

山羊関節炎・脳脊髄炎の調査及び診断法の確立

小西美佐子¹⁾, 播谷 亮²⁾, 木村久美子²⁾, 坪井孝益³⁾, 泉對 博⁴⁾, 村上賢二^{1)*}

(平成18年5月9日 受付)

Epidemiological survey and pathological studies on Caprine arthritis-encephalitis (CAE) in Japan

Misako KONISHI¹⁾, Makoto HARITANI²⁾, Kumiko KIMURA²⁾, Takamitsu TSUBOI³⁾,
Hiroshi SENTSU⁴⁾ & Kenji MURAKAMI^{1)*}

山羊関節炎・脳脊髄炎 (CAE) は、2002年8月に日本国内で初めてその存在が明らかとなった。本疾病の国内浸潤状況を調べるため、診断方法の確立を試みた。その結果、ゲル内沈降 (AGID) 法による抗体検査、PCR法によるウイルス遺伝子検査、シンシチウムアッセイ及び間接蛍光抗体法 (IFA) によるウイルス抗原検出が可能となった。AGID法を用いて全国から任意抽出された山羊血清について抗体調査を行った結果、3,255頭中714頭 (21.9%) が抗体陽性であった。また、日本在来種であるシバヤギにおけるCAEの特征的病変を調べるため、病理学的検査を行った。その結果、四肢関節では手根関節 (68.2%)、足根関節 (50.0%)、中手指節間関節 (50.0%) の順で非化膿性炎症像が多く見られた。また、非化膿性乳腺炎 (80.0%) 及び間質性肺炎 (17.9%) が高頻度で認められた。他品種の山羊において、CAEVがこれらの組織の上皮細胞に感染し、同様な病変を引き起こす事や、感染山羊が乳汁中に感染能を有するウイルスを排出する事が知られており、本研究の知見からシバヤギにおいても乳汁感染及び飛沫感染がCAEVの重要な伝播経路となる可能性が示唆された。

背景

山羊関節炎・脳脊髄炎 (Caprine arthritis-encephalitis, CAE) は、レトロウイルス科レンチウイルス属に属するCAEウイルス (CAEV) によって引き起こされる山羊の進行性消耗性疾患である。主な症状は成獣における慢性持続性関節炎及び乳房炎、幼獣における急性進行性脳炎

及び脊髄炎が挙げられる。また、稀に成獣に肺炎及び脳炎がみられることもある。発症率は成獣で10~20%であるが、世界中で広く発生が見られ、山羊で最も重要視されている疾病の一つである。日本は長年CAE発生報告が無く、清浄国と考えられてきたが、2002年に初めてその発症例が確認された。CAEVに感染した山羊は終生ウイルスを保持するが、その多くが症状を示さないため臨床症状を指標として摘発淘汰することは困難である。そのため、日本におけるCAEの浸潤状況や伝播様式を調べ、さらには海外から輸入される山羊の正確な検疫に資する診断法の開発が急務であった。本研究では、CAEの国内浸潤状況の把握及びCAEの早期撲滅を目的として本疾病の血清学的・病原学的診断法の確立を試みた。さらに本診断法を用いて陽性を示した個体についてCAEの病理学的特徴を明らかにした。

- 1) 動物衛生研究所感染症研究部 (現ウイルス病研究チーム)
- 2) 動物衛生研究所感染症研究部 (最近・寄生虫病研究チーム)
- 3) 動物衛生研究所感染症研究部 (現環境・常在疾病研究チーム東北支所)
- 4) 日本大学獣医学部

* Corresponding author; Mailing address: Research Team for Viral Diseases, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856 Japan
Tel: +81-298-38-7841. Fax: +81-298-38-7844
E-mail: muraken@affrc.go.jp

試験研究方法

1. 発症山羊からのウイルス分離

臨床症状及び病理学的所見によりCAEVが疑われた個体から, 末梢血, 関節液及び関節包膜及び肺を始めとする諸臓器を採材した。末梢血からは塩化アンモニウムを用いた溶血法により白血球を分離し, 1×10^7 cell/mlに調整した後, 羊胎児肺細胞 (Fetal lamb lung cell, FLL細胞) に接種した。関節液は遠心分離により細胞成分を沈殿させた後, 上清をFLL細胞に接種した。諸臓器はEagle's MEM培地で10%乳剤を作製し, 遠心分離後上清をFLL細胞に接種した。各細胞を3代継代し, 後述の検査方法を用いてウイルスの同定を行った (図1)。また, 感染細胞をグルタルアルデヒド固定後, 常法に従い樹脂包埋し, 超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察した。

