

ニューカッスル病ウイルスに対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的抗原検出法の開発

山本 佑¹⁾, 清水真也²⁾, 真瀬昌司³⁾

Development of monoclonal antibody-based immunohistochemical method for Newcastle disease virus detection

Yu YAMAMOTO¹⁾, Shinya SHIMIZU²⁾ & Masaji MASE³⁾

背景と目的

ニューカッスル病 (ND) は ND ウイルスを原因とする家畜伝染病であり、高病原性鳥インフルエンザとの鑑別が必要な重要な疾病である¹⁾。ND ウイルスの宿主域は広く、200 種類以上の鳥類への感染が知られている²⁾。近年、家禽へ病原体を運ぶ存在として野鳥が注目されているが、ND ウイルスに関しても野鳥から家禽へウイルスが伝播したと推察される事例が複数報告されている^{3, 4)}。野鳥が ND ウイルスの伝播動物となり得るならば、野鳥における ND の病理学的、ウイルス学的知見を収集することが、ND 対策や疫学調査に有用と考えられる。しかし、組織切片を用いた免疫組織化学 (IHC) による ND ウイルス抗原の検出法は未だ普及しておらず、世界でもごく少数の研究機関のみで実施報告がなされている。ND の研究において、IHC を用いた組織切片上における病原体の抗原検出法を確立することにより詳細な解析が可能となる。

IHC の確立で問題となり得る点として、病理解析用の試料には、抗原性に影響しうるホルマリン固定とパラフィン包埋処理が施されることが挙げられる⁵⁾。また IHC では動物の正常組織への不要な非特異反応を生じない良好な一次抗体の選択が重要となる⁵⁾。免疫血清に由来するポリクローナル抗体は、反応性にロット差があるほか、正常組織への非特異反応が生じやすい傾向がある。従って、特異性が高く恒久的に生産が可能な IgG モノ

クローナル抗体 (Mab) が IHC に利用しやすいと考えられる。

本研究で、我々は近年日本で流行した ND ウイルスに対する Mab を作製し、本抗体を利用した IHC を確立したので紹介する。

研究の概要

1. ND ウイルス抗原の調整

ND ウイルス福岡株 ck/Fukuoka/2004 (Genotype VII, 強毒型)⁶⁾ を発育鶏卵で増殖させ、ウイルスを含む尿膜腔液を回収後、 β プロピオラクトンでウイルスの不活化処理を行った。ショ糖密度勾配超遠心法によりウイルス分画を精製し、これを PBS で溶解し抗原溶液とした。抗原溶液のポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施して、既報の ND ウイルス蛋白泳動パターンと一致することを確認した。

2. エライザ法による抗体スクリーニング法の確立

Mab 分泌ハイブリドーマのスクリーニング法として、エライザ法による抗体検出系の確立を行った。ND ウイルス抗原と、マウスおよび鶏の ND ウイルス免疫血清を用いて、ABTS を発色基質に使用したエライザ法の条件設定を行った。試行の結果、エライザ法によるマウスおよび鶏の免疫血清中の抗 ND 抗体の検出が可能となった。

さらに、スクリーニングにおいて、ホルマリン固定された抗原に対しても反応する Mab を効率よく選別するために酵素抗体法を応用した方法 (細胞エライザ法) を検討した。96 ウェルプレート上の培養細胞に ND ウイ

1) 農研機構 動物衛生研究部門 病態研究領域 病理ユニット

2) 旧農研機構 動物衛生研究所 動物疾病対策センター

3) 農研機構 動物衛生研究部門 ウイルス・疫学研究領域 疾病防除基盤ユニット

ルスを感染させた後ホルマリン固定し、一般的な IHC の手法に準じた方法で染色を実施した。

ハイブリドーマのスクリーニングには、後述する ND ウイルス福岡株感染動物のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた IHC も併用した。

3. 抗 ND ウイルス抗体産生ハイブリドーマの作出

BALB/c マウスに対して水酸化アルミニウムゲルアジュバンド加 ND 抗原で免疫した。エライザ法にて抗体上昇を確認した個体から脾臓を摘出した。脾細胞とミエロマ細胞との細胞融合を実施し、ハイブリドーマを作製した。スクリーニングにより抗 ND ウイルス抗体を分泌するハイブリドーマを選別し、2 回の限界希釈法による細胞クロニングを実施した。さらにマウス抗体アイソタイピングキットを用いて IgG 分泌株を選別した。その結果、エライザ法陽性の抗 ND ウイルス Mab (IgG) 産生ハイブリドーマを 14 クローン樹立した (表 1)。細胞エライザ法の結果、ホルマリン固定した ND 抗原にも反応する Mab は 8 つであった。更なるスクリーニングの結果、IHC に利用できると考えられた 3 つの Mab (22C483, 2E5-11, 8E9A9) を選抜し、以降の評価に用いることとした。

