

モノクローナル抗体を用いたニパウイルス感染症の免疫組織化学的診断法

疫学研究部 病性鑑定室

谷村 信彦

TANIMURA, Nobuhiko

私は2003年4月7日から7月6日まで3ヶ月間マレーシア国イポー市に滞在し、国際協力機構(JICA)とマレーシア獣医学研究所(VRI)が実施するニパウイルス研究協力プロジェクト(2001年10月~2004年9月)に参加した。本プロジェクトはニパウイルスの診断技術および疫学調査の改良を目標としており、今田専門家がモノクローナル抗体作製・性状解析、コウモリの疫学調査、柏崎専門家が競合酵素抗体法開発をVRIのスタッフと共に担当した。本稿では、始めにニパウイルスの発生経過、次に共同研究で私が担当したニパウイルス抗原の免疫組織化学的検出法の改良に関する成果を紹介する。

1. マレーシアにおけるニパウイルス感染症の概要

1998年9月以降ペラ州イポーの養豚場付近で発生した人のニパウイルス感染症(当初は日本脳炎が疑われた)は感染豚の移動によって南方のネグリ・スンプラン州など各地の養豚場周辺に広がり、1999年6月までに265名以上の脳炎患者が報告され、105名が死亡した。人の症状は脳炎が主体で、発熱、頭痛、筋痛、嗜眠、見当識障害を示し昏睡に陥ったが、一部は肺の障害も示した。感染者の大半は生きた豚と直接接触した養豚場従事者であった。またマレーシアからシンガポールに輸出された豚を処理した屠畜場でも1999年に11名の患者(1名死亡)が報告された。マレーシア大学のChuaらによって脳炎患者の脳脊髄液から合胞体形成能を持つパラミキソウイルス科の新しいウイルスが分離され、後にニパウイルスと命名された。本ウイルスは米国疾病管理予防センター(CDC)で解析され、1994年オーストラリアで出現したヘンドラウイルスと性状が類似していることが判明し、両者はヘニパウイルス属に分類された。マレーシアでは対策として発生養豚場の閉鎖、感染が疑われる豚約110万頭の殺処分、全国サーベイランスが実施され、本病は漸く終息した。

豚において本病は伝染性が強く、全ての月齢で発熱、呼吸障害、時折神経症状を示し、成豚は時折甚

急性に死亡した。ウイルスは主に豚の呼吸器を介して伝播し、同居実験で感染が成立する。遡り調査によって、ニパウイルスは1996年後半からマレーシアで豚に病気を起こしていたと示唆されたが、本病の症状が従来から流行していた豚病の症状と比べて顕著な相違がなく、発症や死亡が高率でなかったため、新しい症候群と直ちに認識されなかった。しかし、野外発症豚では既知の豚病には出現しない好酸性細胞質内封入体と合胞体の形成を特徴とする気管支肺炎や髄膜炎、諸臓器の血管内皮細胞に合胞体形成が認められることが判明した。これは日常の病性鑑定において病理組織検査が新興感染症の出現を知るために重要であることを示している。疫学調査の結果、ニパウイルスの保有宿主と考えられているオオコウモリ(フルーツコウモリ)が尿などを介してウイルスを豚に伝播し、豚はウイルスの増幅宿主となり、感染豚に接触した人や発生養豚場付近の犬、猫、馬などに伝播したと推察されている。ニパウイルス出現の要因として、コウモリ生息地への養豚場の進出、異常気象や森林伐採などによるコウモリの生態の変化などが推測されている。しかし、ニパウイルスがどのようにして野生動物の中で維持され、突如として家畜や人に伝播するのかが不明であり、ウイルス保有宿主の生態の解明は今後に残された重要な課題となっている。

2. ニパウイルスに特異的な免疫組織化学的検出法の検討

免疫組織化学(Immunohistochemistry:IHC)は病原体と組織病変を関連付けて感染症の診断を確定するために必須の技術である。また、ニパウイルス感染症の診断法の中で、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織を用いるIHCは、危険な感染性ウイルスを使用しない安全なウイルス抗原検出法として薦められる。従来、ニパウイルス感染症のIHCはポリクローナル抗体が用いられてきた。オーストラリアのHooperらはヘンドラおよびニパウイルスに対するウサギポリクローナル抗体を用いたIHCにより、ニパウイルスの豚と猫における感染増殖機構を報告し



