

牛の呼吸器疾病の免疫組織化学的診断法の高度化

播谷 亮^{1)*}, 木村久美子¹⁾, 小林秀樹²⁾, 勝田 賢³⁾

(平成18年8月28日 受付)

Improvement of immunohistochemical detection of pathogens caused respiratory diseases of cattle

Makoto HARITANI^{1)*}, Kumiko KIMURA¹⁾, Hideki KOBAYASHI²⁾ & Ken KATSUDA³⁾

牛の肺炎の主要な病原体である牛RSウイルスおよび*Mannheimia haemolytica* (*Pasteurella trehalosi*を含む)の免疫組織化学的検出系の確立を試みた。9種類の抗RSウイルス抗体を使用し牛RSウイルスの免疫組織化学的検出を実施した結果、一つの市販の抗人RSウイルスモノクローナル抗体が牛RSウイルス抗原の検出に使用可能であることが明らかになった。一方、*M. haemolytica* 1~16各血清型菌と各抗血清の免疫組織化学的反応性を検討した結果、*M. haemolytica*と*P. trehalosi*を免疫組織化学的に区別することは可能と考えられた。しかしながら、両菌の各血清型間には交叉反応あるいは非定型的反応が観察された。そこで、抗*M. haemolytica* 1型菌血清をホルマリン固定した他血清型菌で吸収して免疫組織化学的検査に使用したところ、*M. haemolytica* 1型菌の特異的検出が可能となった。

はじめに

家畜の肺炎が現在でも多発し、畜産経営上問題となっている。肺炎の原因を正確に知ることは、疾病予防のために重要である。しかし、肺炎病巣から複数の病原体が分離されることが多く、主たる病原体を特定することは容易ではない。また、抗生物質投与により病原体が分離されないこともある。あるいは、生材料が採材されおらず、病原体の分離が不可能なこともある。このような

場合、免疫組織化学的検査を実施することにより病原体の検出や血清型別が可能となり、また、個々の病原体がどの程度病変形成に関わったかを判定することが可能となる¹⁾。これらの理由から、近年、野外例の肺炎の診断に、免疫組織化学的検査が多用されている。しかしながら、その特異性および抗原賦活化法については、必ずしも十分に検討されていない。

本研究の目的は、牛と豚の肺炎の主要な病原体を特異的に検出することが可能な免疫組織化学の系を構築することにある。本稿では、牛の肺炎の病原体である牛RSウイルスおよび*Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*)の免疫組織化学的検出系確立の試みについて記述する。

試験方法の概要

1. 牛RSVの免疫組織化学的検出系の確立

10%中性緩衝ホルマリン固定された牛RSウイルス病野外感染例の肺のパラフィン切片を陽性対照組織とした。その他、特異性の確認のために、牛アデノウイルス

- 1) 動物衛生研究所感染病研究部 (現細菌寄生虫病研究チーム / 牛病理ユニット)
- 2) 動物衛生研究所疫学研究部 (現疫学研究チーム)
- 3) 動物衛生研究所疫学研究部七戸研究施設 (現常在性疾病研究チーム東北支所)

* Corresponding author; Mailing address: Makoto HARITANI, Bovine Pathology Unit/Reserch Team for Bacterial・Parasitic Diseases, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan
Tel & Fax : +81-29-838-7837
Email: haritani@affrc.go.jp

3型, パラインフルエンザウイルス3型, *M. haemolytica* 血清型1, *Pasteurella multocida*ないし*Histophilus somni*を感染させた牛の肺のホルマリン固定・パラフィン切片も同時に使用した。一次抗体は表1に示した。なお, 抗原賦活化処理は, 表2に示したように, Actinase E, マイクロウェーブないしオートクレーブ処理法により実施した²⁾。免疫染色キットにはSABキット(ニチレイ)を用いた。発色にはAECを, 核染色にはヘマトキシリンを使用した²⁾。

2. *M. haemolytica*の免疫組織化学的検出系の確立

M. haemolytica (*P. trehalosi*を含む)の血清型1~16の濃厚菌液を健康牛から採材した肝臓片に各々注入した後, これらを10%中性緩衝ホルマリン固定, パラフィン包埋, 薄切し, 陽性対照組織とした。これら陽性対照組織と各血清型菌に対する抗血清を用いて免疫組織化学的検査を実施し, 組織中の菌に対する各抗血清の反応性について検討した。さらに, 抗1型血清をホルマリンによ

