

犬ジステンパー脳炎の診断における リファレンス抗体測定の有用性

相馬武久^{1)†} 植村隆司²⁾ 中本裕也^{2, 3)} 長谷生子²⁾ 小澤 剛²⁾

1) マルピー・ライフテック(株)臨床検査センター (〒563-0011 池田市伏尾町103)

2) KyotoAR (〒613-0036 久世郡久御山町田井新荒見208-4)

3) 日本動物高度医療センター (〒213-0032 川崎市高津区久地2-5-8)

(2011年8月22日受付・2011年11月7日受理)

要 約

犬ジステンパー脳炎 (CDE) を血清学的に診断する際の脳脊髄液への血液成分混入の指標 (リファレンス抗体) として犬パルボウイルス抗体と犬アデノウイルス抗体の測定の実用性を検討した。両抗体の血清中力価/脳脊髄液中力価 (S/C) 値の比は検討した30頭すべて測定誤差の許容範囲内 (2:1, 1:1又は1:2) であり、どちらの抗体を指標としても同様な成績が得られることが示された。CDEの診断基準である犬ジステンパーウイルス (CDV) 抗体のS/C値 < 256を示した神経症例29頭中1頭だけがCDV抗体のS/C値がリファレンス抗体のそれに比べて低く (1:8), CDEと診断されたが、残りの28頭の両抗体のS/C値の比は誤差範囲内で診断は成立しなかった。このことはCDEの診断に際しCDV抗体だけでは誤診を招く危険性があることを示すものである。

—キーワード: 犬アデノウイルス, 犬ジステンパーウイルス, 犬パルボウイルス, 脳炎, リファレンス抗体.

----- 日獣会誌 65, 216~220 (2012)

犬ジステンパーウイルス (CDV) は麻疹ウイルスや牛痘ウイルスとともにモルビリウイルス属に分類され、犬パルボウイルス (CPV) 感染症、犬伝染性肝炎、狂犬病とともに犬の主要なウイルス感染症の一つに位置付けられている。経口、経鼻的に侵入したCDVはリンパ組織への感染を経て全身の上皮細胞に伝播することで呼吸器や消化器の症状、硬蹠症などを発現する。さらに、神経組織への感染により中枢神経系 (CNS) の症状を呈することがあり、その一部ではCNSでのウイルスの感染が持続し、慢性脳炎や遅発性脳炎に至る [1]。このような持続感染例では脳内においてCDVに対する局所的な抗体応答が起きることから、脳脊髄液 (CSF) からのCDV抗体の検出は犬ジステンパー脳炎 (CDE) に対する有効なウイルス学的診断手段の一つである [2]。

生体は脳内の恒常性を保つために脳脊髄関門 (BBB) により血液中の蛋白質や薬物などの脳内への侵入が制限されている [3]。しかしながら、IgG抗体やアルブミンなど分子量16万未満の物質については血液から脳内への混入が比較的容易に起こり、その量は正常なBBBの

場合では最大で血清中の1/200又は1/256であるといわれている [4-6]。すなわち、CDVのCNSへの感染がない場合やワクチン接種後であっても若干量の血中CDV抗体がCSF中から検出されることがあるため、この値はCDEの診断のためにCSF中CDV抗体検査を実施する際の一つの指標とされている [5, 7]。しかしながら、CDV以外に起因する脳炎や事故などによるBBBの破綻やCSFの採材時に血液が過度に混入した場合にはCNSへのCDVの感染がなくてもこの割合を上回るCDV抗体がCSF中から検出されることがある [2]。

このような血液成分のCSF中への混入の程度を判定するために人における単純ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルスなどによる亜急性~慢性脳炎の診断にCSF中抗体検査を適応する場合、その指標としてポリオウイルス、コクサッキーウイルスなどのその他の人ウイルスに対する抗体、いわゆるリファレンス抗体を測定し、この抗体と目的のウイルスに対する抗体の血中力価/CSF中力価 (S/C) の値を比較することが有用であると報告されている [4, 8, 9]。同様に犬でのCDE

† 連絡責任者: 相馬武久 (マルピー・ライフテック(株)臨床検査センター)

〒563-0011 池田市伏尾町103 ☎072-753-0335 FAX 072-754-2208

E-mail: takehisa-soma@ds-pharma.co.jp

の診断についてもリファレンス抗体としてCPVや犬アデノウイルス (CAV) に対する抗体の有用性についてこれまでに論じられている [2]。これら2つのウイルスは通常、神経組織に感染しないことから、血液成分の混入の指標として有効と考えられる。しかしながら、筆者らの知りえるかぎりではこれまでに犬における成績は報告されていない。

