

アカバネ病診断におけるリアルタイム RT-PCR の応用

大谷研文^{1)†} 入部 忠¹⁾ 村田風夕子¹⁾ 梁瀬 徹²⁾
 白藤浩明²⁾ 山川 睦³⁾

- 1) 山口県中部家畜保健衛生所 (〒754-0897 山口市嘉川671-5)
 2) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所温暖地疾病研究領域 (〒891-0105 鹿児島市中山町2702)
 3) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2012年8月6日受付・2013年3月11日受理)

要 約

アカバネ病の診断では、体形異常を示す子牛や神経症状を示す牛からのウイルス分離、ウイルス遺伝子及び抗原の検出が困難なことが多い。2011年9月から2012年1月に山口県において本病が10例発生し、これら野外材料を用いてリアルタイム RT-PCR (rRT-PCR) の有用性を検討した。その結果、神経症状発症牛や死産胎子の脳幹部、脊髄及び小脳からアカバネウイルス (AKAV) 遺伝子を検出することが可能であった。AKAV 遺伝子検出結果と病理検査結果を比較したところ、遺伝子量と非化膿性脳脊髄炎の程度及び免疫組織化学的染色の強度、非化膿性脳脊髄炎の程度と免疫組織化学的染色の強度間に正の相関がみられた。中枢神経系を材料とした rRT-PCR は、従来の検査法より感度が高く、よりの確なアカバネ病の診断に有用であることが示唆された。

——キーワード：アカバネ病，非化膿性脳脊髄炎，リアルタイム RT-PCR.

----- 日獣会誌 66, 398～402 (2013)

2011年，中四国地方を中心にアカバネウイルス (AKAV) の生後感染による牛の脳脊髄炎が多発した。山口県内においても同年9月からアカバネ病の発生が10例報告され，生後感染例だけでなく，翌2012年にかけて体形異常を伴う死産例も1例確認された。今回，神経症状発症牛からウイルス遺伝子及び抗原が検出され，1例からウイルス分離に成功したが，アカバネ病の症例はウイルス感染後時間が経過してから発見される場合が多く，病原検出による確定診断が困難なことも少なくない。したがって，これまでより高感度・高精度なウイルス検出系の導入が求められている。そこで，山口県の症例から得られた材料を用い，非化膿性脳脊髄炎の程度及び免疫組織化学的染色 (IHC) の強度を数値化するとともに，リアルタイム RT-PCR (rRT-PCR) による AKAV 遺伝子の定量を実施した。これらのデータを基に，病理検査結果と遺伝子検出結果との間の相関性を調べ，アカバネ病診断における rRT-PCR の有用性を明ら

かにしたので報告する。

材料及び方法

症例：起立不能，ナックリング，知覚過敏，旋回運動等の神経症状を示した3～17カ月齢の牛9例（黒毛和種6，交雑種1，ホルスタイン種2例）及びホルスタイン種に発生した体形異常を伴う死産1例について検査を実施した。いずれの症例もアカバネ病ワクチン未接種であった。

RT-PCR による野外材料からの AKAV 遺伝子の検出：症例の中枢神経系 (CNS) 乳剤から市販キット (High Pure Viral RNA Kit, ロシュ・ダイアグノスティックス株, 東京) により核酸を抽出後，シンプ血清群ウイルス (SIMV) 共通プライマー [1]，AKAV 特異的プライマー (AKAVM-F : 5'-AAGCAAGAGGAATGCA GCTCTACA-3' 及び AKAVM-R : 5'-CTGTTTTG AGGAGTCGAATAGACC-3')，アイノウイルス

† 連絡責任者：大谷研文 (山口県中部家畜保健衛生所)