り不活化した他血清型菌で吸収し, 交叉反応性が減るか否かを検討した。吸収条件は表4に記載した。なお, 抗原賦活化処理は, Actinase E, マイクロウェーブないしオートクレーブ処理法により実施した²⁾。免疫染色キットにはSABキット(ニチレイ)を用いた。発色にはAECを, 核染色にはヘマトキシリンを使用した²⁾。

成績の概要

1. 牛RSVの免疫組織化学的検出系の確立

牛RSウイルス感染組織について9種類の抗体を使用して免疫組織化学的検査を実施したところ, Mouse anti human RSV 18B2 (ARGENE)のみが反応を示した(表1)。この抗体を使用し, 抗原賦活化法について検討したところ, Actinase E処理およびオートクレーブ処理した組織切片で弱陽性反応が, マイクロウェーブ処理した組織切片で強陽性反応が観察された(表2)。マイクロウェーブ処理には, 蒸留水, クエン酸緩衝液(pH 6), およびAntigen demasking reagent (Biomed corp.)を使

表1 牛RSウイルスの免疫組織化学的検出に使用した一次抗体とそれらの反応性

抗体	反応
Rabbit anti bovine RSV No. 50 (NIAH)	- ^{a)}
Rabbit anti bovine RSV No.77 (NIAH)	-
Rabbit anti bovine RSV No.78 (NIAH)	-
Rabbit anti bovine RSV (Denka Seiken)	-
Goat anti bovine RSV (VMRD)	-
Mouse anti bovine RSV (BOX)	-
Biotinylated goat anti human RSV (ViroStat)	-
Mouse anti human RSV B581 (CHEMICON)	-
Mouse anti human RSV 18B2 (ARGENE)	+

a) - : 陰性反応, + : 陽性反応, 抗原賦活化は蛋白分解酵素法, マイクロウェーブ法およびオートクレーブ法により実施(表2参照)

表2 牛RSウイルスの免疫組織化学的検出のための抗原賦活化処理法についての検討結果

処理方法	用いた試薬	処理時間と反応 ^{a)}		
		5分間	20分間	80分間
蛋白分解酵素(37)	0.1% Actinase E	+	+	-
		15分間	30分間	60分間
オートクレーブ(121)	蒸留水	-	-	+
	0.01Mクエン酸水(pH 6)	+	+	+
マイクロウェーブ	蒸留水	++	+++	+++
	0.01Mクエン酸水(pH 6)	+	++	++
	Antigen demasking reagent ^{b)}	++	++	++

a) - : 陰性反応, + : 弱陽性反応, ++ : 中等度陽性反応, +++ : 強陽性反応

b) Biomed corp.

用したが、反応は蒸留水を使用した場合に最も明瞭であった。反応形態については、多核巨細胞、細気管支および肺胞上皮細胞の細胞膜に特に強い陽性反応が観察された(図1A, B)。

特異性について検討した結果、牛RSウイルス感染肺以外では陽性反応は認められなかった。

2. *M. haemolytica* の免疫組織化学的検出系の確立

表3に*M. haemolytica*各血清型菌と各抗血清の免疫組織化学的反応性を示した。*M. haemolytica*と*Pasteurella trehalosi* (*P. trehalosi*) を免疫組織化学的に区別すること

は概ね可能と考えられたが、各々の血清型菌をこの系で型別することは不可能であった。

そこで、各抗血清をホルマリンにより不活化した他血清型菌で吸収した後、反応性を検討した。その結果、表4に示したように、吸収操作後の抗*M. haemolytica*血清型1菌血清は、吸収操作の方法に関わらず、血清型1菌のみ反応した。