そこで、われわれはCDEの診断のためのリファレンス抗体の有用性を知るために、臨床的に脳炎症状を呈している犬について血清及びCSF中のCDV抗体とその対照としてCPV及びCAV抗体を測定し、それぞれのS/C値を比較検討した。

材料及び方法

症例：2009年12月～2011年7月に慢性的な神経症状を呈して動物病院に来院した犬205頭を1.5～2.5%イソフルラン (マイラン製薬株, 大阪) での麻酔下で外側伏在静脈、又は大槽部からそれぞれ血液 (血清)、又はCSFを採取した。この205頭の年齢 (歳) の平均値と標準偏差は 7.43 ± 4.18 であった。なお、116頭についてはサンプル量不足によりCSF中のCAV抗体検査が実施できなかった。

CDV抗体検査：免疫ペルオキシダーゼブラック染色 (IP) 法 [10] で測定した。すなわち、96ウエル組織培養用プレートで培養されたVero細胞に市販混合ワクチン (Solvay Duphar, Weesp, Holland) から単離したCDV Onderstepoort株30PFU/ウエルを感染させた。なお、本ウイルス株を抗原としたIP法ではワクチンによる抗体だけでなく、CDV野外感染による抗体に対しても良好な反応を示すことが確認されている [10]。CDVを感染させたプレートにメチルセルロースを重層し40時間培養後、メタノールで固定処理したものを検査用プレートとした。このプレートに血清、CSFをそれぞれ10倍希釈、又は2.5倍希釈から2倍段階希釈したものを50 μ l/ウエル添加した。37 $^{\circ}$ C 1時間反応後、0.1% Tween20 加リン酸緩衝食塩液 (PBST) で洗浄し、1,000倍希釈ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ヤギ抗イヌIgG (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, U.S.A.) 50 μ l/ウエルを添加した。37 $^{\circ}$ C 1時間反応後、PBSTで洗浄、0.0025% o-dianisidine (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.) 加Tris-HCl緩衝液を100 μ l/ウエル添加した。37 $^{\circ}$ C 30分間反応後、ブラックの特異的な染色が観察できたウエルの最高の希釈倍数を抗体価とした。

CPV抗体検査：赤血球凝集抑制 (HI) 試験で測定した [11]。すなわち、カオリン及び豚赤血球吸収処理した血清、CSFを96ウエル硬質V字プレートにおいてpH6.4リン酸緩衝食塩液で血清、CSFをそれぞれ10倍

希釈、又は2.5倍希釈から2倍段階希釈したもの25 μ lに8単位のCPV OSK株 [12] を25 μ l/ウエル混入し、室温で1時間反応させた。その後0.5%豚赤血球液50 μ l/ウエルを分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させ、HI像が観察されたウエルの最高の希釈倍数を抗体価とした。

CAV抗体検査：中和試験で測定した。すなわち、96ウエル組織培養用プレートで血清、CSFをそれぞれ10倍希釈、又は2.5倍希釈から2倍段階希釈したもの50 μ lに市販混合ワクチン (Pfizer, New York, NY, U.S.A.) から単離したCAV 2型 Manhattan株 (100TCID₅₀/ウエル) を50 μ l/ウエル分注混和し、5%CO₂、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。次にMDCK細胞 (1.2 \times 10⁴cells/ウエル) を分注し、5日間培養後、細胞変性効果 (CPE) の抑制が観察されたウエルの最高の希釈倍数を抗体価とした。

S/C値の算出：本研究において算出によりS/C値を得るためには血清中とCSF中の抗体がともに検出される必要があり (抗体価それぞれ10倍以上、又は2.5倍以上)、両方もしくはどちらかが検出下限未満 (抗体価それぞれ10倍未満、又は2.5倍未満) の場合はS/C値を得ることができない。ただし、血清中抗体が検出され (抗体価10倍以上)、CSF中抗体が検出下限未満 (抗体価2.5倍未満) の場合はS/C値を‘以上’の表現で示すことができる。

(例)

血清中320倍、CSF中2.5倍の場合 → S/C = 128

血清中320倍、CSF中2.5倍未満の場合 → S/C \geq 256

成 績

リファレンス抗体 (CPV抗体とCAV抗体) のS/C値の比較：全205頭のうちCPV抗体とCAV抗体のS/C値がともに算出により得られた30頭について両抗体のS/C値を比較したところ、平均値と標準偏差 (Log) はそれぞれ1.917 (Log 82.6) \pm 0.478、又は1.977 (Log 94.8) \pm 0.485で、T検定により両者間に有意差は示されなかった ($P > 0.05$)。さらに、表1に示すように両S/C値の比は2:1、1:1又は1:2で、一般的に知られているマイクロタイター法の測定誤差の許容範囲 (± 2 倍) 内に分布していた。