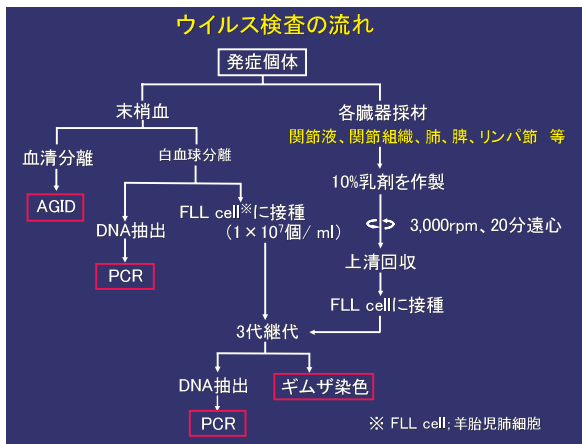


図1 ウイルス検査の流れ図

2. 診断方法の確立

(1) 寒天ゲル内沈降 (AGID) 法用抗原の作製

国際獣疫事務局 (OIE) の家畜疾病診断マニュアルに従い, CAEVに近縁かつ抗原共通性の高い羊のMaedi virus (MV) 及びVisna virus (VV) をそれぞれFLL細胞に接種し, その培養上清を硫酸沈殿法により濃縮・精製後, 透析・濃縮して各ウイルスの膜タンパク抗原を作製した。この抗原を用いたAGID法により山羊血清の抗体検査を行った。

(2) PCR法

抗体陽性山羊の末梢血より白血球を分離し, DNAを抽出した。このDNAを鋳型にしてCAEVのgag領域に特異的な既知のプライマーを用いてnested PCRを行った (表1-1, 2)。更に, PCR産物の塩基配列をダイレクトシーケンシング法により確認した。なお, CAEV国内分離株を感染させたFLL細胞からDNAを抽出し, 陽性対照として用いた。

(3) 間接蛍光抗体法 (IFA) 及びシンシチウムアッセイ

CAEV発症山羊の関節液をFLL細胞に接種し, 3代継代した後アセトン固定し, CAEV抗体陽性山羊血清を一次抗体, FITC標識ウサギ抗ヤギIgG抗体を二次抗体としてIFAを行い, 蛍光顕微鏡にて観察した。また, 同細胞をメタノール固定後ギムザ染色して, シンシチウムの有無を確認した。

表1-1 PCR用プライマーの塩基配列

プライマー	5' 3'塩基配列	場所
first PCR		
Forward	CAAGACGCAGGAGGGAGAAGCTG	953-975
Reverse	TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC	1249-1226
second PCR		
Forward	GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG	997-1024
Reverse	ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCC	1181-1154

表1-2 PCRの反応条件

反応	温度	時間	サイクル数
熱変性	94	5分	1サイクル
熱変性	94	30秒	
アニーリング	55	30秒	34サイクル
伸長反応	72	90秒	
伸長反応	72	5分	1サイクル

3. 分離ウイルスの感染実験

CAEV国内分離株をFLL細胞に接種し、この感染細胞懸濁液(1×10⁵cell/ml)3mlを抗CAEV抗体陰性のシバヤギ3頭に静脈内接種した。各個体の血清及び末梢血を接種後1ヶ月間は1~3日毎、接種後1~5ヶ月間は7日毎に、それ以降は1ヶ月毎に採材し、AGID法による抗体検査及びPCRによる末梢血白血球中のウイルス遺伝子検出を行った。

4. CAEVの国内浸潤状況調査

2002年8月~2005年3月までに各県の家畜保健衛生所の協力により任意抽出された山羊血清3,255検体について、前述の通り作製したMV抗原を用いたAGID法による抗体検査を実施した。また、2002年8月~2004年11月までに研究材料として任意抽出された山羊720検体の末梢血白血球からDNAを抽出してPCR検査に供した。

