

ブルータングゲル内沈降反応におけるイバラキウイルス感染牛血清の類属反応の発生頻度とブルータング特異的競合ELISAの有用性

清水眞也¹⁾, 豊田勇夫²⁾, 有島太一³⁾, 後藤義之¹⁾

(平成17年 8月26日 受付)

Serological cross-reactions between Ibaraki and bluetongue viruses that occurred when the agar gel immunodiffusion test was used disappeared when BT-competitive ELISA was used

Shinya SHIMIZU^{1)*}, Isao TOYOTA²⁾, Taichi ARISHIMA³⁾ & Yoshiyuki GOTO¹⁾

1994年わが国でのブル-タング(BT)発生以来, その血清検査には不活化BTウイルス抗原を用いたゲル内沈降反応(AGID)が実施されてきた。時に同じオルピウイルスに属するイバラキ(IBA)ウイルスとの類属反応と考えられる陽性例が散見され, 現場において判断に混乱が生じることがある。しかし, どの程度の頻度でその類属反応が発生するかは明らかでない。そこで, IBAウイルス感染陽性牛血清を用い, BTウイルスに対する中和抗体が陰性でBTのAGIDが陽性を示す類属反応の頻度を検査した。その結果, その類属反応はIBAウイルス中和抗体価が1:4以上の血清で認められ, 42.5%の頻度で起こることが判明した。この類属反応はBTウイルス不活化濃縮抗原およびBTウイルスVP7を認識するモノクロ-ナル抗体を用いた競合ELISA(c-ELISA)では解消された。IBAウイルス感染の疑われる地域でのBTの血清診断には競合ELISAが推奨される。

背景・ねらい

BTウイルスはReoviridae, Orbivirusに属する昆虫媒介性のウイルスで, めん羊, 山羊, 牛, 水牛, 鹿等の家畜および野生の反芻獣に感染する。特にめん羊において重要な感染症で, 国際重要伝染病として2004年までは国際獣疫事務局(OIE)からリストAに分類されていた¹⁶⁾。媒介は吸血昆虫, 特にヌカカ(Culicoides)によって伝播されることが明らかにされている。現在までに全世界

で24の血清型が報告されており, わが国では血清型21のBTウイルスが流行・分離されている⁶⁾。血清診断法として, 血清型別に関係なくBTウイルス感染を証明できるゲル内沈降反応(AGID)および競合ELISA(c-ELISA), 特定の血清型の感染を同定できるウイルス中和試験(VNT)が開発されており^{5, 7, 8, 16)}, わが国では主として簡便なAGIDが実施されている。

わが国においてBTは, 1994年, 北関東地方で牛, めん羊で初めて発生し, その後終息し, 2001年秋に初発農家のめん羊において再度の発生が確認された⁶⁾。以降の発生は確認されていない。一方, 農林水産省消費・安全局動物衛生課の「牛異常産抗体調査」事業の一環として毎年BTの全国調査が実施されている。本調査によると, 牛において中国・九州地方を中心にBTウイルスに対する抗体の陽転がほぼ毎年認められることが報告されており, わが国において同地域を中心にBTウイルスは不顕

- 1) 動物衛生研究所
- 2) 長崎県中央家畜保健衛生所
- 3) 佐賀県中部家畜保健衛生所

* Corresponding author ; Mailing address : Shinya SHIMIZU, Department of Immunology, Immuno-pathology section, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan Tel&Fax : +81(0)29-838-7833 E-mail : shimizux@affrc.go.jp

性感染の形で流行を繰り返していると考えられる。これまでも発症は確認されていないが, BTウイルスの分離が報告されている。しかし, これらの多くの血清型は判明していない。

わが国には, 同じ*Reoviridae*, *Orbivirus*に属し, 流行性出血熱 (EHD; Epizootic Hemorrhagic disease) ウイルスに分類されているイバラキ (IBA) ウイルスが存在している。EHDは主としてシカ類の疾病として知られている^{12, 13, 14, 19, 20}。一方, IBAウイルスは牛にのみ病原性を示し, 特に和種で感受性が高いことが報告されており²², 本ウイルスの流行はわが国以外では韓国および台湾で報告されている。このため, IBAウイルスに関する研究報告や症例報告は本邦を中心とした東アジアに限局されるのが現状である。IBAウイルスは西日本を中心に5~10年おきに本ウイルスによるIBA病が発生しており, 発症予防のためワクチン接種も行われている^{10, 22}。血清診断法としては, 主としてVNTが実施され, 赤血球凝集阻止 (HI) 試験も開発されている。