4. ND ウイルス感染モデルの作製

国内で分離された 5 つの ND ウイルス株、すなわち福岡株、岡山株 ck/Okayama/2002 (Genotype VII, 強毒型)、

表 1 樹立した抗 ND ウイルス Mab (IgG) 産生ハイブリドーマのスクリーニング結果

Mab	IgG サブクラス	エライザ法	細胞エライザ法	IHC
22C483	G1	+	+	+
9H1-11		+	+	—
13C162		+	+	—
13D111		+	+	—
3B8-7		+	—	—
6H101		+	—	NT
2E5-11	G2a	+	+	+
8E9A9		+	+	+
5B9-7		+	+	—
1F439	G2b	+	+	—
22C412		+	—	—
1A103		+	—	NT
19E65		+	—	NT
26A512		+	—	NT

+: 陽性, —: 陰性, NT: 未検査

茨城株 ck/Ibaraki/2000 株 (Genotype VII, 強毒型), 新潟株 pg/Niigata/2007 株 (Genotype IV, 中等毒型), 兵庫株 dk/Hyogo/2002 株 (Genotype I, 弱毒型)⁶⁾ を鶏や発育鶏卵に接種した。ウイルスを接種された鶏および鶏胚の臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン固定し、パラフィン包埋切片を作製した。HE 染色標本の顕微鏡観察で ND ウイルスによる病変を確認した。

5. 作製モノクローナル抗体の評価

複数の ND ウイルス野外分離株 (福岡株, 岡山株, 茨城株, 新潟株, 兵庫株) およびワクチン株 (B1 株, VG/GA 株) を感染させた鶏初代腎臓細胞をホルマリン固定し、蛍光抗体 (FA) 法により 3 つの Mab と各ウイルスとの反応性を評価した。22C483 は全てのウイルス株と良好に反応した (表 2)。他の 2 つの Mab は、新潟株を検出できなかった。全ての抗体で、陽性反応は感染細胞の細胞質に認められた。22C483 による陽性反応は細胞質に顆粒状に検出され、他の 2 つの Mab では細胞質と共に細胞膜が強く発色する傾向があった。

表 2 FA 法による Mab の各 ND ウイルス株への反応性

ND ウイルス	Mab		
	22C483	2E5-11	8E9A9
福岡株	+	+	+
岡山株	+	+	+
茨城株	+	+	+
新潟株	+	—	—
兵庫株	+	+	+
B1 株	+	+	+
VG/GA 株	+	+	+
PBS (陰性対照)	—	—	—

PBS: 燐酸緩衝液, —: 陰性, +: 陽性

IHC での Mab の評価試験として、ウイルス感染モデルや健康な鶏から作製したパラフィン包埋切片を用いた IHC を実施し、腹水化した 3 つの Mab の反応性や最適な染色条件を評価した。IHC では、3 つの Mab の中で 22C483 が最も高感度にウイルス抗原と反応し、組織病変に一致して陽性反応を認めた (表 3, 図 1)。他の 2 つの Mab (2E5-11, 8E9A9) でも陽性反応はみられたが、22C483 で抗原が検出された部位での陽性反応が認められない場合があり、この 2 つの Mab による検出感度はやや低いとみられた。鶏の正常組織への非特異反応として、22C483 の場合、一部の神経細胞核にわずかな非特異反応を認めたが、使用時に高い希釈倍率で用いること

表 3. 作製した Mab と ND ウイルス福岡株感染鶏の病理切片を用いた IHC の条件設定

Mab	前処理	Mab (腹水) の希釈倍率					
		× 200	× 800	× 3,200	× 12,800	× 51,200	× 204,800
22C483	MW	+	+++	+++	+++	+++	+
	E	+	+++	+++	+++	+++	+
	無し	+	+++	+++	+++	+++	+
2E5-11	MW	+	++	+	+	+	+
	E	+	++	+	+	+	-
	無し	+	+	+	+	+	-
8E9A9	MW	+	+	+	+	+	-
	E	+	+	+	+	+	-
	無し	+	+	+	+	-	-