考 察

今日、免疫組織化学的検査法は、病理学的検査法の中でも最も重要な検査法の一つと考えられており、感染症

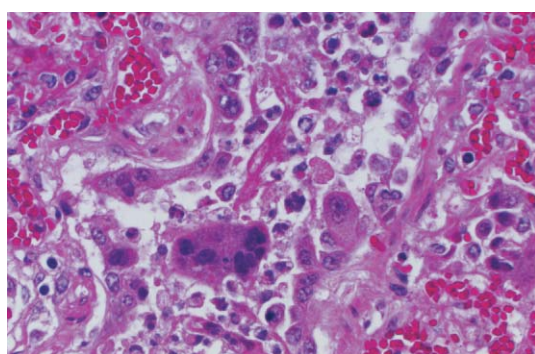


図1A 牛RSウイルス野外感染例の肺。細気管支における多核巨細胞形成。HE染色, ×400。

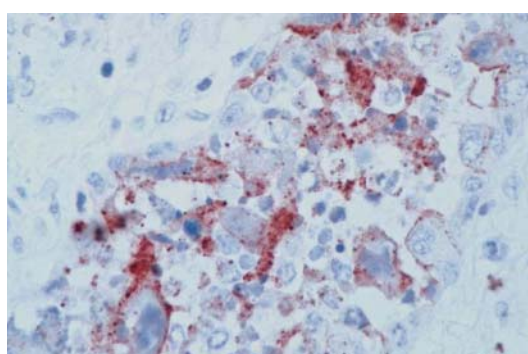


図1B 図1Aと同一症例の肺。多核巨細胞および細気管支上皮細胞の管腔側細胞膜におけるRSウイルス抗原強陽性反応。免疫染色, ×400。

表3 各血清型の*Mannheimia haemolytica* (Mh) および*Pasteurella trehalosi* (Pt) の各抗血清に対する免疫組織化学的反応性^{a)}

組織切片中の菌	抗血清の型															
	Mh 1	Mh 2	Pt 3	Pt 4	Mh 5	Mh 6	Mh 7	Mh 8	Mh 9	Pt 10	Mh 11	Mh 12	Mh 13	Mh 14	Pt 15	Mh 16
Mh 1	+++	+++	-	+	+++	+++	++	++	++	-	-	+++	-	+++	-	+++
Mh 2	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pt 3	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	++
Pt 4	-	+++	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	++
Mh 5	+++	+++	-	+	+++	+++	++	-	+	-	-	++	-	+++	-	+++
Mh 6	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	-	+++	-	+++
Mh 7	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	-	+++	-	+++
Mh 8	+++	++	-	+	+++	+++	++	+++	+	-	-	+++	-	+++	-	+++
Mh 9	++	+++	-	+	+	++	+	+	+++	-	-	+	-	-	-	++
Pt 10	-	+++	+	+++	-	-	+	-	+	+++	-	-	-	-	++	++
Mh 11	-	+++	-	++	-	-	-	-	-	+	+++	-	+	-	-	+
Mh 12	+++	+++	-	++	+++	+++	++	++	++	-	-	+++	-	+++	-	+++
Mh 13	++	++	-	+	++	++	++	-	+	++	-	++	++	-	-	+
Mh 14	+++	-	-	-	++	++	++	++	-	-	-	++	-	+++	-	++
Pt 15	-	+++	++	+++	+	+	+	-	+	++	-	+	-	-	+++	-
Mh 16	+++	++	-	-	++	++	+	++	-	-	-	++	-	++	-	+++

a) - : 陰性反応, + : 弱陽性反応, ++ : 中等度陽性反応, +++ : 強陽性反応, 抗原賦活化はマイクロウェーブ法により実施

表4 吸収操作後の抗*M. haemolytica*血清型1血清を使用した免疫組織化学的検査結果

菌株	血清型	抗 <i>M. haemolytica</i> 1型菌血清の吸収条件と反応性 ^{a)}						
		37 30分間	37 1時間	37 2時間	37 3時間	37 一晚	4 一晚	未処理
M.h	1	++	++	++	++	++	++	+++
M.h	2	-	-	-	-	-	-	-
Pt	3	-	-	-	-	-	-	-
Pt	4	-	-	-	-	-	-	-
M.h	5	-	-	-	-	-	-	+++
M.h	6	-	-	-	-	-	-	+++
M.h	7	-	-	-	-	-	-	+++
M.h	8	-	-	-	-	-	-	+++
M.h	9	-	-	-	-	-	-	+
Pt	10	-	-	-	-	-	-	-
M.h	11	-	-	-	-	-	-	-
M.h	12	-	-	-	-	-	-	+++
M.h	13	-	-	-	-	-	-	++
M.h	14	-	-	-	-	-	-	+++
Pt	15	-	-	-	-	-	-	+
M.h	16	-	-	-	-	-	-	+++

a) - : 陰性反応, + : 弱陽性反応, ++ : 中等度陽性反応, +++ : 強陽性反応, 抗原賦活化はマイクロウェーブ法により実施

の診断および研究にも多用されている¹⁾。免疫組織化学的検査で最も重要なことは、抗体の特異性の確認と抗原賦活化法の選択にある。しかしながら、これら基礎的事項に関する検討が必ずしも十分でなかったかもしれない。このことは著者自身の反省点でもあり、これら無しには感染症の診断および研究への免疫組織化学的検査法の応用は有り得ない。そこで、今回は、牛の肺炎の病原体の中で最も重要とされる牛RSウイルスと*M. haemolytica*の免疫組織化学的検出法について慎重に検討した。

