

ブルータング特異的競合ELISAによるイバラキウイルス感染血清のブルータングゲル内沈降反応における類属反応の解消

免疫研究部 免疫病理研究室

清水 眞也

SHIMIZU Shinya

ブルータング(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し、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。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。血清診断法として、わが国では血清型別に関係なく簡便に実施できるゲル内沈降反応(AGID)が実施されている。

BTは、わが国において1994年に牛、めん羊で初めて発生し、その後終息し、2001年秋にめん羊で再度の発生が確認されたが、以降の発生は確認されていない。しかし、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から、わが国において同地域を中心にBTウイルスは不顕性感染の形で流行を繰り返していると考えられる。

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)ウイルスがわが国には存在している。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)。

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ことが知られている。わが国におけるBTのAGIDによる血清診断の際にも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調べた。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ELISA(c-ELISA)が推奨されている。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を用いることにより解消が可能か検討した。

(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例では(いずれもIBAウイルスに対する中和抗体価は、1:2以上、BTウイルス中和抗体価は1:2未満)、BTウイルスを用いたAGIDで陽性を示した例は17例(42.5%)であり、IBAウイルスを用いたAGIDで陽性は36例(90.0%)であった。また、



BTのc-ELISA陽性は1例(2.5%)であった(図1)

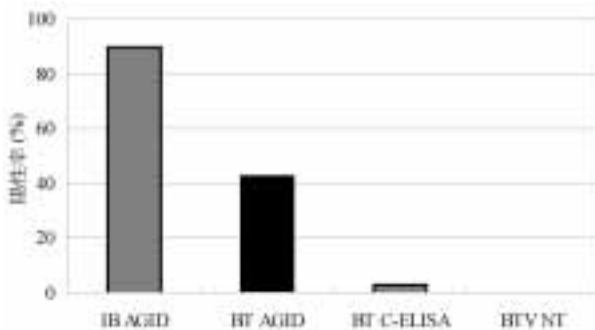


図1. イバラキウイルス(BTV)中和抗体陽性血清のIBVゲル内沈降反応、プルーテング(BTV)ゲル内沈降反応、BTV競合エリザ、BTV中和試験における陽性率

一方、IBAウイルス中和抗体価ごとに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)。

(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。

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、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)。

共通抗原に由来する類属反応をAGIDで区別する

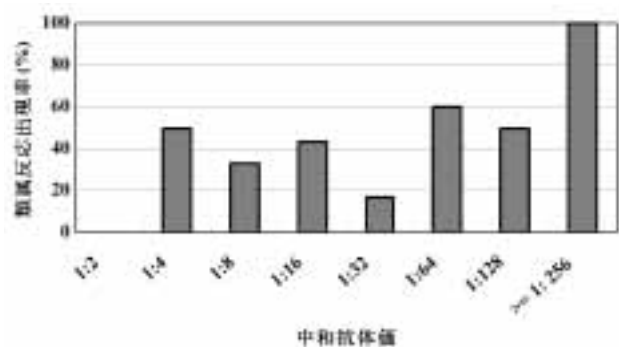


図2. イバラキ(BVA)ウイルス感染陽性牛血清を用いたIBAウイルスに対する中和抗体価でのプルーテングゲル内沈降反応における類属反応の出現率(%)

補足説明: 競合エリザ

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、

ブルータンク特異的競合ELISAによるイバラキウイルスゲル内沈降反応における類属反応の解消

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。

S.Shimizu et al (2005). Vet. Ital., 40 (4), 40 (4), 583-586

競合エライサについて



異性の高いモノクローナル抗体を介在させて、病原体などを検出する特異性の高いエライサの一法。通常のエライサでは動物種毎の酵素標識抗体を準備する必要があるが、本法では、酵素標識抗マウスIgG抗体を準備するだけでよい。

具体的には、検査血清を反応させ、同時に抗原特異的モノクローナル抗体を反応後、酵素標識抗マウスIgG抗体で抗原特異的モノクローナル抗体を検出し、判定する。陽性血清の場合、被検

感染血清のプレートング

血清中の抗原特異的抗体が抗原と反応し、モノクローナル抗体が抗原へ結合しないため、最終的に呈色反応が起きない（反応液に色が出ない）。陰性血清では、モノクローナル抗体が抗原に結合し、このモノクローナル抗体に酵素標識抗マウスイムノグロブリン抗体が結合し、酵素により基質液に呈色反応が起きる（反応液に色の変化が出る）。本法には特異性の高いモノクローナル抗体が必要である。なお、今回のBTの判定は次式により得た% inhibition（阻止率）により行う。

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

> 50% : 陽性
< 40% : 陰性
40 ~ 50% : 擬陽性