MW：加熱処理，E：酵素処理，反応強度（-：陰性，+：軽度，++：中等度，+++：強度）

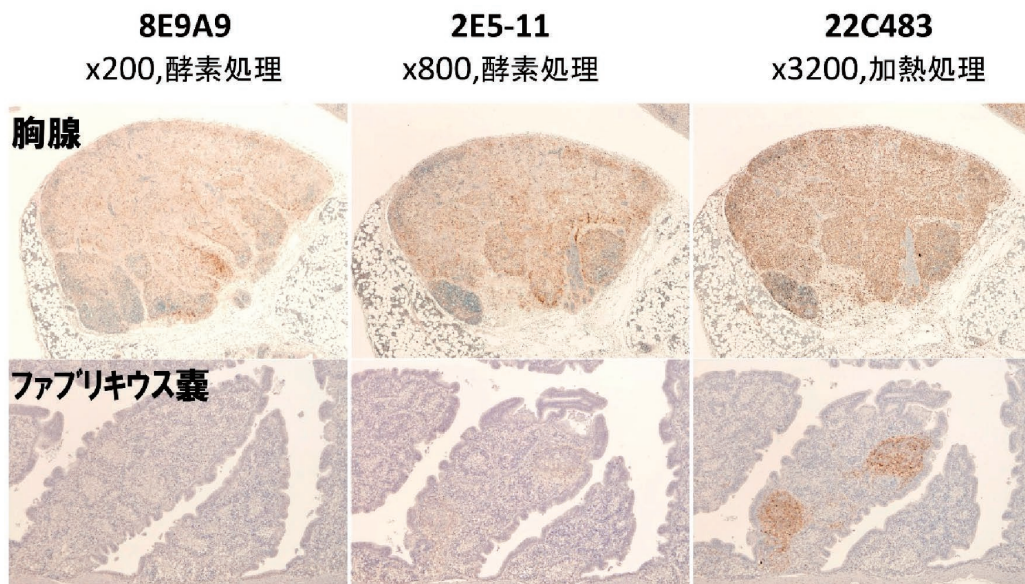


図 1 各 Mab (腹水) の最適染色条件での IHC の比較図

や、ウイルス抗原検出の陽性判定基準を細胞質での陽性像とすることで対応できると考えられた。また、トリパラミクソウイルス 2, 6 型感染動物の病理切片を用いた IHC では、3 つの Mab は反応しなかった。

今後の課題と展望

本研究で、我々は IHC に適用できるマウス抗 ND ウイルス Mab を作製し、ND ウイルスの組織学的検出法を確立することができた。これにより、感染実験等を通じた ND の病態解明研究において、ウイルス学的手法と病理組織学的手法を組み合わせた解析を実施する体制が整った。病理解析は、ウイルスの感染細胞の同定や、臨床症状や肉眼病変が生じる病理発生機構を検討するのに有用な解析手法である。今後は、ND ウイルスを伝播する可能性のある野鳥や家禽などを用いた感染実験を実

施し、ND の病態解明やウイルス排泄機構などに関する知見を収集していく予定である。

近年の野鳥での高病原性鳥インフルエンザの発生を受けて、家禽へ病原体を伝播しうる野鳥への関心が高まっており、野鳥の病性鑑定事例も増加してきている。ND ウイルスは数多くの野鳥種に感染できる。従って、今回作製した抗体は、ND の補助診断や、鳥インフルエンザとの組織学的な鑑別にも利用できるかもしれない。特にホルマリン固定された検査材料しか得られない場合、IHC の実施は有用性が高いと考えられる。ただし、今回樹立した抗体は、強毒型 ND ウイルスのほか、弱毒型ウイルスやワクチン株などにも反応するため、野外症例での検査においては、常に発生状況や他の検査結果と照合することが必要だと考えられる。

謝 辞

本研究は、平成 26 ～ 27 年度農研機構動物衛生研究所
重点強化研究課題として実施された。

引用文献

- 1) Suarez, D. L.: Newcastle diseases, other avian paramyxoviruses, and avian metapneumovirus infections. In: Diseases of poultry. 13th ed. Swayne, D. E. ed. Wiley-Blackwell, Ames, USA. 89-138.(2013).
- 2) Kaleta, E. F., Baldauf, C.: Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Newcastle disease. Alexander, D. J. ed. Kluwer academic publisher, Dordrecht, Netherland. 197-246. (1988).
- 3) Alexander, D. J., Parsons, G., Marshall, R. : Infection of fowls with Newcastle disease virus by food contaminated with pigeon faeces. Vet. Rec. 115(23), 601-602. (1984).
- 4) Heckert, R. A., Collins, M. S., Manvell, R. J., Strong, I., Pearson, J. E., Alexander, D. J. : Comparison of Newcastle disease viruses isolated from cormorants in Canada and the USA in 1975, 1990 and 1992. Can. J. Vet. Res. 60 (1), 50-54. (1996).
- 5) 鴨志田伸吾. 免疫染色至適条件決定法. 学際企画, 東京. (2009).
- 6) Mase, M., Inoue, T., Imada, T. : Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2001 to 2007 in Japan. J. Vet. Med. Sci. 71 (8), 1101-1104. (2009).