〒754-0897 山口市嘉川671-5 ☎083-989-2517 FAX 083-989-2518

E-mail : ohtani.akifumi@pref.yamaguchi.lg.jp

表 発症牛の CNS 各組織における病変の強度と AKAV 遺伝子量

感染時期	No.	HE染色				IHC				AKAV遺伝子量 (log10)			
		大脳	小脳	脳幹部	脊髄	大脳	小脳	脳幹部	脊髄	大脳	小脳	脳幹部	脊髄
生後感染	1	1*	1	3		0**	0	2		-1.917	-0.833	-0.693	
	2	0.5	0.5	2	3	0	0	0.5	1	-4.666	-4.536	-1.780	-1.780
	3	1	2	3		0	1	3		-1.975	-0.928	-0.002	
	4	0	1	2	2	0	0	0	0	-4.967	-4.133	-2.714	-2.527
	5	2	3	4		0	0	2		-2.511	-2.336	-1.121	
	6	1	1	3	2	0	0	1	0	-2.668	-1.228	-2.492	-1.433
	7	0	0.5	1	1	0	0	0	0	-4.429	-4.439	-4.860	-4.706
	8	1	1	3	1	0	0	0	0	-3.799	-3.812	-2.407	-4.432
	9	0	0.5	2		0	0	1		-4.173	-1.664	-0.900	
	平均	0.72	1.17	2.56	1.80	0.00	0.11	1.06	0.20	-3.456	-2.657	-1.885	-2.975
胎子感染	10	0	0	0.5	0	0	0	0	0	-	-6.063	-5.527	-5.253

* 病変の程度

きわめて重度 (4) : きわめて重度の囲管性細胞浸潤, び漫性のグリア結節, 神経細胞の変性・壊死及び神経食現象

重 度 (3) : 重度の囲管性細胞浸潤, 多発性のグリア結節, 神経細胞の変性・壊死及び神経食現象

中 等 度 (2) : 中等度の囲管性細胞浸潤, 散発性のグリア結節

軽 度 (1) : 軽度の囲管性細胞浸潤, 散発性のグリア結節

ごく軽度 (0.5) : 軽度の囲管性細胞浸潤

著変なし (0)

** IHCの強度

高 度 (3) : 陽性神経細胞割合40%<

中 等 度 (2) : 〃 10~40%

低 度 (1) : 〃 5~10%

ごく低度 (0.5) : 〃 0~5%

未 検 出 (0)

空欄: 採材なし

(AINOV) 特異的プライマー (AINOVM-F: 5'-TGCT ATAGCCCCTTCATACATTGG-3'及び AINOVM-R: 5'-TGGCATGTTTGCAGTGGTTACAGT-3'), ピートンウイルス (PEAV) 特異的プライマー (PEAVM-F: 5'-CCTTCCATACGCCATTTAGGTGA-3'及び PEAVM-R: 5'-TGCTCATCACATTCAGATGA-3') と市販キット (OneStep RT-PCR Kit, ㈱キアゲン, 東京) を用いて Kono ら [1] の方法に従って RT-PCR を実施した。

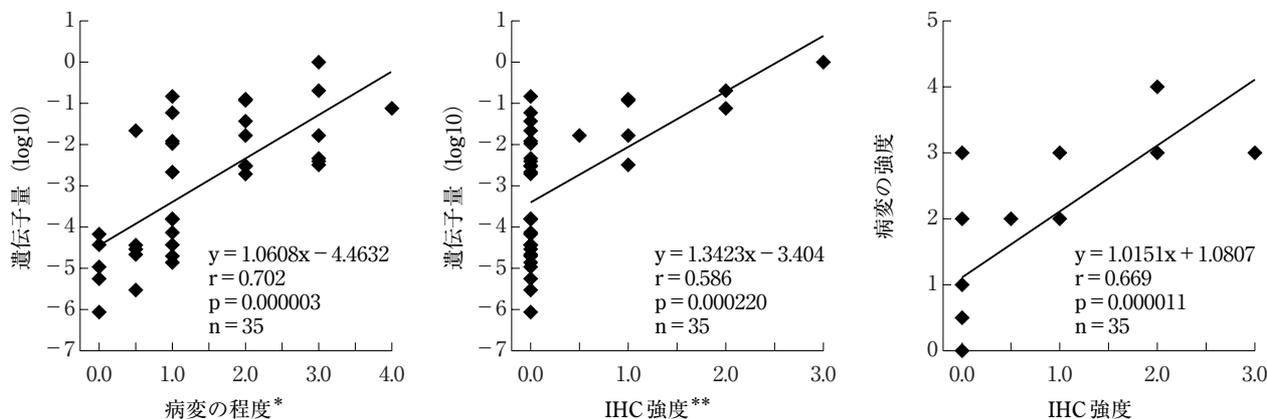
分離ウイルスの遺伝子及び抗原解析: 神経症状発症牛及び死産胎子より採取した CNS をウイルス分離に供した。CNS の 10% (W/V) 乳剤の上清をハムスター肺由来株化細胞に接種し, 細胞変性効果をウイルス分離の指標とし, 3代まで継代した。分離ウイルスより抽出した核酸を用い, Kobayashi ら [2] の方法によって SIMV 共通抗原 (ヌクレオカプシドタンパク質) をコードする S RNA 分節 (699 塩基) と中和抗原 Gc をコードする M RNA 分節 (4203 塩基) の全長の塩基配列を決定した。さらに, それぞれの遺伝子のタンパク質コード領域について相同性解析及び分子系統樹解析を既報 [2, 3] に従って行った。