5. CAEV感染シバヤギにおける病理学的検査

(1) 関節病変

CAEの主徴である関節病変の病理学的特徴とその分布を明らかにするために、CAEV抗体陽性かつ関節の腫脹を呈するシバヤギ23頭の四肢関節について病理解剖検査の後、矢状断、脱灰処理し、ホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、組織学的検査に供した。

(2) 関節以外の臓器における病変

関節以外の各臓器におけるCAE病変の分布を明らかにするために、抗体陽性個体及びこれらと閉鎖環境下で集団飼育されていたシバヤギ、雌28頭から主要臓器及び泌乳生殖器を、雄11頭からは生殖器のみを採材し、病理組織学的検査に供した。

試験研究成績の概要

1. ウイルス学・血清学的検査法及びCAEV国内浸潤調査

(1) ウイルス分離及びAGID法

発症個体の関節液を接種したFLL細胞において、CAEVの属するレトロウイルスに特徴的な多核巨細胞が観察された(図2A)。また、それらの細胞質は抗CAEV抗体に反応し特異蛍光を示した(図2B)。更に、透過型電子顕微鏡観察により、C型レトロウイルスと考えられるウイルス粒子の出芽像が見られた(図3)。発症山羊の血清を用いてAGID法による抗体検査を実施したところ、抗体陽性を示す明瞭な沈降線が認められた(図4)。

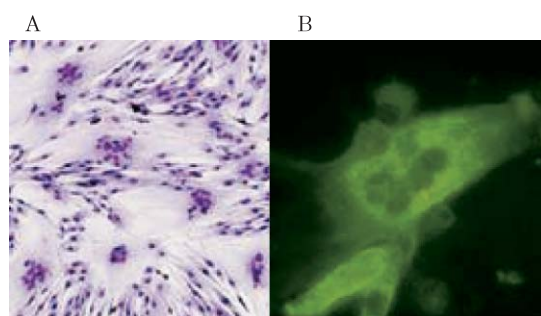


図2 羊胎児肺(FLL)細胞を用いて分離されたウイルスの同定

- (A) 分離ウイルス感染細胞は多核巨細胞を形成した。
- (B) 間接蛍光抗体法(IFA)により感染細胞の細胞質にCAEVが確認された。

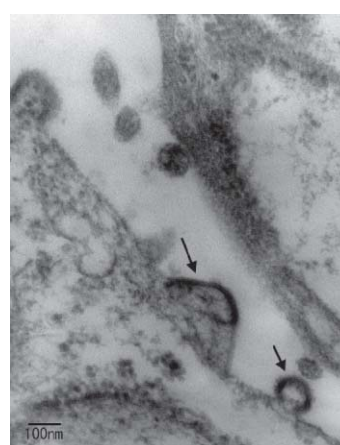


図3 CAEV国内分離株

感染羊胎児肺(FLL)細胞の電子顕微鏡写真。C型レトロウイルスと考えられるウイルス粒子(矢印)が細胞膜に出芽している。Bar=100nm。



PS:陽性指示血清
AG:抗原
1~3:被検血清
(順に強陽性、弱陽性、陰性を示す)

図4 AGID結果

(2) PCR法及び塩基配列の解析

抗体陽性山羊の末梢白血球DNAを用いたnested PCRにより、予測されたサイズ(first PCRで296bp, second PCRで184bp)のバンドが検出された(図5)。second PCRで得られた塩基配列は、既報のCAEV及びMVの塩基配列とそれぞれ95.1%, 83.6%の相同性を有した。ウイルス感染細胞由来のDNAを用いたPCRにおいても同サイズのバンドが検出された。

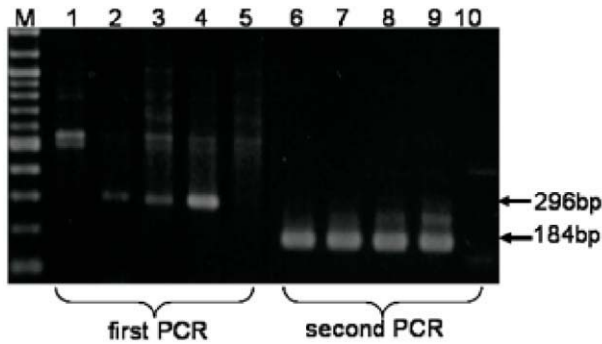


図5 PCR結果の一例

- M: 分子量マーカー
 1,6: 初発例白血球 (WBC)
 2,7: 初発例WBC 接種羊胎児肺 (FLL) 細胞
 3,8: Maedi virus 接種FLL細胞
 4,9: Visna virus 接種FLL細胞
 5,10: 陰性対照FLL 細胞

