

ネコ白血病ウイルス感染症の診断

著者	望月 雅美, 野田 浩正, 佐藤 平二
雑誌名	鹿児島大学農学部學術報告=Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University
巻	35
ページ	153-157
別言語のタイトル	Diagnosis of Feline Leukemia Virus Infections
URL	http://hdl.handle.net/10232/1718

ネコ白血病ウイルス感染症の診断

望月雅美・野田浩正・佐藤平二

(家畜微生物学研究室)

昭和59年8月3日 受理

Diagnosis of Feline Leukemia Virus Infections

Masami MOCHIZUKI, Hiromasa NODA and Heiji SATO

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

緒 言

1964年, グラスゴー大学の Jarrett らにより, ネコの「白血病」が, ニワトリやマウスの白血病ウイルスと類似した構造を示すウイルスにより伝達可能であることが示され^{17,19)}, 本ウイルスが培養細胞内で増殖することが確認されて以来¹⁵⁾, 多数の研究結果に基づいて, レトロウイルス科, オンコウイルス亜科に属するネコ白血病ウイルス (Feline leukemia virus: FeLV) と分類されている²⁰⁾. その過程については2, 3の総説に詳しい^{6,7,16)}.

FeLV が詳細に研究されているウイルスの1つとなっているのは, 比較ウイルス学上, ないしヒトウイルス性腫瘍の実験・研究モデルとしての興味からであり, 獣医学上は欧米を始めとして本邦においても依然として未解決のままになっている. その理由は FeLV 検出の難しさにあったと考えられる. 本ウイルスは干渉試験で区別されるサブグループ間の差はあるものの, ネコ由来細胞を始めとして他動物種由来細胞でも増殖するが, 何ら細胞変性効果を示さない^{14,32)}. したがって研究初期においては, ウイルスの存在や増殖の有無は電子顕微鏡直接観察¹⁵⁾や補体結合反応³⁰⁾, 蛍光抗体法⁸⁾, あるいは干渉試験^{3,31)}にて判定してきた. さらに, FeLV の宿主に及ぼす免疫抑制作用^{25,27,34)}も本ウイルス感染症全体の把握を困難にしている.

著者らは重要性を増している FeLV 感染症解析の第一歩として, 1982年5月より1983年9月までに当講座に検査依頼のあった材料76例について, 細胞培養法による感染性ウイルスの検出 (Focus Inducing Assay: FIA), および蛍光抗体法 (Immunofluorescence Assay: IFA) と酵素抗体法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA) による FeLV 抗原

本研究の一部は, 昭和57年度鹿兒島大学援助会研究奨励費 (個人研究) と昭和58年度文部省科学研究費補助金 (課題番号 58760223) の助成を受けた.

検出を試みたので, その成績を報告する.

材料と方法

1. 被検材料

鹿兒島県, 東京都, 埼玉県下の開業獣医師, 宮崎大学農学部獣医学科, および本学農学部附属家畜病院より依頼された合計76例を材料とした. 原則として一頭につき血液塗沫標本と血漿を被検材料としたが, 当講座までの材料送付過程での汚染細菌の増殖, 標本の破損, あるいは患猫病勢に因る必要量の採血不可能などの理由から, FIA と IFA ではおのおの65例, ELISA では31例を検査した.

2. 細胞培養法

正常ネコ腎細胞系である Crandell feline kidney (CRFK) 細胞にマウス肉腫ウイルス (Murine sarcoma virus: MuSV) Moloney 株を感染後, クローニングして得た non-producer 細胞である C81 細胞²⁾, ネコ胎児線維芽細胞である FEA 細胞, およびサブグループ A・FeLV である A/Glasgow-1 株を FEA 細胞に持続感染させた A/Glasgow-1 細胞はグラスゴー大学より分与を受けた.