リファレンス抗体適用可能症例の比率：前述したようにCSF中抗体が検出下限 (2.5倍) 未満の場合にはS/C値を得ることはできない。しかし、S/C値が正常範囲 (256以上) か否かだけを知るためには血清中抗体価が少なくとも320倍あればCSF中抗体価に関わらず判定が可能である。そこで全205頭のうちリファレンス抗体であるCPV抗体及びCAV抗体が320倍以上であった割合を検討したところ、それぞれ136頭 (66.3%) 及び

表1 神経症例におけるリファレンス抗体 (CPV 抗体と CAV 抗体) の S/C 値の比較

	CAV 抗体 S/C 値							
	8	16	32	64	128	256	512	1024
CPV 抗体 S/C 値	8	1						
	16	1						
	32	1	4	3				
	64		1	2	4			
	128			2	2	2		
	256				1	3		
	512						1	1
	1024							1

表内の数字は症例数を示す。

血清中、CSF 中の CPV 抗体及び CAV 抗体がともに検出され、算出により S/C 値が得られた 30 頭について検討した。

128 頭 (62.4%) が 320 倍以上を保有しており、両抗体の両方もしくは片方が 320 倍以上であったものは 165 頭 (80.5%) であった。

CDV 抗体とリファレンス抗体の比較：全 205 頭中 CSF 中から CDV 抗体が検出されたもの (抗体価 2.5 倍以上) は 81 頭 (39.5%) で、このうち CDV 抗体の S/C 値が正常範囲ではない、すなわち CDE の診断指標とされている 128 以下であったものは 29 頭 (全体の 14.1%) であった。この 29 頭について CDV 抗体とリファレンス抗体の S/C 値の比を検討した。なお、リファレンス抗体として CPV 抗体と CAV 抗体の両方の S/C 値が得られた場合は CPV 抗体の S/C 値を採用した。その結果、表 2 に示すように 28 頭は測定誤差の許容範囲内 (2 : 1, 1 : 1, 又は 1 : 2) で、残りの 1 頭において 1 : 8 (CDV 抗体 S/C 値 128, リファレンス抗体 S/C 値 1024) と、両 S/C 値の間に測定誤差の許容範囲を超える差が観察された。次に CDV 抗体の S/C 値が正常範囲 (256 以上) であった 52 頭について検討した。23 頭については CSF 中リファレンス抗体が 2.5 倍未満のため S/C 値が得られなかった。その結果、CDV とリファレンス抗体の両 S/C 値が得られた 29 頭の両抗体の S/C 値の比はすべて測定誤差の許容範囲内 (2 : 1, 1 : 1, 又は 1 : 2) に分布していた (表 2)。

考 察

血液成分の CSF への非特異的混入の程度を量るためにアルブミンがその指標の一つとして用いられているが [2, 13], CDE の診断のためにはアルブミン測定は正確性が乏しいことが論じられている [2]。すなわち、CDV 抗体検査の測定原理 (終末点法) がアルブミンのそれ (比色法) とは異なること、さらに血清中アルブミンの

表 2 神経症例における CDV 抗体とリファレンス抗体の S/C 値の比較

	CDV 抗体 S/C 値	リファレンス抗体 S/C 値							
		8	16	32	64	128	256	512	1024
正常範囲外 (CDE の診断基準)	8								
	16	1	1						
	32			4	1				
	64			2	6	1			
	128				1	9	2		1*
正常範囲	256					2	9	1	
	512						7	4	
	1024							3	3

表内の数字は症例数を示す。

*印は CDV 抗体 S/C 値がリファレンス抗体に比べて著しく低値 (1 : 8) を示した症例を示す。

血清中、CSF 中 CDV 抗体及びリファレンス抗体が検出され、算出により S/C 値が得られた 58 頭について検討した。

測定は化学反応であるブロムクレゾールグリーン法やブロムクレゾールパープル法が用いられているのに対して、CSF 中のアルブミンは微量測定となるため免疫学的方法の一つである免疫比濁法が一般的に用いられていることがその要因としてあげられる。また、抗体 (IgG) とアルブミンの分子量の違いが BBB の透過度合いに少なからず影響するともいわれている [14]。これに対して、今回リファレンス抗体として検討した CPV 抗体検査と CAV 抗体検査は CDV と同じ測定原理 (終末点法) であるとともに、同じ検査方法で血清中と CSF 中の抗体を同時に測定することが可能であることから、アルブミンに比べてより高い正確性をもつ指標として期待されている [2]。

