32 (8.6%)
-	-	+	2 (0.5%)
合計			372

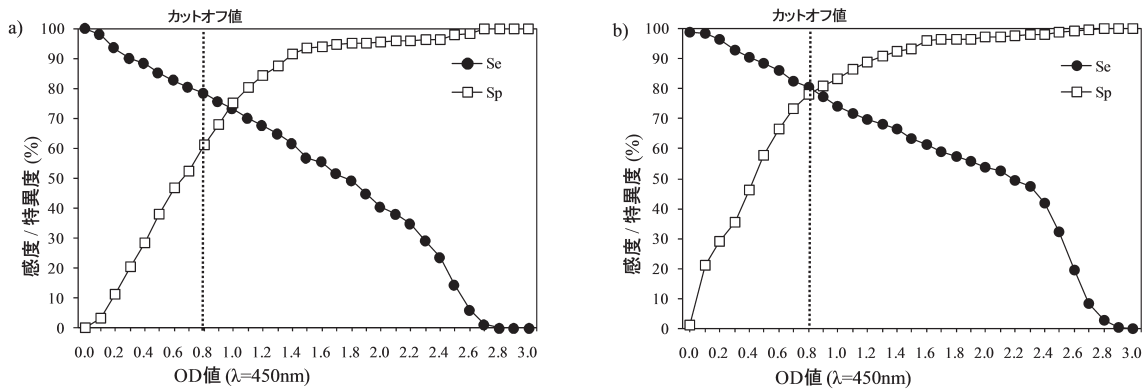


図2. 両ELISA法のTG-ROCによる分析
 OD値による各ELISA法の感度 (Se) および特異度 (Sp) の変化を示す。
 a: rELISAのTG-ROC b: wELISAのTG-ROC

表2. 各検査法のwWBに対する感度, 特異度および一緻度 (κ係数)

検査法*	wWB		感度†	特異度†	κ係数‡
	+	-			
rELISA	+	291	78.20%	61.10%	0.39
	-	81	(74.9-81.3)	(57.8-64.2)	(0.33-0.46)
wELISA	+	299	80.40%	78.00%	0.58
	-	73	(77.3-83.1)	(75.0-80.8)	(0.47-0.60)
rWB	+	347	93.30%	96.00%	0.89
	-	25	(88.4-92.3)	(90.6-94.5)	(0.86-0.92)
AGID	+	346	93.00%	96.30%	0.89
	-	26	(91.2-94.3)	(94.40-97.60)	(0.86-0.92)

* + = positive; - = negative.

† () 内は95%信頼区間

‡ κ係数; κ > 0.75: 高い一緻度, 0.40 < κ < 0.75: 中程度の一緻度, κ < 0.40: 低い一緻度

表3. 作製抗体による抗原検出検査結果

抗体	wELISA	rELISA	IFA	IPT	
				凍結切片 (アセトン固定)	パラフィン切片 (ホルマリン固定)
MAb 194	+	-	+	-	-
MAb 294	+	+	-	+	-
抗CAEV血清	+	-	+	-	-
抗rPr55gag血清	-	+	-	+	-

B. ELISA法の反応条件

条件検討の結果より, 抗原濃度はwELISAで133ng/50μl/well, rELISAで15ng/50μl/well, また, 両ELISA法ともに山羊血清は400倍希釈, 二次抗体は10,000倍希釈と設定した。陰性ヤギ血清を用いて同条件で検査したところ, いずれのELISA法においても非特異的反応は認められなかった。

C. ELISA法の検証

山羊血清745検体のうち, 372検体がwWBで陽性を示した。wWB陽性血清の多くが, gp90のみ, もしくはgp90およびp28と特異的に反応した(表1)。TG-ROC分析により, 各ELISA法のOD値による感度および特異度の変化がTG-ROC曲線として示され(図2), 両ELISA法ともにカットオフ値はOD₄₅₀=0.8と決定した。wWBの