一方, 分離ウイルスの抗原性状を調べるため, SIMV 共通抗原である N タンパク質を認識するモノクローナル

抗体, AKAV 中和抗原である Gc タンパク質上の 7 つの中和エピトープを認識するモノクローナル抗体を用い, ドットプロット法を Yoshida ら [4] の方法で実施した。

病理組織学的検査及び IHC: 神経症状発症牛と死産胎子を病理解剖後, 主要臓器及び CNS について常法に従いヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による組織学的検査を行った。非化膿性脳脊髄炎の程度について, 囲管性細胞浸潤 (浸潤細胞層の厚さ, 病変形成小血管の割合), グリア結節 (結節の大きさ, 分布), 神経細胞の変性・壊死及び神経食現象の有無を基に, きわめて重度 (4), 重度 (3), 中等度 (2), 軽度 (1), ごく軽度 (0.5) 及び著変なし (0) で数値化した。また, 抗 AKAV 家兎免疫血清を用いて, CNS の IHC を行い, 染色強度について神経細胞中の陽性細胞割合を基に高度 (3), 中等度 (2), 低度 (1), ごく低度 (0.5) 及び未検出 (0) で数値化した。

rRT-PCR による AKAV 遺伝子の検出と遺伝子量及び病変・IHC 強度との比較: CNS から抽出した核酸を rRT-PCR に供試し, AKAV S RNA 分節 (104 塩基) の増幅を行った。cDNA 合成は市販キット (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, ライフテクノロジー ジャパン ㈱, 東京) を用いて, 25℃ 10 分, 37℃ 30 分の逆転写反応により行った。PCR は Applied



*** 病変の程度**

- きわめて重度 (4) : きわめて重度の囲管性細胞浸潤, び漫性のグリア結節, 神経細胞の変性・壊死及び神経食現象
- 重 度 (3) : 重度の囲管性細胞浸潤, 多発性のグリア結節, 神経細胞の変性・壊死及び神経食現象
- 中 等 度 (2) : 中等度の囲管性細胞浸潤, 散発性のグリア結節
- 軽 度 (1) : 軽度の囲管性細胞浸潤, 散発性のグリア結節
- ごく軽度 (0.5) : 軽度の囲管性細胞浸潤
- 著変なし (0)

**** IHCの強度**

- 高 度 (3) : 陽性神経細胞割合40%<
- 中 等 度 (2) : 〃 10~40%
- 低 度 (1) : 〃 5~10%
- ごく低度 (0.5) : 〃 0~5%
- 未 検 出 (0)

図 遺伝子量と病変の程度, 遺伝子量と IHC 強度, 病変の程度と IHC 強度における相関

Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムを使用し, 矢崎ら (平成 19 年度大分県家畜保健衛生並びに畜産関係業績発表会集録) のプライマー Forward (5'-TCAACCAGAAGAAGGCCAAGAT-3'), Reverse (5'-GGGAAAATGTTATTAACCACTGTAAA-3'), プローブ (FAM 5'-GTTGTGGCGTCTTA-3'-NFQ-MGB) 及び市販試薬 (TaqMan Universal PCR Master Mix, ライフテクノロジーズジャパン株, 東京) を用いて, 95℃ 10 分, 次いで 95℃ 15 秒, 60℃ 1 分を 1 サイクルとした反応を 50 サイクル繰り返した。各部位の遺伝子量は, 陽性コントロールの遺伝子量を 1 とした時の相対的遺伝子量として算出し, 陽性コントロールには AKAV JaGAr39 株 (10^{6.6} TCID₅₀/ml) を用いた。さらに, 各部位の AKAV 遺伝子量, 病変の程度及び IHC 強度についてそれぞれの相関関係を調べた。相関係数はピアソンの相関係数の検定により求め, 回帰分析を実施した。