C81 細胞, FEA 細胞および A/Glasgow-1 細胞は, Eagle's MEM に仔牛血清を5%, Tryptose phosphate broth を10%, 抗生物質 (ペニシリン 100 I. U./ml とストレプトマイシン 100 µg/ml) を添加した維持培地で培養した.

3. Focus Inducing Assay

Fischinger らが開発し²⁾, Jarrett らによって改良された方法を用いた¹¹⁾. 胎児仔牛血清を10%に含む Eagle's MEM 増殖培地 4 ml と, 直径6 cm のプラスチックシャーレを用いて, 8×10^4 個の C81 細胞を24時間培養後, 被検血漿を等量の 8 µg/ml ポリブレン液と混合, 接種した. 37°C で2時間の吸着操作後, 増殖培地に置換し, さらに培養を続け, 5日目に旧培地除去後, 1×10^6 個の FEA 細胞を重層した. 接種後9

目目に倒立顕微鏡下でフォーカスの有無を判定した。これらの培養は37°C, 5% CO₂の条件下で実施した。対照陽性抗原には A/Glasgow-1 株を用いた。6 × 10⁴ 個/ml の A/Glasgow-1 細胞を直径 9 cm のプラスチックシャーレで培養し, 24 時間後, 新鮮培地に置換した。さらに24時間培養後の培養液を回収し, 2,000 rpm, 10 分間の遠心操作をおこない, 上清を供した。

4. 螢光抗体法

風乾・未固定の血液塗沫標本を-20°Cメタノールで10分間処理した後, 間接法で実施した。一次反応血清には分子量27,000ドルトン(p27)のFeLV主要内部蛋白に対する家兎免疫血清をグラスゴー大学より分与を受け, 用いた。抗家兎IgG血清は細羊を用いて作製した。一次および二次反応とも37°C, 60分間の条件でおこなった。

5. 酵素抗体法

市販のLeukassay F (PITMAN-MOORE, INC., U. S. A.) を用いて, 血漿を被検材料とした。

結 果

検査結果は Table 1 に示した。

FIA で陽性と判定されたのは5例で, リンパ肉腫を疑うもの, 貧血症と黄疸, 口腔内潰瘍・貧血症の各1例, および FeLV 陽性ネコと同居していた2例であった。

Table 1. Results of feline leukemia virus detection by focus inducing assay (FIA), immunofluorescence assay (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA: Leukassay F)

	FIA	IFA	ELISA	Number of samples
	—	—	—	24
	+	+	+	2
	+	—	+	2
	—	—	+	1
	—	+	—	1
	—	—	NT	23
	—	NT	NT	10
	NT	—	NT	8
	NT	+	NT	3
	+	NT	+	1
	—	+	NT	1
Total of positive	5	7	6	Total 76

*: +: positive, -: negative, NT: not tested.

IFA で陽性と判定されたのは7例で, 黄疸・脱水・軽い貧血などを伴う一般症状の悪化3例, 白血球増多を主徴とするもの1例, 貧血症1例, リンパ肉腫を疑うもの1例, および同居ネコ1例であった。

ELISA では6検体が陽性と判定されたが, そのうち, 他の二方法では陰性であった1検体は貧血・白血球増多を主徴とし腎の縮小が認められた。

考 察

この報告は1982年5月より17カ月間, 当講座で検査した FeLV 感染症診断の結果をまとめたもので, 76検体のうち明らかに健康で定期診断的なもの3検体を除き, 残りは総て臨床獣医師が何らかの異常を認め FeLV 関与の有無を検査希望したものと, それらと同居しているネコの検体である。