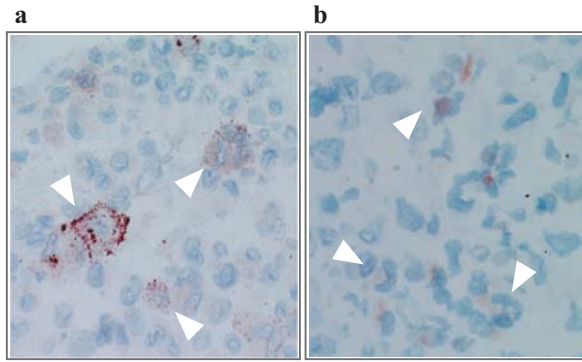


図3. 各抗体を用いた酵素抗体法
各抗体により、CAEV 感染 FLL 細胞内の抗原が特異的に検出された (矢頭)。
a: 抗 rPr55gag 血清, b: MAb294

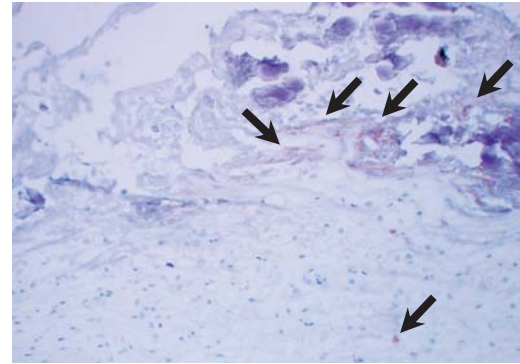


図4. 抗 rPr55gag 血清を用いた酵素抗体法
抗 rPr55gag 血清により、CAEV 感染山羊の手根関節包膜病変部に一致して抗原が検出された (矢印)。

表4. 各検査法によるウイルス検出時期の比較

接種後日数	1	2	3	4	5	7	10	14	21	28	NC(28)
リアルタイムPCR ^{※1}	+	+	+	+	+	+	+	+	NT ^{※2}	+	-
	3.8	3.2×10 ²	1.5×10 ³	1.4×10 ⁴	6.2×10 ⁴	8.8×10 ⁴	5.8×10 ⁴	2.5×10 ⁴	NT	8.7×10 ⁴	0
nested PCR	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	+	-
RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
シンシチウム数	0	0	0	55	289	1,243	1,092	2,721	5,393	3,586	0

※1 下段はウイルス遺伝子数 (copies/ng)

※2 NT: not tested

結果に対する両 ELISA 法、rWB および AGID の感度・特異度および κ 係数は表 2 に示した。

II. ウイルス抗原検出

作製した単クローン抗体およびウサギ免疫血清を用いて抗原に対する特異性を確認したところ、表 3 の通りになった。CAEV 感染細胞の凍結切片アセトン固定標本を用いた IPT において、MAb294 および抗 rPr55gag 血清は、CAEV を特異的に検出した (図 3 および 4)。一方、非感染細胞を用いた IPT では、いずれの固定法においても特異的な反応は認められなかった。

III. 遺伝子検出法

プラスミド DNA を用いた検出限界の比較では、nested PCR 法およびリアルタイム PCR 法ともに 1 コピーまで CAEV 遺伝子を検出した。また、CAEV40-8 株感染

FGL 細胞から抽出した DNA を用いて、両 PCR 法によるウイルス遺伝子検出時期を比較したところ、リアルタイム PCR 法では接種後 1 日目から、nested PCR 法では接種後 2 日目から CAEV 遺伝子が検出された。シンシチウムアッセイ法では、接種後 4 日目から多核巨細胞が観察され、その数は感染日数とともに増加した (表 4)。培養上清より抽出した RNA を用いた RT-PCR 法では、実験期間中 (接種後 28 日後まで) CAEV 遺伝子は検出されなかった。

考 察

CAEV の主要構造蛋白はコア蛋白 (Gag) と、膜蛋白 (Env) である。CAEV 感染個体は感染初期に Gag に対する抗体を産生し、その後、抗 Env 抗体を産生、維持するとされている。しかし、レンチウイルス属の Env 遺伝子領域は変異性が高く、抗 Env 抗体または Env 遺伝子