(3) 分離ウイルスの感染実験

CAEV国内分離株を接種した3頭のうち, 最も早いものは接種7日後にPCR法が陽性となり, 17日後にAGID法が陽性となった。しかし, 最初の陽転後も, 全頭が両検査で陰転と陽転を繰り返すという結果が得られた。接種後2年間, CAEVによると考えられる臨床症状は見られていない。

(4) CAEVの国内浸潤状況

山羊血清3,255検体の抗体保有状況を調査した結果, 714検体 (21.9%) が抗体陽性であった。また, PCRの結果, 720頭中298頭 (41.4%) が陽性を示した。PCRに供した720頭についてのAGIDとPCRの結果を表2に示した。

2. CAEV感染シバヤギにおける病理学的検査

(1) 関節病変

CAEV抗体陽性かつ関節の腫脹を呈するシバヤギ23頭の四肢関節について病理学的検査を実施したところ, 関節腫脹部の皮下で囊水腫の形成, フィブリンまたはゼラ

表2 国内における山羊関節炎・脳脊髄炎ウイルスに対する抗体およびウイルス遺伝子の保有状況

PCR ¹⁾	AGID ²⁾	
	+	-
+	90 ³⁾	208
-	56	366

- 1) PCRによるCAEV遺伝子検査, +; 陽性 -; 陰性
 2) 寒天ゲル内沈降試験, +; 陽性 -; 陰性
 3) 数字は個体数を示す。

チン様の集塊を含む液体の貯留が見られた (図6A)。組織学的検査の結果, 同病変部に非化膿性関節滑膜炎および関節周囲炎がみられ, 関節滑膜におけるリンパ球及び形質細胞の高度浸潤および絨毛状増生が観察された (図6B)。これらの関節炎ないし関節周囲炎は, シバヤギでは手根関節 (68.2%), 足根関節 (50.0%), 肩関節 (46.2%) 及び肘関節 (42.9%) の順に高頻度に見られた (図7)。

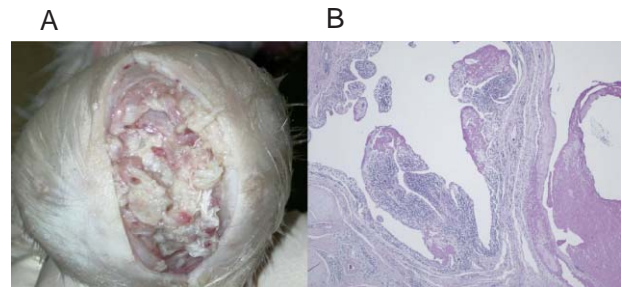


図6 関節におけるCAEV病変

- (A) 手根関節腫脹部
 (B) 同部位組織病変

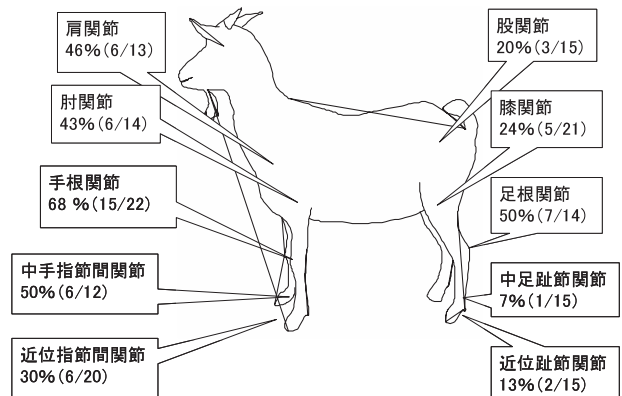


図7 シバヤギの四肢における関節炎・関節周囲炎の分布

図の数字の分母は検査した関節の数を, 分子は病変が存在した関節の数を表す。

(2) 関節以外の臓器における病変

抗体陽性個体及びこれらと閉鎖環境下で集団飼育されていたシバヤギ, 雌28頭の主要臓器及び泌乳生殖器, 雄11頭の生殖器について病理組織学的に精査した。その結果, 雌の検体ではCAEの特徴病変とされる非化膿性乳腺炎が80.8%と高率に観察された (図8A)。また, 同じくCAEの特徴病変の一つではあるが稀とされる間質性肺炎が17.9%で観察された (図8B, 表3)。雄の生殖器の検査では1頭で精巢に軽度のリンパ球浸潤が認められたが, CAEV感染を示唆する非化膿性炎症像は認められなかった (表4)。