1. 牛RSVの免疫組織化学的検出系の確立

9種類の抗体と3種類の抗原賦活化法(表2)を使用し、牛RSウイルスの免疫組織化学的検出系の確立を試みた。その結果、マイクロウェーブ処理による抗原賦活化処理後、Mouse anti human RSV 18B2 (ARGENE)を使用しSAB法により免疫組織化学的検査を実施することにより、牛RSウイルス抗原を特異的かつ明瞭に検出可能であることが明らかになった。今後、この方法は、牛RSウイルス感染症の診断および研究に利用可能である。なお、本抗体は全ての型の牛RSウイルスと反応するとされるが²⁾、さらに症例数を増やして確認したい。また、今回はデータとして示していないが、CSA (Catalyzed signal amplification) 法のような超高感度な免疫組織化学的検

出系を使用した場合、パラインフルエンザウイルス3型に対する交叉反応あるいは非定型的反応が出現する可能性があるため、この点についても検索を進めたい。

ウイルス抗原陽性反応は、感染細胞の細胞膜で特に強く、細胞質では微弱であった。また、細胞質内封入体では、陽性反応はみられなかった。このことは、既に報告されているように、この抗体がRSウイルスの融合蛋白質に対するものであることによる。融合蛋白質は、粗面小胞体で合成され、速やかに細胞膜に移動するようである。

2. *M. haemolytica*の免疫組織化学的検出系の確立

*M. haemolytica*各血清型菌と各抗血清の免疫組織化学的反応性を検討した結果、*M. haemolytica*と*P. trehalosi*を免疫組織化学的に区別することは概ね可能と考えられた。しかしながら、かつて菌の塗抹標本で確認し、その結果から予期していたよりも³⁾、さらに高頻度に交叉反応あるいは非定型的反応が観察された。それ故、この系を、*M. haemolytica*および*P. trehalosi*の診断および研究に使用することは不可能と考えられた。

そこで、吸収血清の使用を検討したところ、*M. haemolytica*血清型1菌については、特異的検出が可能であることが明らかになった。他血清型菌については検討が不十分であるため、特異的検出系を構築すべく今後さ

らに努力したい。

成果の取り扱い

- 1) 播谷ら：牛RSウイルス抗原の免疫組織化学的検出のための条件検討，第133回日本獣医学会（2002）。

引用文献

- 1) 堤 寛：感染症病理アトラス（2000）
- 2) Haritani, M. *et al.* : Effects of antigen-retrieval pretreatments for immunohistochemical detection of Akabane viral antigen. J. Vet. Diagn. Invest., 12, 361-363 (2000).
- 3) Haines, D. M. *et al.* : The detection of bovine respiratory syncytial virus in formalin fixed bovine lung with commercially available monoclonal antibodies and avidin biotin complex immunohistochemistry. Can. J. Vet. Res. , 53 , 366-268 (1989).
- 4) Haritani, M. *et al.* : Immunoperoxidase evaluation of the relationship between necrotic lesions and causative bacteria in lungs of calves with naturally acquired pneumonia. Am. J. Vet. Res., 51, 1975-1979 (1990).

Summary

Improvement of immunohistochemical detection of pathogens caused respiratory diseases of cattle

Makoto HARITANI, Kumiko KIMURA, Hideki KOBAYASHI & Ken KATSUDA

We carried out immunohistochemical detection of bovine respiratory syncytial virus and *Mannheimia haemolytica* (including *Pasteurella trehalosi*), both of which have been considered to be the most important pathogens of bovine pneumonia. As a result of immunohistochemical examinations using 9 anti-RS virus antibodies, one of the purchased antibodies against human RS virus was confirmed to be useful for the detection of bovine RS virus antigen. When each antiserum against *M. haemolytica* serovar 1-16 was used for the immunohistochemical detection, it was demonstrated that *M. haemolytica* and *P. trehalosi* could be differentiated by the technique. There were, however, cross-reactions and/or atypical reactions among bacteria in both species. Next, anti-*M. haemolytica* serovar 1 absorbed with formalin-fixed bacteria that belongs to serovar 2-16 was applied on the tissues with each serovar, and it was confirmed that the absorbed antiserum could be used for specific detection of *M. haemolytica* serovar 1.