を検出の標的とするのは難しい。

一方, gag 領域は遺伝子の保存性が高い。また Gag は, 分子量 55kDa の前駆体 Pr55gag が開裂して生じる 3 種類の成熟蛋白質 (p28, p16 および p19) から構成される。Pr55gag は互いにオーバーラップせずに 3 つに開裂するため, 感染個体はこれらの蛋白質の全てまたはいずれかに対する抗体を産生する。さらに, 各抗体は Pr55gag も検出することが確認されている。そこで本研究では, 抗原複合体である Pr55gag の組換え蛋白質を抗原として用いることで, それ自身に対する抗体のみならず, 3 種の成熟蛋白質に対する抗体も検出できるのではないかと推測した。しかし, 作製した両 ELISA 法は, wWB に比べて特異度・感度ともに低いことが明らかになった。wWB で陽性となった血清の多くが gp90 と p28 に特異的な反応を示していたことから, rELISA 法の感度を上げるためには, Gag のみではなく Env も抗原として組み合わせて用いる必要があると推察された。また, 両 ELISA 法では, 低希釈倍率での陰性血清の OD 値が高かったため, 血清の希釈倍率を 400 倍と通常の ELISA に比べてかなり高く設定した。そのため, 一部の検体が false-negative となり, 両 ELISA 法の感度が下がった可能性も考えられる。一方で, rWB は AGID 同様, 感度・特異度ともに両 ELISA 法より高く, wWB との一致度も高かった。rPr55gag の作製はウイルス精製より容易であり, rWB は他のレンチウイルス同様, CAEV 感染の確定診断に使用できるものと考えられる。

作製した単クローン抗体およびウサギ免疫血清は, 抗原検出において免疫抗原によって異なる反応性を示した。MAb194 および抗 CAEV 血清は IFA において,

MAb294 および抗 rPr55gag 血清は凍結切片アセトン固定標本を用いた IPT において特異的な反応を示した。いずれの検出法でも感染細胞はアセトン固定するが, IFA では平面の細胞を固定するのに対し, IPT では細胞をペレット化した上で切り出し, これを固定する。この工程によって, MAb294 および抗 rPr55gag 血清を用いた IFA では検出限界以下であった抗原の露出量が IPT では増加し, 同抗体によって検出された可能性も考えられる。しかし, MAb194 および抗 CAEV 血清が IPT で抗原を検出しなかった点については, 原因は不明である。組織切片を用いた IPT において, 抗 rPr55gag 血清以外では特異的な反応が認められなかったのは, CAEV の体内におけるウイルス量が低いためではないかと考えられる。MAb194 および抗 CAEV 血清については, 今後ウイルス学的検査において IFA に利用したいと考えている。

本研究で開発したリアルタイム PCR 法は, 現行の nested PCR 法と同等の検出感度を示した。このリアルタイム PCR 法を用いることにより, 多検体を現行の nested PCR よりも効率よく処理できると考えられる。今後, 野外材料を用いた両検査法の一致度を確認する予定である。

謝 辞

本研究は, 平成 19 ~ 20 年度動物衛生研究所・重点強化研究費の助成を受けて実施した。本研究の実施にあたり, 野外山羊血清をご提供下さった各県の家畜保健衛生所の皆様, データ解析にご尽力くださった農林水産省動物衛生課 山本健久博士にこの場をお借りして深謝いたします。

Summary

Development of novel diagnostic methods of Caprine arthritis-encephalitis virus infection

Misako KONISHI¹⁾, Hiroaki SHIRAFUJI²⁾, Kumiko KIMURA³⁾, Makoto HARITANI³⁾,
Ken-ichiro KAMEYAMA¹⁾ & Kenji MURAKAMI¹⁾

Two different enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and real time PCR were developed as the new diagnostic tests of Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. The ELISAs used the whole virus (wCAEV) and recombinant protein of major core protein of CAEV (rPr55gag) as the antigen, and were designated wELISA and rELISA, respectively. The performance of each ELISA was evaluated by the western blot analysis using wCAEV as antigen (wWB). wELISA had substantially low sensitivity (80.4%) and specificity (78.0%) compared to wWB, and rELISA had lower sensitivity (78.2%) and specificity (61.1%) than wELISA. The lack of adequate sensitivity and specificity for rELISA and wELISA suggests that these assays need considerable modification. However, the WB used rPr55gag as antigen showed excellent agreement with wWB and that it can be used as a confirmatory test for the presence of anti-CAEV antibodies. The monoclonal and polyclonal antibodies against wCAEV and rPr55gag were tested by indirect immunofluorescence assay (IFA) and immunoperoxidase technique. The results of these assays suggested that the antibodies would be available for CAEV detection. The real time PCR had similar sensitivity to the preexisting nested PCR.