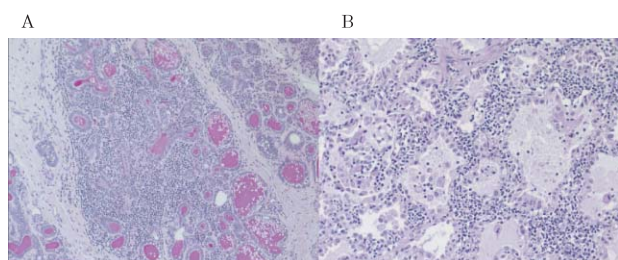


図8 シバヤギで見られた関節以外の主要CAE組織病変

- (A) 乳腺における非化膿性炎症像。
間質にリンパ球の高度浸潤が認められた
- (B) 肺における非化膿性炎症像。
間質におけるリンパ球の高度浸潤，肺胞上皮の肥厚，肺胞腔内の液体貯留が認められた。

考 察

日本はCAEの発生報告がなかった事から長年CAE清浄国と考えられていた。そのため診断法を持たず、疫学調査及び病理学的検索も行われていなかった。しかし、2002年に一農場で関節炎及び肺炎症状を呈する山羊が発見された事によりCAEの存在が疑われた。当時、我々は

CAEVを有さなかったため、OIEの診断マニュアルに従い近縁かつ抗原共通性の高いMVでAGID用抗原を作製し、同農場の抗体調査を実施した。その結果、同農場では高い割合で抗体陽性山羊の存在が確認された。本研究では、AGID法にMV及びVVVの糖タンパク抗原を用いたが、MV及びVVVは自然界では山羊に感染しないと報告されていることから、本疾病がマエディ・ピスナである可能性は低いと考えられた。従って、被検山羊の臨床症状、病理学的所見及びウイルス学的検査結果を総合的に判断した結果、本疾病はCAEと考えられた。

本研究で我々はCAEVを国内で初めて分離し、これを用いてAGID法、PCR法、シンシチウムアッセイ及びIFAによる我が国におけるCAE診断法を確立した。AGID法はその判定にある程度の習熟が要求され、抗原の作製にも多くの材料と時間を要するが、検査法としては非常に簡便であるため、多頭飼育群における定期検査に利用可能である。また、本研究におけるPCR法はnested法であり、微量なウイルス遺伝子を検出可能である反面、交差汚染に十分気をつけなければならない。さらに、本研究において、抗体陰性の個体でもCAE病変が観察されるこ

表3 シバヤギの主要臓器病変とその出現頻度

臓器	組織所見	病変の程度 ¹⁾	病変の検出率 ²⁾
乳腺	非化膿性乳腺炎	++ ~ +++	80.8%(21/26)
関節	非化膿性関節炎	++ ~ +++	41.7%(10/24)
肺	間質性肺炎	++ ~ +++	17.9%(5/28)
脾	平滑筋増生	+	35.7%(10/28)
腎	腎乳頭リンパ球浸潤	+	78.6%(22/28)

1) + ; 軽度, ++ ; 中等度, +++ ; 重度

2) カッコ内は病変検出頭数/検査頭数

表4 シバヤギの関節及び雄性生殖器の病変

個体No.	抗体 ¹⁾	組織病変の程度 ²⁾						
		関節	精巣	精巣上体	精嚢腺	前立腺	尿道球腺	陰茎
No.1	++	-	-	-	-	-	-	-
No.2	++	++	-	-	-	-	-	-
No.3	+	++	-	-	-	-	-	-
No.4	+	+	+	-	-	-	-	-
No.5	+	+++	-	-	-	-	-	-
No.6	+	+++	-	-	-	-	-	-
No.7	+	+	-	-	-	-	-	-
No.8	+	+++	-	-	-	-	-	-
No.9	-	++	-	-	-	-	-	-
No.10	-	++	-	-	-	-	-	-
No.11	-	+++	-	-	-	-	-	-