BTウイルスおよびIBAウイルスが属する*Orbivirus*属ウイルスでは, 血清反応の際に共通抗原に由来する類属反応を示す場合がある^{12, 13, 14, 15, 19, 20, 21}。これらの報告は, 高度免疫血清を用いた交差試験の結果やシカでの結果から得られたものが多い。牛感染血清におけるIBAウイルスとBTウイルスとの間に類属反応の存在が示唆されているが, その報告はなく, IBAウイルス感染牛陽性血清のBTのAGIDにおける類属反応の実態・頻度は不明である。わが国におけるBTの血清診断法としてAGIDが実施されているが, IBAウイルスとの類属反応と考えられる陽性例が散見され, 家畜保健衛生所におけるBTの診断に混乱が生じている。そこで, IBAウイルス野外感染牛血清を用い, BTのAGIDにおける類属反応の頻度を明らかにする目的で以下の実験を行った。一方, OIEの診断基準では, *Orbivirus*属ウイルスの類属反応の問題からEHDウイルスが存在する地域でのBTの血清診断法として競合c-ELISAが推奨されている¹⁶。そこで, IBAウイルス感染血清を用いたBTのAGIDにおける類属反応がc-ELISA^{1, 2, 3, 4, 9, 11, 16, 17}を用いることにより解消が可能か検討した¹⁸。

方法

(1) 動物衛生研究所に保存されているIBAウイルス感染陽性牛血清 (40例) に対しては, IBAウイルスおよびBTウイルスを用いたVNTおよびAGIDを行い, 併せてBTのc-ELISAを行った。また, IBAウイルスおよびBT

ウイルスに対する中和抗体陰性血清 (18例), およびBTウイルスに対する中和抗体陽性牛血清 (58例) に対してはIBAウイルスを用いたAGIDを行った。

(2) AGID用抗原は, BTウイルスあるいはIBAウイルスを大量培養し, ホルマリンで不活化後, 至適抗原力価を求めて用いた。

(3) BTのc-ELISAは, OIEの基準に沿って開発した。抗原にはBTウイルス細胞培養上清を不活化し, 精製濃縮して用いた。競合するモノクローナル抗体 (MAb) にはBTウイルスVP7抗原を認識する8A3B.6株 (ATCC株) 由来精製IgG2aを, MAbの検出にはPOD標識anti-mouse IgGAM (SIGMA; A 0412) を使用した。上記血清の%Inhibitionを下記の式により求め, 50%以上を陽性, 40-50%を擬陽性, 40%以下を陰性とした¹⁶。

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{100 \times \text{meanOD of test serum}}{\text{meanOD of negative control serum}}$$

> 50% : 陽性

< 40% : 陰性

40 ~ 50% : 擬陽性

結果

(1) IBAウイルス感染陽性牛血清40例におけるIBAウイルスに対する中和抗体価は, 1:2が3例 (7.5%), 1:4が4例 (10.0%), 1:8が9例 (22.5%), 1:16が7例 (17.5%), 1:32が6例 (15.0%), 1:64が5例 (12.5%), 1:128が2例 (5.0%), 1:256が4例 (10.0%) であった。BTウイルス中和抗体価はいずれも1:2未満で, すべて陰性であった。IBAウイルスを用いたAGIDで陽性は36例 (90.0%) であった (図1)。また, BTウイルスを用いたAGIDで陽性を示した例は17例 (42.5%) であった (図1)。IBAウイルス感染陽性牛血清においてIBAウイルス中和抗体価

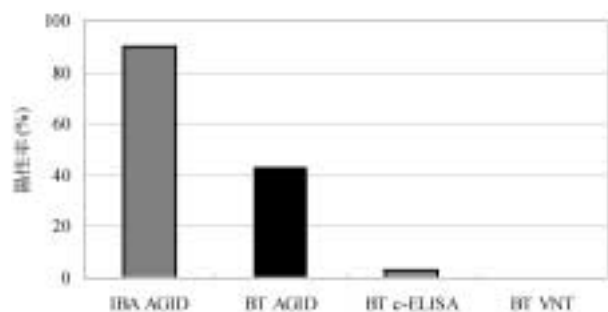


図1 イバラキ (IBA) ウイルス感染陽性牛血清のIBAゲル内沈降反応 (AGID), プル-タンク (BT) AGID, BT競合エライザ (c-ELISA), BTウイルス中和試験 (VNT) における陽性率 (%)