FIA の原理は, MuSV ゲノムを有する C81 細胞に FeLV が感染すると, 「肉腫遺伝子」を含む MuSV ゲノムが FeLV にレスキューされ, ゲノムが MuSV で FeLV のエンベロープを有する MuSV(FeLV) という偽型ウイルスが出現する。FeLV 単独では試験管内で細胞を形質転換せず, 顕微鏡下では判定不可能であるが, 偽型ウイルスは形質転換をおこし容易に認知できる^{3,4,14,31,33}。原法²⁾は C81 細胞のみを用いた試験法であるが, C81 細胞が完全な単層を形成しないこともあって, さらに MuSV (FeLV) に感受性の高い FEA 細胞を重層培養することにより形質転換を増強させ, 明瞭化, 改良したものである¹¹⁾。本方法は判定が容易であり, 陽性は即, ウイルス血症を意味する反面, 一般的な検査法として2, 3の難点も挙げられる。無菌操作を必要とし, 結果の判定に長時間を必要とすること, さらに検体を専門機関に依頼する際, 送付に時間を要すると, 材料中で汚染した細菌などの増殖が始まったり, FeLV が不活化されてしまう可能性がある。FeLV 感染症は伝播力の強い急性感染症と異なり, 検査に要する時間はあまり重要でなく, むしろ診断の正確度が問題と考えられる。FIA を主診断法にしているグラスゴー大学には, 主として郵送によりイギリス全土やアイルランドから検体が集まるが, 採血後約一週間以内の材料であれば支障なく, 実験的にも確認されている¹²⁾。しかし, 気候条件の相違する本邦では, とくに夏季においては, 遠隔地から送付された材料に本方法を応用する際にはその結果の判定に考慮を要する。

IFA は末梢血液中の細胞成分, 主として好中球と血小板中のウイルス抗原を検出するもので, 「スライド試験」あるいは「Hardy test」と呼ばれている。本報

告では一次反応用に単一特異性の抗 p27 血清を用いた。p27 はウイルス構成蛋白の 30% 以上を占め⁵⁾、IFA に本血清を用いたことは適当であると考えられるが、原法のごとく⁸⁾、多価抗血清である抗 FeLV 血清を用いた方が診断にはより適していると考えられるし、作製も容易である。本方法は検出対象抗原が比較的安定であることから、標本作製後、検査まで長時間を要してもあまり支障ない反面、標本の良悪に影響されやすく、判定が難しいこともある。

ELISA は、現在、アメリカ合衆国やイギリス国内で販売・利用されている製品を用いた。本方法は末梢血液中の可溶性 FeLV 群特異抗原を検出する目的のものであり、IFA と同じ抗原を検出可能と考えられる^{9,12)}。本方法の利点は鋭敏で、特別な技術・設備が必要なく、短時間で判定可能な点にあるが、IFA と同様、色調の中間的なものは判定が難しい。

FeLV の関与している疾病、あるいは分離した FeLV サブグループとそれらの関係について、現時点ではウイルス分離陽性例数が少なく結論が得られない。今後も症例を増やすことにより明確化すると考えられる。これは本研究の主目的の 1 つであり、FeLV 感染症解明上、重要である^{10,13,28)}。

FeLV 診断上、現在一番問題となっているのは、これら 3 種検査法の結果が一致しなかった際の、あるいは 1 種類のみ応用した際の理解のしかたと患猫の処置法である。一般的に FIA と IFA の結果はよく一致する。一方、この 2 方法と ELISA の結果を比較すると、ELISA で陰性の場合ほぼ 100%、他の 2 方法でも陰性であるが、ELISA 陽性の場合、平均するとそのうちの約 60~70% が他の方法でも陽性であり⁶⁾、残りの約 30% には感染性ウイルスが認められない¹²⁾。試験法間の鋭敏性の相違、リンパ組織での一過性増殖にともなうウイルス抗原血症、潜伏性ウイルスキャリアー状態、さらには、なんらかの理由による内在性ウイルス (RD 114 ウイルス) 遺伝子の部分的発現の可能性などが考えられているが^{12,20,22)}、いずれも完全に証明・説明し得ない。今回の結果は陽性例数こそ少ないが、ELISA 陰性例は完全に FIA 陰性であり、陽性の場合も他の報告と類似している。しかし、IFA の結果をこれまでの報告と比較すると、本報告で用いた IFA は何らかの手技改良や判定基準の再考が必要とも考えられる。