図1A:ニパウイルス感染子豚の肺
(ホルマリン固定後)。気管支の閉塞、
肺小葉のうっ血、硬化。

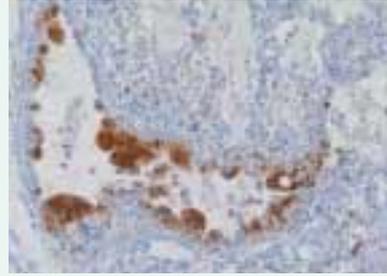


図1B:11F6を用いた免疫組織化学染色。
細気管支上皮の合胞体にウイルス抗原が
検出されている。



図2A:ニパウイルス感染子豚の腎臓
(ホルマリン固定後)。皮質に点状出血。



図2B:尿細管上皮と間質の静脈内皮に
ウイルス抗原が検出されている。

た。また、マレーシアのWongらはニパウイルス脳炎で死亡した患者の剖検材料をポリクローナル抗体で検査し、血管内皮感染による多臓器の血管炎と中枢神経の炎症および壊死が主要な病理学的変化であると報告した。しかし、ニパウイルスはヘンドラウイルスと共通抗原を有し、両ウイルスとも血管と神経に親和性があるため類症鑑別が必要となる。

私たちはまずニパウイルス抗原に特異的な免疫組織化学的検出法を確立するために、ニパウイルス実験感染豚およびヘンドラウイルス実験感染馬のホルマリン固定、パラフィン包埋肺組織(オーストラリア家畜衛生研究所提供)を用いて、野外豚の肺から分離されたニパウイルスをマウスに免疫して作製したモノクローナル抗体(Imada et al. J. Vet. Med. Sci. 2004. 66:81-83)の反応性を検査した。組織中の抗原性を賦活化するため、組織切片の加熱または蛋白分解酵素処理が必要であった。検査に供した7クローン中1クローン(11E11)は特異的な中和活性を持つが、パラフィン切片の抗原には反応しなかった。4クローン(12A5、12D7、13C4、18C4)はニパおよびヘンドラウイルスの両抗原に陽性反応を示したが、2クローン(11F6、13A5)はニパウイルス抗原のみに陽性反応を示した。従って、これらのニパウイルス特異的モノクローナル抗体は動物のニパウイルス感染症の免疫組織化学的診断や発病機構の解明に有用である(Tanimura et al. J. Vet. Med. Sci. 2004. 66: 1263-1266)。

さらに上記の抗ニパウイルスモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体の免疫組織化学的診断における有用性を調査する目的で、マレーシアのニパウイルス自然感染豚(VRI提供)のホルマリン固定、パラフィン包埋組織を用いて反応性を検査した。1999年発生時に採取された豚の組織(図1A、2A)は10%中性緩衝ホルマリン液に約4年間漬けられていたが、2クローン(11F6、12A5)が強陽性反応を示した。その他のクローンとポリクローナル抗体は組織のホルマリン長期固定によって反応性が著しく減弱していた。ニパウイルス特異的なモノクローナル抗体11F6を用いてニパウイルス自然感染豚の臓器内のウイルス抗原を検出した結果、ニパウイルスが呼吸器上皮(図1B)、腎臓系球体および尿細管上皮(図2B)、諸臓器の血管内皮と平滑筋、髄膜クモ膜細胞に親和性を持つことが確認された。また、ウイルス抗原は喉頭粘膜上皮、脾臓末梢神経束シュワン細胞や心臓房室弁内皮でも新たに検出された。以上の結果から、モノクローナル抗体11F6および12A5は、ホルマリン長期固定後のパラフィン包埋動物組織中のニパウイルス抗原検出に利用可能であることが示された(Tanimura et al. J. Comp. Pathol. 2004. 131:199-206)。

今回の研究協力で得られた成果は、動物のニパウイルス感染症の診断のみならず野生動物におけるニパウイルスの動態解明やニパウイルス感染モデル動物の発病機構解明、ウイルスの神経細胞や血管に対する親和性に関する研究などに活用していきたい。