毎ごとにBTウイルスを用いたAGIDにおける類属反応の出現頻度を見ると、IBAウイルス中和抗体価1:2では類属反応は認められなかった(0/3, 0%)が、IBAウイルス中和抗体価1:4では4例中2例(50.0%)、1:8では9例中3例(33.3%)、1:16が7例中3例(42.9%)、1:32が6例中1例(16.7%)、1:64が5例中3例(60.0%)、1:128が2例中1例(50.0%)、1:256が4例中4例(100.0%)の頻度で、いずれも類属反応が確認された。特に1:256では、すべてのサンプルで類属反応が起こっていた(図2)。BTのc-ELISA陽性は1例(2.5%)であった(図1)。

(2) IBAウイルスおよびBTウイルスに対する中和抗体陰性血清(18例)では、IBAウイルスを用いたAGIDは、すべて陰性であった。

(3) BTウイルスに対する陽性血清(58例)では、IBAウイルスAGID陽性が5例(8.6%)認められた。これらはBTウイルスに対する中和抗体価がすべて1:64以上であった。

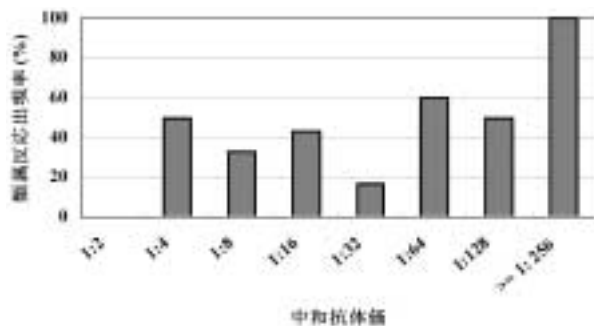


図2 イバラキ (IBA) ウイルス感染陽性牛血清を用いた IBAウイルスに対する中和抗体価でのブルータンクゲル内沈降反応における類属反応の出現率 (%)

考察

Reoviridae, *Orbivirus*属ウイルス間では、血清反応における類属反応が問題にされる場合があるが^{12)~14)}、IBAウイルス感染牛血清でのBTウイルスを用いたAGIDにおける類属反応の発生頻度については明らかにされていない。そこで、IBAウイルス感染牛血清においてどの程度の頻度で類属反応が起こっているかを検討したところ、BTウイルスに対する中和活性が認められないIBAウイルスに対する中和抗体陽性牛血清をBTのAGIDで検査すると42.5%もの高頻度で類属反応が認められた(図1)。このことから、AGIDを実施している現場では、IBAウイルス感染によると考えられる類属反応が発生し、判定に苦慮することがかなりの頻度で起こっていることが示唆

された。また、IBAウイルスに対する中和抗体価が1:4以上であれば類属反応が起こることが判明した(図2)。IBAウイルスに対する中和抗体価との関連性についても顕著な相関関係は認められなかったが、BTに対する中和抗体価が上昇すると類属反応も増加する傾向が見られた。わが国では西日本を中心にIBAウイルスがしばしば流行しており、この地域においてBTのAGIDを実施する際には、判定に注意を要することが示唆された。また、IBAウイルス濃縮精製不活化抗原を用いたAGIDでの検出率は90%であり、VNTの方が感度がやや高いと判断された。一方、IBAウイルスおよびBTウイルスに対する中和抗体陰性血清では、類属反応は見られなかったが、BTウイルスに対する中和抗体陽性牛血清では、中和抗体価1:64以上の血清で類属反応が見られ、その頻度は8.6%であった。BTウイルスに対する中和抗体陽性血清での類属反応の頻度はIBAウイルスのそれに比較して低いことが明らかとなった。

共通抗原に由来する類属反応をAGIDで区別することは困難である。そこで、IBAウイルス感染陽性血清におけるBTのAGIDを行った場合の類属反応を区別する血清診断法としてc-ELISAについて検討したところ、IBAウイルス感染陽性牛血清40例のうち、類属反応を示した17例中16例がc-ELISAでは陰性となり、類属反応がほぼ解消し、特異性の向上が確認された。c-ELISAで陽性となった1例は、VNTに用いたBTウイルスが血清型21であり、他の血清型に感染していた可能性、あるいは、c-ELISAがVNTより感度が高い可能性が考えられる。なお、類属反応を示さなかった23例はすべてc-ELISAで陰性を示し、BTウイルスを用いたVNTの結果と一致した。この結果は、IBAウイルス感染牛血清においてBTのAGIDを用いた場合の類属反応はBTのc-ELISAによりほぼ除去できることを示している。