これまでネコが FeLV に感染すると 2 通りの転帰をとると考えられてきた。1 つは主として中和抗体産生による生体からのウイルス排除であり¹⁸⁾、他は骨

髄での持続的ウイルス感染・産生によるウイルス血症を呈し、リンパ肉腫や他の FeLV 随伴疾病に罹患し、死の転帰をとる型である^{6,7,16,23)}。後者にはさらに免疫学的要因として、腫瘍特異抗原である Feline Oncornavirus - Associated Cell Membrane Antigen (FOCMA)¹¹⁾ に対する液性免疫も関与していると考えられているが、研究が進むにつれ、FOCMA および抗腫瘍免疫はもっと複雑と考えられてきており³⁵⁾、今後の研究にまつところが大きい。

現在最も一般的な解釈法として次のように考えられる。FIA あるいは IFA 陽性は、FeLV の骨髄細胞での増殖に基づくウイルス血症であり、患猫は速やかに隔離ないしそれに類似した処置を必要とする。ELISA 陽性は、少なくとも検査時点で FeLV 感染を示すので²⁰⁾、可能ならば他の検査法でも調べる。その結果、FIA あるいは IFA 陰性の場合、4 週間あるいは 6~8 週間後に再検査を実施した上で判定する。しかし、ELISA 陽性で FIA または IFA が陰性の結果が継続することもある。この場合、少なくとも実験的に感染性ウイルスが他のネコへ伝播しない可能性が示されているが¹²⁾、畜主にはそれなりの注意を促す必要がある。ELISA と FIA あるいは IFA が共に陰性の時は FeLV 陰性と考える。

しかし、最近の 2, 3 の研究から、さらに考慮しなくてはならない点として、明らかに FeLV 感染から回復し、これまでに述べたウイルス検出法の結果が陰性で、中和抗体や抗 FOCMA 抗体を保有していても、FeLV が骨髄細胞に潜伏感染している症例が数多いことが判明した^{24,29)}。これらは実験的にコルチコステロイドの投与により再活性化される²⁹⁾。自然界においては、他種病原体の感染などを含む種々の原因によるストレスが再活性化の誘因になりうると考えられる。もし、この状態のネコの FeLV 検査を実施すると、血中抗体の存在により、例えば FIA 陰性、IFA 陽性、ELISA 陰性という結果が得られても不思議でない。「正確な診断と予後判定」を目的としている現在、さらに診断法の技術的改良を加えるとともに、Jarrett らの推奨する¹²⁾、12 週間間隔で 2 回、FIA あるいは IFA で検査し、2 回とも陰性の場合、FeLV 陰性と考える方法が現在最も応用しやすいと考えられる。さらに、「潜伏感染」を考慮すれば、血中抗体価の測定は確実に診断の補助となりうるし、FeLV 診断結果は材料採取時点での状況であり、変化しうるという認識のもとに定期的に検査することが一番望ましい。

要 約

1982年5月より17カ月間に、当講座に依頼のあった合計76例の材料のネコ白血病ウイルス (FeLV) 検査を実施した。検査法として、培養細胞を用いる Focus Inducing Assay (FIA), 血液塗沫標本を用いる間接蛍光抗体法 (IFA) および酵素抗体法 (ELISA) である Leukassay F を応用した。

その結果、FIA では5例、IFA では7例、ELISA では6例の陽性例が認められた。そして、これら3種検査法の比較をおこない、現在の FeLV 感染症診断法の実際について考察を加えた。

謝辞 ネコ白血病ウイルス感染細胞を分与下さいました Prof. Oswald Jarrett, Univ. Glasgow Vet. School, および検体を提供して下さいました方々に謝意を表します。