1) ++ ; 強陽性, + ; 陽性, - ; 陰性

2) + ; 軽度, ++ ; 中等度, +++ ; 重度

とが判明した(表4)ため, CAEの確定診断には病理組織学的検査を併用する必要があると思われる。

CAEV感染個体の関節液を羊由来のFLL細胞に接種したところ, 同細胞はシンシチウムを形成し, それらの細胞から抽出したDNAを用いたPCRで陽性を示した。また, 感染FLL細胞を接種した山羊は抗体陽性を示した。これらのことは, 山羊から分離されたCAEVが, 異種の動物である羊のFLL細胞によって増殖可能であることを示しており, 本細胞はCAEVの分離に有効であることが明らかになった。

CAEV国内分離株を実験感染させた3頭のシバヤギは, 接種後2年経過してもCAEに特徴的な臨床症状を示さなかった。また, 採材時期によってはAGID法とPCR法の結果が一致しなかったが, これは宿主の免疫応答やウイルスの体内動態の変動が関与している可能性が考えられた。これらの事象をより詳細に検討するためには, 今後, より微量な抗体や抗原を検出するELISA及びreal-time PCR法や, ウイルスの体内動態を組織レベルで検索できる免疫組織化学的染色や*in situ* hybridization等の方法を用いる必要がある。従って, これらの検査法確立を急ぐと共に, 今後も経過観察及び採材・検査を継続する予定である。

CAEは欧米では発生数も多く, それに関する報告も多いが, 日本在来種であるシバヤギについての報告は皆無であった。そこで本研究では, シバヤギにおける関節病変の分布, 主要臓器におけるCAE病変の有無について詳細な病理学的検査を実施した。関節病変が最も多く認められた部位は他品種同様手根関節であった。一方, 手根関節に次いで好発部位とされる膝関節における病変発現率がシバヤギでは検査個体の23.8%と低いことが明らかになった。関節以外の病変は, 他品種同様非化膿性乳腺炎が検査個体の80%以上で見られた。CAEVが一般的な標的細胞であるマクロファージ同様, 乳腺上皮細胞にも感染し, 同病変を引き起こすことや, 感染山羊が乳汁中に感染能を有するウイルスを排出し, 経乳感染がCAEVの主たる伝播経路となっていることは広く知られている。従って, 乳腺組織にCAEに特徴的なこの病変が高率に認められたことから, シバヤギにおけるCAEV伝播経路もまた, 他品種同様, 経乳感染が主となっていると考えられた。また, 他品種では稀とされる肺炎病変が, シバヤギでは乳腺病変に次いで多く見られるといった興味深い知見が得られた。このことから, 発咳などの呼吸器症状で発生する飛沫も重要な感染源になる可能性が考えられた。シバヤギは実験動物として閉鎖環境下で飼育され

ることも多いため, 本知見はCAE伝播を防ぐ上で非常に重要であると考えられる。さらに本研究では, 雄性生殖器について病理組織学的検索を行ったが, CAEVによると思われる病変は認められなかった。一般に, 雄山羊の精液を介したCAEVの父子感染の可能性は低いとされるが, 山羊では凍結精液を用いた人工授精による繁殖も行われていることから, 今後, *in situ* hybridizationによる雄性生殖器のCAEV核酸の検索や, PCRを用いた精液からのウイルス遺伝子の検出などを試み, 保存精液などの清浄性を確認する必要がある。

CAEの早期撲滅には, 感染個体の早期摘発淘汰及び, 主たる伝播経路となる経乳感染を防ぐことが重要であると考えられる。本研究で確立されたAGID法ならびにPCR法を現場で広く用いてCAEV感染山羊を早期摘発することに加え, 出産直後の親子分離や, 代用乳または凍結融解及び加熱処理を施した乳汁による哺育を行う事で経乳感染を防ぎ, CAEの早期撲滅が図られることを期待する。