わが国では西日本を中心にIBAウイルスとBTウイルスに対する抗体を有する牛の例が散見されることから、両ウイルスが共存していることも推察される。また、IBAウイルス感染陽性牛血清においてもBTのAGIDを用いると高頻度に類属反応が起こることも明らかになったので、IBAウイルスの流行が疑われる地域でのBTウイルスに対する抗体検査はIBAウイルスに対する抗体との類属反応がないc-ELISAが推奨される。また、わが国に現在生体輸入される牛の頭数は年々増え続けており、EHDウイルス陽性地域からの輸入検疫の際におけるBTウイルスの検査はc-ELISAが推奨される。一方、IBAウイルスの血清診断法の特異性を高めるため、IBAウイル

スに対して特異的MAbを開発し, これを用いてc-ELISAを開発することにより, より精度の高い診断体系の確立が可能となると考える。

従来, ウイルス感染の血清学的診断法として様々なものが開発されており, 主なものにVNTとAGIDなどがある。VNTは, 最も基本的な抗体測定法であるが, (1) 生きたウイルスを用いる必要がある, (2) 多量の検体を扱うことは困難である, (3) 判定までの時間が長い, (4) 血清型が測定する血清抗体に合致したウイルス株を選定する必要がある, 等の問題がある。一方, AGIDでは, 特別な測定機器を必要とせず, 手技が簡便である利点を有しているが, (1) 感度が低い, (2) 判定が主観的になる, (3) 多数検体を取り扱うことは困難である, (4) 判定までに時間を要する(通常2日以上), (5) 使用する抗原量が多い, (6) 類属反応の場合には正確な判定を下すことができない, 等の問題点がある。迅速かつ高感度な血清学的診断法としてさまざまな感染症の診断に応用されつつある手法のひとつにELISAがある。家畜ウイルスにおいて感染症の血清学診断法としてELISAは, (1) 測定にやや高価な機器を必要とする, (2) 感度が高いことにより非特異反応が発生する, (3) 前述のように類属反応が起こる, 等の問題がある。特に, 非特異反応と類属反応は, 診断を曖昧にすることで普及の阻害因子である。ここで紹介したように, c-ELISAを用いることにより血清反応で見られる非特異反応や類属反応の回避が可能である。各種病原体に特異的なMAbを開発し, c-ELISAに活用することにより, より特異性の高い診断法を開発することが可能である。以上のように, c-ELISAは家畜の様々な病原体の診断法として有望な手法であり, 今後, 開発・普及が望まれる手法である。

引用文献

- 1) Anderson, J : Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immunol. Methods*, 74, 139-149 (1984).
- 2) Afshar, A., Thomas F.C., Wright P.F., Shapiro J.L., Shettigara P.T. & Anderson J : Comparison of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for detection of bluetongue virus antibodies in serum and whole blood. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1705-1710 (1987).
- 3) Afshar, A., Thomas F. C., Wright P.F., Shapiro J.L. & Anderson J : Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, 124, 136-141 (1989).
- 4) Afshar, A., Eaton, B. T., Wright P.F., Pearson J. E., Anderson, J., Jeggo, M. & Trotter H.C : Competitive ELISA for serodiagnosis of bluetongue : evaluation of group-specific monoclonal antibodies. *Diagnostics and expressed VP7 antigen. J. Vet. Diag. Invest.*, 4, 231-237 (1992).
- 5) Gorman, B.M., Taylor, J. & Walker, P.J: Orbiviruses. In *The Reoviridae* (W.A. Joklik, ed.) Plenum Press, New York, 287-357 (1983).
- 6) Goto, Y., Yamaguchi, O., and Kubo M : Epidemiological observation on bluetongue in sheep and cattle in Japan. *Vet. Ital.* 40 : 78-82 (2004).
- 7) 後藤義之 : 「牛のブルータング」. *動物の感染症* (清水悠紀臣ら編集) 116, 近代出版, 東京 (2002).
- 8) 後藤義之 : 「羊のブルータング」. *動物の感染症* (清水悠紀臣ら編集) 166, 近代出版, 東京 (2002).
- 9) House, C., House, J. A. & Berninger, M. L : Detection of bluetongue group-specific antibody by competitive ELISA. *J. Vet. Diag. Invest.*, 2, 137-139 (1990).
- 10) Inaba, Y : Ibaraki disease and its relation to bluetongue. *Aust. Vet. J.*, 51, 178-185 (1975).
- 11) Lunt, R. A., White, J. R. & Blacksell, S. D : Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. *J. Gen. Virol.*, 69, 2729-2740 (1988).
- 12) Moore, D.L : Bluetongue and related viruses in Ibadan, Nigeria : serologic comparison of bluetongue, epizootic hemorrhagic disease of deer, and Abadina (Palyam) viral isolates. *Am. J. Vet. Res.*, 35, 1109-1113 (1974).
- 13) Moore, D. L. & Lee V. H : Antigenic relationship between the virus of epizootic haemorrhagic disease of deer and bluetongue virus. *Archiv. Gesamt.Virusforsch.*, 37, 282-284 (1972).
- 14) Moore, D. L. & Kemp G.E : Bluetongue and related viruses in Ibadan, Nigeria : serologic studies of domesticated and wild animals. *Am. J. Vet. Res.*, 35, 1115-1120 (1974).