成 績

RT-PCR による AKAV 遺伝子の検出と分離ウイルスの性状: RT-PCR により, 死産胎子以外の症例 (神経症状発症牛) 全頭の CNS から AKAV 遺伝子が検出された。一方, AINOV 及び PEAV 遺伝子は検出されなかった。AKAV 陽性 9 症例のうち 1 例 (No. 3) の大脳と小

脳乳剤から円形化を特徴とする CPE を示すウイルスが 2 株 (YG-1/Br/11 株及び YG-1/Ce/11 株) 分離された。これら 2 株の S 及び M RNA 分節の塩基配列 (タンパク質コード領域) はそれぞれ完全に一致し, 既報 [2, 3] の分類による genogroup I に属することが判明した。また, これらは分子系統樹解析の結果, 2006 年に九州 [1], 2007 年に山口県 [5] で脳脊髄炎発症牛から分離された株に遺伝学的に最も近縁であった (データ未掲載)。さらに, 神経症状発症牛全例の CNS から検出された S RNA 分節の PCR 産物 (369 塩基) の塩基配列は完全に一致した。一方, 分離株 2 株はドットプロット法によって genogroup I の代表株である Iriki 株 [6] とほぼ同じ抗原性状を有することが判明した (データ未掲載)。

病理組織学的特徴及び IHC によるウイルス抗原検出: 神経症状発症牛 9 例ともに非化膿性脳脊髄炎が確認された。その病変の程度は, 大脳で平均 0.72, 小脳 1.17, 脳幹部 2.56, 脊髄 1.80 となり, 脳幹部において最も重度であった (表)。大脳では病変が最も軽度で, 炎症像が確認されない症例もあった。旋回・突進運動等の異常行動を呈した症例 No. 5 では, 脳幹部, 小脳, 大脳のいずれにおいても重度の病変が確認された。IHC によって, 9 例中 6 例において脳幹部神経細胞質内に AKAV 抗原が検出された。死産胎子においては軽度の非化膿性中

脳炎，脊髄腹角神経細胞の減数，矮小筋症が確認されたが，AKAV抗原は検出されなかった。

rRT-PCRによるAKAV遺伝子検出とCNS各部位の遺伝子量：生後感染例では，通常のRT-PCRと同様にrRT-PCRにおいても9例すべてでAKAV遺伝子を検出できた。死産胎子では，上記のように通常のRT-PCRやIHCによりAKAVの関与を証明できなかったが，rRT-PCRでウイルス遺伝子を検出することが可能であった。

rRT-PCRで検出された生後感染牛のCNSにおけるAKAV遺伝子量の幾何平均値（GM値）を部位別に比較すると，遺伝子量は脳幹部で最も多く，小脳・脊髄，大脳の順に少なくなった（表）。死産胎子ではAKAV遺伝子量は脊髄で最も多く，脳幹部，小脳の順に少なくなり，大脳からは検出されなかった。また，死産胎子のCNS各部位から検出された遺伝子量は，生後感染例に比べ少なかった（表）。

AKAV遺伝子量と病変及びIHC強度との相関性：遺伝子量，病変の程度及びIHCの強度の各項目について相関性を調べたところ，遺伝子量と病変の程度，遺伝子量とIHCの強度，及び病変の程度とIHCの強度の間に有意な正の相関が認められた（図）。

考 察

AKAVの生後感染による脳脊髄炎の多発例は少ないため，ウイルス側の要因についてはいまだ十分な情報が蓄積されていない。2011年の発生時に山口県で神経症状を呈した育成牛の大脳及び小脳から分離されたAKAVは，遺伝学的にgenogroup Iに属し，1984年，2006年及び2007年に脳脊髄炎発症牛から分離された株 [1, 5, 6] と抗原性もほぼ同一であることが明らかとなった。これにより，genogroup Iの株が生後感染による牛脳脊髄炎の発生に大きく関与していることが示された。

生後感染による脳脊髄炎が発生したことを機にアカバネ病診断の高度化を図るべく，今回得られた野外材料を用いてrRT-PCRの有用性を検証した。矢崎らのrRT-PCR用プライマーは，genogroupに関係なくAKAVを検出できるよう設計されており，このことは今回の分離株の遺伝子解析でも確認された。IHCで陰性の神経症状発症牛検体やRT-PCR陰性の体形異常を伴う死産胎子からも遺伝子が検出可能であったことから，rRT-PCR