文 献

- 1) Essex, M., Klein, G., Snyder, S. P. and Harrold, J.B.: Correlation between humoral antibody and regression of tumors induced by feline sarcoma virus. *Nature.*, **233**, 195-196 (1971)
- 2) Fischinger, P. J., Blevins, C. S. and Nomura, S.: Simple, quantitative assay for both xenotropic murine leukemia and ecotropic feline leukemia viruses. *J. Virol.*, **14**, 177-179 (1974)
- 3) Fischinger, P. J. and O'Connor, T. E.: Viral infection across species barriers: Reversible alteration of murine sarcoma virus for growth in cat cells. *Science*, **165**, 714-716 (1969)
- 4) Fischinger, P. J. and O'Connor, T. E.: Productive infection and morphologic alteration of human cells by a modified sarcoma virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**, 429-438 (1970)
- 5) Graves, D. C. and Velicer, L. F.: Properties of feline leukaemia virus. I. Chromatographic separation and analysis of the polypeptides. *J. Virol.*, **14**, 349-365 (1974)
- 6) Hardy, W. D. Jr.: The feline leukemia virus. *J. Amer. Anim. Hos. Assoc.*, **17**, 951-980 (1981)
- 7) Hardy, W. D. Jr., Hess, P. W., MacEwen, E. G., McClelland, J., Zuckermann, E. E., Essex, M., Cotter, S. M. and Jarrett, O.: Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Res.*, **36**, 582-588 (1976)
- 8) Hardy, W. D., Hirshaut, Y. and Hess, P.: Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. in Dutcher, D. M., and Chieco-Bianchi, L. (eds.), *Unifying concepts of leukemia*. p. 778-799, S. Karger, Basel (1973)
- 9) Hirsch, V. M., Searcy, G. P. and Bellamy, J. E. C.: Comparison of ELISA and immunofluorescence assays for detection of feline leukemia virus antigens in blood of cats. *J. Amer. Anim. Hos. Assoc.*, **18**, 933-938 (1982)
- 10) Jarrett, O.: Natural occurrence of subgroups of feline leukemia virus. in *Viruses in naturally occurring cancers. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, **7**, 603-611, Cold Spring Harbor Lab. (1980)
- 11) Jarrett, O., Golder, M. C. and Stewart, M. F.: Detection of transient and persistent feline leukaemia virus infections. *Vet. Rec.*, **110**, 225-228 (1982)
- 12) Jarrett, O., Golder, M. C. and Weijer, K.: A comparison of three methods of feline leukaemia virus diagnosis. *Vet. Rec.*, **110**, 325-328 (1982)
- 13) Jarrett, O., Hardy, W. D., Jr., Golder, M. C. and Hay, D.: The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats. *Int. J. Cancer*, **21**, 334-337 (1978)
- 14) Jarrett, O., Laird, H. M. and Hay, D.: Determination of the host range of feline leukaemia viruses. *J. gen. Virol.*, **20**, 169-175 (1973)
- 15) Jarrett, O., Laird, H. M., Hay, D. and Crighton, G. W.: Replication of cat leukaemia virus in cell cultures. *Nature*, **219**, 521-522 (1968)
- 16) Jarrett, W. F. H.: Cat leukemia and its viruses. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, **19**, 165-193 (1975)
- 17) Jarrett, W. F. H., Crawford, E. M., Martin, W. B. and Davie, F.: A virus-like particle associated with leukaemia (lymphosarcoma). *Nature*, **202**, 567-569 (1964)
- 18) Jarrett, W. F. H., Jarrett, O., Mackey, L., Laird, H., Hardy, W. D., Jr. and Essex, M.: Horizontal transmission of leukaemia virus and leukaemia in the cat. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 833-841 (1973)
- 19) Jarrett, W. F. H., Martin, W. B., Crighton, G. W., Dalton, R. G., and Stewart, M. F.: Leukemia in the cat: transmission experiments with leukemia (lymphosarcoma). *Nature*, **202**, 566-567 (1964)
- 20) Kahn, D. E. and Mia, A. S.: In defence of leukassay F. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, **177**, 480-482 (1980)
- 21) Kahn, D. E., Mia, A. S. and Tierney, M. M.: Field evaluation of Leukassay F, an FeLV detection test kit. *Feline Pract.*, **10**, No. 2, 41-45 (1980)
- 22) Lutz, H., Pedersen, N. C., Harris, C. W., Higgins, J. and Theilen, G. H.: Detection of