なお、アルブミンはすべての生体の血清中に存在しているが、ウイルス抗体については必ずしも常に保有しているとは限らない。しかしながら、CPV と CAV は犬のコアクチンのフラクシオンであることから抗体保有率が他のウイルスに比べて高いことが推測される。本研究において CPV 抗体検査と CAV 抗体検査で S/C 値が少なくとも正常範囲 (256 以上) であるか否かを判別できる 320 倍以上の血清中抗体を保有している例の比率がそれぞれ 66.3%, 又は 62.4% で、さらに両抗体の両方又は片方が 320 倍以上であったものが 80.5% と高率に観察された事実はリファレンス抗体としての CPV 抗体と CAV 抗体の汎用性を示すものである。

また、感染初期やワクチン接種直後では IgM 抗体が血清中に存在している場合があるが、この抗体は高分子 (約 90 万) であるため正常な BBB は通過しない [6]。今回検討した CPV 抗体と CAV 抗体の検査系 (それぞれ HI 試験, 又は中和試験) ではともにイムノグロブリンのサブクラスを区別する方法ではないため、血清中に

CPVやCAVに対するIgM抗体が存在する場合はS/C値が高く測定されることが推測される。しかしながら、今回CPV抗体とCAV抗体のS/C値が比較できた30頭では両S/C値の間に有意差はなく、さらに両抗体のS/C値の比がすべて2:1, 1:1, 又は1:2の測定誤差の許容範囲に分布しており、IgM抗体の存在によりどちらかのS/C値が変動したと考えられる例は観察されなかった。おそらく、今回の205頭は平均で7.43歳と比較的高齢で、幼齢期と比べてCPVやCAVに対するIgM抗体が検出される可能性が極端に少ないことが予想される。このことは慢性脳炎症例においてCPVやCAVに対するIgM抗体が診断に影響する可能性が低いことを示すものであり、リファレンス抗体としてどちらの抗体を採用しても同様に安定した成績が得られるものと考えられる。ただし、ワクチン接種1カ月以内の例やCPVやCAVの感染を疑うような所見を示している例についてはこのIgM抗体の影響を考慮する必要性を感じるとともに、IgM抗体の影響をかぎりなく排除するために2つ以上のリファレンス抗体を指標にすることが望ましいと考えられた。

なお、本研究では正常犬との比較はできなかったが、CPV抗体とCAV抗体のS/C値が幾何平均値でそれぞれ82.6, 又は94.8と、正常範囲(256以上)から異常値側にシフトしたと考えられる分布を示した。今回供試した材料は神経症状を呈した犬から採取されたものであることから、多くの例で何らかの要因でBBBの破綻を起こし、血中からの混入量が増加していたことが予想される。

本研究で供試した205頭のうち81頭のCSF中からCDV抗体が検出され(抗体価2.5倍以上)、この中の29頭のCDV抗体のS/C値が正常範囲外、すなわちCDEの診断基準とされている128以下[5, 7]を示した。これらのうち1頭については測定誤差(±2倍)を考慮してもCDV抗体のS/C値がリファレンス抗体のそれと比較して低値と判断できるもので、CNSでの局所的なCDVに対する抗体産生が考えられた(CDV抗体S/C値128, リファレンス抗体S/C値1024)。しかしながら、残りの28頭についてはCDV抗体のS/C値とリファレンス抗体のそれとの間に診断に値する差が観察されず、CDEとの診断は成立しなかった。この中にはCDV感染によるCNSでの抗体産生がまだまだ不十分であるものが存在していたことも推測されるが、CDEの診断のためにCDV抗体だけを検査した場合には誤診に導かれる危険性があることが考えられた。

以上の成績からCDEの診断のためにCDV抗体検査を用いる場合にそのリファレンス抗体としてCPV抗体検査やCAV抗体検査を併用することでより正確な診断が可能となることが考えられた。なお、今回CDEと診

断できた例はわずか1頭であった。近年わが国のペット犬においてCDV感染の流行が沈静化していることがわれわれのCDV IgM抗体陽性率の調査で観察されており、今回の成績はこの現象を表しているものと思われる。このため、本研究では実際のCDE症例でどの程度のS/C値を示すかについて明らかにすることができなかった。本リファレンス抗体の有用性をより高めるために調査を継続するとともに、今回検討できなかったCDVのIgM抗体や遺伝子などCDV感染診断のための他の検査結果やCT, MRIなど画像所見、さらに正常犬との比較についても今後検討の余地があるものと考えられた。