は検出感度に優れることが示された。特にウイルス分離が困難で，初乳未摂取子牛の血清中から抗体を検出する以外に診断法がない体形異常子牛からAKAV遺伝子を検出できたことの意義は大きい。また，rRT-PCRはIHCやRT-PCRに比べて短時間で結果判定が可能であることから，迅速性においても本法は有用と考えられた。

Konoら [1] は，IHCの強度は炎症反応の程度に比例する傾向があると定性的な関係について報告しているが，今回病変の程度及びIHC強度を数値化することにより，統計学的に相関が確認された。また，rRT-PCRを用いた遺伝子定量を組み合わせることにより，遺伝子量と病変の程度，IHCの強度との相関についても確認された。

以上のように，rRT-PCRの活用によって得られた今回の成績は，アカバネ病の診断精度の向上に貢献できると思われる。

引 用 文 献

- [1] Kono R, Hirata M, Kaji M, Goto Y, Ikeda S, Yanase T, Kato T, Tanaka S, Tsutsui T, Imada T, Yamakawa M : Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan, *BMC Vet Res*, 4, 20 (2008)
- [2] Kobayashi T, Yanase T, Yamakawa M, Kato T, Yoshida K, Tsuda T : Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates, *Virus Res*, 130, 162-171 (2007)
- [3] Yamakawa M, Yanase T, Kato T, Tsuda T : Chronological and geographical variations in the small RNA segment of the teratogenic Akabane virus, *Virus Res*, 121, 84-92 (2006)
- [4] Yoshida K, Tsuda T : Rapid detection of antigenic diversity of Akabane virus isolates by dot immunobinding assay using neutralizing monoclonal antibodies, *Clin Diagn Lab Immunol*, 5, 192-198 (1998)
- [5] 中谷英嗣, 真鍋幸穂, 大谷研文, 田中省吾, 山川 睦 : 生後感染アカバネ病を発症した8カ月齢子牛における神経組織の病理学および免疫組織化学的検討, *日獣会誌*, 63, 781-784 (2010)
- [6] Miyazato S, Miura Y, Hase M, Kubo M, Goto Y, Kono Y : Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate, a new strain belonging to Akabane virus, *Jpn J Vet Med Sci*, 51, 128-136 (1989)

Application of Real-Time RT-PCR for Diagnosis of Akabane Disease

Akifumi OTANI^{1)†}, Tadashi IRIBE¹⁾, Fuyuko MURATA¹⁾, Tohru YANASE²⁾,
Hiroaki SHIRAFUJI²⁾ and Makoto YAMAKAWA³⁾

- 1) *Yamaguchi Chubu Livestock Hygiene Service Center, 671-5 kagawa, yamaguchi, 754-0897, Japan*
- 2) *Subtropical Disease Research Division, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 2702 chuzan-cho, kagoshima, 891-0105, Japan*
- 3) *Viral Disease and Epidemiology Research Division, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 kannondai, tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

It is generally difficult to isolate Akabane virus (AKAV) and detect its gene and antigen from abnormal calves and cattle with neurological symptoms. Using ten clinical samples of Akabane disease obtained in Yamaguchi Prefecture from September 2011 to January 2012, the usefulness of real-time RT-PCR (rRT-PCR) in diagnosis of the disease was examined. AKAV genes were mainly detected from the brain stem, spinal cord and cerebellum of nine cattle with neurological symptoms and an abnormal calf by rRT-PCR. Positive correlations were found between the AKAV gene quantity detected in the central nervous system and the severity of the inflammatory reaction, between AKAV gene quantity and intensity of positive immunoreactivity, and between severity of inflammatory reaction and intensity of positive immunoreactivity. It was suggested that rRT-PCR is useful for more sensitive and accurate diagnosis of Akabane disease.

— Key words : akabane disease, nonsuppurative encephalomyelitis, real-time RT-PCR.

† Correspondence to : Akifumi OTANI (*Yamaguchi Chubu Livestock Hygiene Service Center*)

671-5 kagawa, yamaguchi, 754-0897, Japan

TEL 083-989-2517 FAX 083-989-2518 E-mail : ohtani.akifumi@pref.yamaguchi.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 398 ~ 402 (2013)