- feline leukemia virus infection. *Feline Pract.*, **10**, No. 4, 13-23 (1980)
- 23) Mackey, L. : Feline leukaemia virus and its clinical effects in cats. *Vet. Rec.*, **96**, 5-11 (1975)
- 24) Madewell, B.R. and Jarrett, O. : Recovery of feline leukaemia virus from non-viraemic cats. *Vet. Rec.*, **112**, 339-342 (1983)
- 25) Mathes, L. E., Olsen, R. G., Hebebrand, L. C., Hoover, E. A., Schaller, J. P., Adams, P. W. and Nichols, W. S. : Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15,000-dalton protein, from feline leukemia virus. *Cancer Res.*, **39**, 950-955 (1979)
- 26) Matthews, R. E. F. : *Classification and nomenclature of viruses*. S. Karger, Basel (1982)
- 27) Olsen, R. G., Hoover, E. A., Schaller, J. P., Mathes, L. E., and Wolff, L. H. : Abrogation of resistance to feline oncornavirus disease by immunization with killed feline leukemia virus. *Cancer Res.*, **37**, 2082-2085 (1977)
- 28) Onions, D., Jarrett, O., Testa, N., Frasconi, F. and Toth, S. : Selective effect of feline leukaemia virus on early erythroid precursors. *Nature*, **296**, 156-158 (1982)
- 29) Rojko, J. L., Hoover, E. A., Quackenbush, S. L. and Olsen, R. G. : Reactivation of latent feline leukaemia virus infection. *Nature*, **298**, 385-388 (1982)
- 30) Sarma, P. S., Gilden, R. V. and Huebner, R. J. : A complement-fixation test for feline leukaemia and sarcoma viruses (the Cocal test). *Virology*, **44**, 137-145 (1971)
- 31) Sarma, P. S. and Log, T. : Viral interference in feline leukemia-sarcoma complex. *Virology*, **44**, 352-358 (1971)
- 32) Sarma, P. S., Log, T., Jain, D., Hill, P. and Huebner, R. J. : Differential host range of viruses of feline leukemia-sarcoma complex. *Virology*, **64**, 438-446 (1975)
- 33) Sarma, P. S., Sharar, A., Walters, V. and Gardner, M. : A survey of cats and humans for prevalence of feline leukaemia-sarcoma virus neutralising serum antibodies. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **145**, 560-564 (1973)
- 34) Schaller, J. P., Hoover, E. A. and Olsen, R. G. : Active and passive immunization of cats with inactivated feline oncornavirus. *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 1441-1450 (1977)
- 35) Vedbrat, S. S., Rasheed, S., Lutz, H., Gonda, M. A., Ruscetti, S., Gardner, M. B. and Prenskey, W. : Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen: A viral and not a cellularly coded transformation-specific antigen of cat lymphomas. *Virology*, **124**, 445-461 (1983)

Summary

Diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) was conducted on the 76 blood samples requested to our laboratory during 17 months from May, 1982. The tests were carried out by means of focus inducing assay (FIA), immunofluorescence assay (IFA), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA: Leukassay F).

Positive results were obtained in 5 cases by FIA, in 7 cases by IFA and in 6 cases by ELISA, respectively. General interpretations of the results obtainable by these assays and diagnostic methods applied on to FeLV infection presently recommended were discussed.