引用文献

- [1] Greene CE : Canine distemper, Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat, Greene CE, ed, 386-405, WB Saunders Company, Philadelphia (1984)
- [2] Greene CE, Appel MJ : Canine distemper, Infectious diseases of the dog and cat, Greene CE, ed, 3rd ed, 25-41, WB Saunders Company, Philadelphia (2006)
- [3] Levin VA : Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability, J Med Chem, 23, 682-684 (1992)
- [4] Clarke JK, Dane DS, Dick GWA : Viral antibody in the cerebrospinal fluid and serum of multiple sclerosis patients, Brain, 88, 953-962 (1965)
- [5] Greene CE : Infection of the central nervous system, Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat, Greene CE, ed, 284-300, WB Saunders Company, Philadelphia (1984)
- [6] Tourtellotte W : On cerebrospinal fluid immunoglobulin-G (IgG) quotients in multiple sclerosis and other diseases, J Neuro Sci, 10, 279-304 (1970)
- [7] 枝村一弥 : 脳脊髄液検査の特殊検査とその解釈, infoVets, 12, 13-21 (2007)
- [8] Connolly JH : Subacute sclerosing panencephalitis, J Clin Pathol, 25, Suppl 6, 73-77 (1972)
- [9] Deibel R, Schryver GD : Viral antibody in the cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections, J Clin Microbiol, 3, 397-401 (1976)
- [10] Soma T, Ishii H, Yamamoto S, Yoshida T, Kinoshita T, Nomura K : Comparison of immunoperoxidase plaque staining and neutralizing tests for canine distemper virus, Vet Res Commun, 25, 311-325 (2001)
- [11] Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RVH : Hemagglutination by canine parvovirus : serologic studies and diagnostic applications, Am J Vet Res, 41, 784-791 (1980)
- [12] 相馬武久, 上林 護, 齋藤奈美子, 長田 博, 原 元信 : 犬パルボウイルス2型野株感染による抗体を保有する犬におけるOldタイプワクチン接種後の抗体価、環境と病気, 18, 13-19 (2009)
- [13] Bagley RS, Bohn AA : Interpreting the results of CSF

analysis in dogs and cats, *Vet Med*, 98, 499-506
(2003)

disease-related data patterns and evaluation programs, *J Neuro Sci*, 184, 101-122 (2001)

[14] Reiber H, Peter JB : Cerebrospinal fluid analysis :

Application of Reference Antibody Measurement for Diagnosis
of Canine Distemper Encephalitis

Takehisa SOMA^{*†}, Takashi UEMURA, Yuya NAKAMOTO, Takako HASE
and Tsuyoshi OZAWA

** Veterinary Diagnostic Laboratory, Marupi Lifetech Co., Ltd., 103 Fushiocho, Ikeda, Osaka, 563-0011, Japan*

SUMMARY

The usefulness of determining canine parvovirus (CPV) and canine adenovirus (CAV) antibody titers as parameters for the interfusion of blood components into cerebrospinal fluid (CSF) (reference antibodies) for the serological diagnosis of canine distemper encephalitis (CDE) was studied. The ratio of the "serum titer/CSF titer (S/C)" value for the CPV antibody to that for the CAV antibody was 2 : 1, 1 : 1, or 1 : 2 in 30 dogs examined, which was within an acceptable measurement error range, suggesting that similar results could be obtained with either of the two reference antibodies. In 29 dogs with neurologic signs, in which the S/C values for the canine distemper virus (CDV) antibody were lower than 256, a diagnostic criterion for CDE, only one showed an S/C value for CDV antibody lower than that for the reference antibody (1 : 8) and was diagnosed with CDE. The remaining 28 dogs showed ratios of an S/C value for the CDV antibody to that for the reference antibody within the measurement error range. Accordingly, these dogs were not diagnosed with CDE. On the basis of these findings, it was shown that examination of the CDV antibody alone increases the risk of misdiagnosis of CDE.

—Key words : Canine adenovirus, Canine distemper virus, Canine parvovirus, Encephalitis, Reference antibody.

† Correspondence to : Takehisa SOMA (*Veterinary Diagnostic Laboratory, Marupi Lifetech Co., Ltd.*)

103 Fushiocho, Ikeda, Osaka, 563-0011, Japan

TEL 072-753-0335 FAX 072-754-2208 E-mail : takehisa-soma@ds-pharma.co.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 216 ~ 220 (2012)