まとめ

2002年8月, 日本国内で初めて発症個体が確認された山羊関節炎・脳脊髄炎(Caprine arthritis-encephalitis, CAE)について, 本疾病の診断方法の確立及び病理学的特徴から伝播様式の解明を試みた。診断法としては, OIE(国際獣疫事務局)のマニュアルが確定診断法と定める寒天ゲル内沈降(AGID)試験を始め, PCR法, シンシチウムアッセイ法及び間接蛍光抗体法を確立した。また, 病理組織学的検査の結果, 日本在来種であるシバヤギにおける関節病変の好発部位及び諸臓器におけるCAEの特徴的病変が明らかとなり, CAEVの伝播様式に, 一般的に主とされる経乳感染の他, 経飛沫感染の可能性があることが示唆された。

本研究で確立されたAGID試験を用い, 全国から採取された山羊血清の抗体保有率を調査した結果, 3,255頭中714頭(21.9%)が抗体陽性であることが判明した。本試験を用いた定期検査を実施することにより, CAEV感染個体を早期に摘発し, 国内からのCAE撲滅が図られることを期待する。

謝 辞

本研究の共同研究者である茨城県北家畜保健衛生所 都築智子先生, 長野県松本家畜保健衛生所 小林千穂先生, 芳川恵一先生, 鳥取県倉吉家畜保健衛生所 岡田綾子先生, 栃木県中央家畜保健衛生所 小島浩一先生, 財団法人癌研究会ゲノムセンター 中澤京子先生には多大なるご協力とご指導をいただきました。改め

て感謝いたします。また、Maedi virus及びVisna virusを分与いただいた北海道大学 小沼操教授、AGID陽性指示血清を分与いただいたDr. D. P. Knowles, Jr. (Animal Disease Research Unit, USDA)をはじめ検査材料をご提供いただいた全国の家畜保健衛生研究所の諸先生方にこの場をお借りして心よりお礼を申し上げます。

結果の発表，活用等

1) 都筑ら. 2003. 第135回日本獣医学会学術集会公演要旨集, p. 123.

- 2) 芳川ら. 2003. 第135回日本獣医学会学術集会公演要旨集, p. 75.
- 3) 小西ら. 2003. 第136回日本獣医学会学術集会公演要旨集, p. 132.
- 4) Konishi *et al.* 2003. 38th US-Japan Cooperative Program in Natural Resources Panel of Animal and Avian Health Meeting p. 13.
- 5) Konishi *et al.* 2004. An epidemic of Caprine Arthritis Encephalitis in Japan: Isolation of the Virus. *J. Vet. Med. Sci.* 66(8): 911-917.

Summary

Epidemiological survey and pathological studies on Caprine arthritis-encephalitis (CAE) in Japan

Misako KONISHI, Makoto HARITANI, Kumiko KIMURA, Takamitsu TSUBOI,
Hiroshi SENTSUI & Kenji MURAKAMI

Caprine arthritis-encephalitis (CAE) is a disease of domestic goats caused by a lentivirus of the family Retroviridae. Since Japan has been assumed to be free from the disease, there has neither been information about it nor diagnostic methods for it so far. A disease characterized by arthritis of carpal joints and occasionally by pneumonia was seen among goats on a farm in Nagano prefecture of Japan in the summer of 2002. For the purpose of CAE detection, we developed an agar gel immunodiffusion (AGID) test using maedi-visna virus as the antigen according to the manual of standards for diagnostic tests and vaccines of the Office International de Epizootic (OIE). We also developed polymerase chain reaction (PCR) method, syncytium assay, and indirect immunofluorescence tests for CAEV. Serological investigation of CAEV was performed with 3,255 serum samples from goats in various parts of Japan. Seven hundred [and] fourteen goats were positive for the antibody to CAEV; the rate of positive reactors was 21.9%. Sixty-two Shiba goats, which were Japanese indigenous species and antibody positive to CAEV, were also investigated pathologically. The CAE specific findings in histopathology were observed in the carpal joint (68.2% of goats), tarsal joint (50.0% of goats) and metacarpopharangeal joint (50.0% of goats). Moreover, nonsuppurative mastitis (80.0% of goats) and interstitial pneumonia (17.9% of goats) were also observed. These results suggested that CAEV-infected goats have been prevalent in parts of Japan and also suggested that, in addition to a milk-borne infection, the droplet infection may be the important route for horizontal transmission of CAEV in Shiba goats.