- 15) Murray, J. O. & Trainer, D. O : Bluetongue virus in North American elk. *J. Wildl. Dis.*, 6, 144-1488 (1970).
- 16) Office International des epizooties (OIE) : Bluetongue, Chapter 2.1.9. In *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. OIE, Paris (oie.int/eng/normes/mmanual/A_00032.htm) (2002).
- 17) Reddington, J.J., Reddington, G. M. & MacLachlan, N. J : A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. *J. Vet. Diag. Invest.*, 3, 144-147 (1991).
- 18) Shimizu, S., Toyota, I., Arishima, T. and Goto, Y : Frequency of serological cross-reactions between Ibaraki and bluetongue viruses using the agar gel immunodiffusion test. *Vet. Ital.* 40 : 583-586 (2004).
- 19) St George, T. D., Cybinski, D. H., Standfast, H. A. & Gard, G. P : The isolation of five different viruses of the epizootic haemorrhagic disease of deer serogroup. *Aust. Vet. J.*, 60, 216-217 (1983)
- 20) Thomas, F. C. & Miller, J : A comparison of bluetongue virus and EHD virus : electronmicroscopy and serology. *Can. J. Comp. Med.*, 35, 22-27(1971)
- 21) Trainer D. O. & Jochim M. M : Serologic evidence of bluetongue in wild ruminants of North America. *Am. J. Vet. Res.*, 30 (11), 2007-2011 (1969).
- 22) 津田知幸 : 「イバラキ病」. *動物の感染症* (清水悠紀臣ら編集). 101 , 近代出版 , 東京 (2002).

Summary

Cross-reactions between bluetongue (BT) and epizootic haemorrhagic disease (EHD) virus serogroups have been reported. Ibaraki virus (IBAV), a member of EHD the serogroup, is endemic in Japan. The agar gel immunodiffusion test (AGID) is performed to survey for BT antibody in Japan. BT AGID-positive results are sometimes observed in areas of Japan in which IBAV is endemic, and this makes the interpretation of BT surveillance results difficult. However, the frequency of cross-reactions between BT virus (BTV) or IBAV-positive field serum samples against the IBA and BT AGID tests is not clear. We investigated the frequency of serological cross-reactions between IBAV and BTV on the AGID. And also, we evaluated the cross-reaction between IBA and BT in the competitive enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA). The percentage of IBAV neutralisation-positive bovine serum samples that showed a positive result in the BT AGID test was 42.5%; 12.2% of the BT AGID-positive serum samples and 2.5% of the BT AGID-negative serum samples showed a positive result in the IBA AGID test. When the BT c-ELISA was used, these cross-reactions disappeared. These results indicate that serum samples from areas in which IBAV is epidemic often have positive results in the BTV AGID test, but negative results in the BTV virus neutralisation test (VNT). To obtain specific BTV surveillance results in the IBAV endemic areas, the AGID-positive results should be confirmed using the c-ELISA or VNT.

(*:Immunopathology Section, Department of Immunology TEL +81-29-838-7833)