抗ワクシニアウイルス単クローン抗体のサル痘ウイルスに対する 反応性とその有用性

¹⁾ 兵庫県立大学環境人間学部, ²⁾ 国立感染症研究所ウイルス第一部, ³⁾ 堺市衛生研究所

北元 憲利¹⁾ 森川 茂²⁾ 西條 政幸²⁾
加藤 陽二¹⁾ 田中 智之³⁾

(平成 19 年 11 月 14 日受付)

(平成 20 年 2 月 20 日受理)

Key words: monkey pox virus, monoclonal antibody, cross-reactivity

序 文

ボックスウイルス科, オルソボックス属には, 痘瘡(天然痘)ウイルスのほか, 痘瘡の予防接種(種痘)に使用されていたワクシニアウイルス(vaccinia virus, VV), 牛痘ウイルス(cowpox virus, CPV), マウス痘ウイルス(ectromelia virus, EV)などが知られている。痘瘡ウイルスは, バイオテロリズムの対象病原体となり注意が喚起されている。また, 類似の疾患を引き起こすサル痘ウイルス(monkey pox virus, MPV)感染症の非流行地での発症が注目された¹⁾。われわれは, ワクシニアウイルスを用いて, オルソボックスウイルス属に特異的に交差する単クローン抗体を樹立し, 痘瘡ウイルスの蛍光抗体法による迅速・簡便, 特異的な検出法の可能性を検討してきた²⁾。危機管理という面から, これらの疾患の診断法を確立しておく必要がある。今回はその一貫として, ワクシニアウイルスに対する単クローン抗体がサル痘ウイルス感染細胞に対して交差反応するか, また, 実際の診断に応用できるのかどうか, ワクシニアウイルス感染マウスの病巣材料を用いてモデル実験を行った。

材料と方法

MPV として Zr599 株および Liberia 株³⁾を, VV として Ikeda 株および Lister 株²⁾を用いた。ウイルスは Vero E6 細胞に感染させ, 24 時間後, 不活化するため UV 照射下にて 2 時間風乾し, 冷アセトンで 10 分間固定後, 抗原スライド標本とした。これらのウイルスおよび感染細胞は, 国立感染症研究所病原体等安全管理規定に基づき, 同施設の BSL2 実験室の安全キャビネット内で取り扱った。一方, 単クローン抗体とし

て, VV Ikeda 株に対する VII4 抗体および VV Lister 株に対する VL10 抗体を用いた²⁾。両者とも, VV, CPV, EV 感染細胞に対し交差反応を示す抗体である。得た単クローン抗体に FITC を標識して蛍光抗体直接法に用いた²⁾。モデル実験として, Balb/c マウスを用いた。VV (Lister 株, 2.0×10^6 PFU/mL) 0.5 mL または CPV (LB red 株, 1.2×10^5 PFU/mL) 0.5 mL をマウスの皮下数箇所接種した。2~5 日後, 皮膚に点状の紅斑あるいは膿疱を形成したマウスの病巣をスライドガラスに塗抹し, 冷アセトンあるいは冷エタノールで固定して反応に用いた²⁾。

成 績

VII4 抗体は, MPX Zr599 株 (Fig. 1a) および Liberia 株 (Fig. 1b) 感染細胞において陽性反応を示した。同様に VL10 抗体は, MPX Zr599 株 (Fig. 1e) および Liberia 株 (Fig. 1f) 感染細胞において陽性反応を示した。一方, 両抗体は, VV 感染マウスの膿疱病巣部の塗抹感染細胞と反応することがわかった (Fig. 1c および g)。データは示していないが, CPV 感染マウスの塗抹標本においても同様の結果を示した。また, 両抗体は, VV Lister 株感染細胞には反応するが (Fig. 1d), 非感染細胞とは反応しなかった (Fig. 1h)。

考 察

実際に痘瘡ウイルスを用いた実験はできないため, オルソボックス属株間に広く交差反応を示す抗体を作製し診断法の開発を検討してきた。今回, さらにサル痘ウイルスにも反応性を示すことがわかった。さらに詳しい解析が必要であるが, VL10 抗体は, 認識する蛋白サイズなどから, おそらく L1R 蛋白⁴⁾を, また, VII4 抗体は, コア蛋白の 4b (A3L 蛋白)⁵⁾あるいは 4a (A10L 蛋白)⁶⁾を認識したものと考えられる。特に,

別刷請求先: (〒670-0092) 姫路市新在家本町 1 丁目 1-12
兵庫県立大学環境人間学部 北元 憲利

Fig 1. Direct immunofluorescence test after staining of monkey poxvirus (MPV)- or vaccinia virus (VV)-infected cells with FITC-conjugated monoclonal antibodies (MAb). MAb: (a-d) VII4; (e-h) VL10. Infected cells: (a, e) MPV Zr599 strain-infected Vero E6 cells; (b, f) MPV Liberia strain-infected Vero E6 cells; (c, g) VV Lister strain-infected mouse tissues; (d) VV Lister strain-infected Vero E6 cells; (h) uninfected Vero E6 cells as control.

A3L 蛋白および A10L 蛋白は、痘瘡ウイルスおよびサル痘ウイルスの間で 97%~99% のホモロジーがあることから、痘瘡ウイルスにも充分反応するものと考えられる。

FITC 標識抗体を使用した蛍光抗体法直接法は、蛍光顕微鏡が必要であり、また、PCR 法や電子顕微鏡による検出法と比べると感度の点でやや劣るが、煩雑な操作は必要なく、迅速・簡便、安価そして多検体検出することができる。病巣部を塗抹後、UV 照射およびアセトン固定をするだけで済み、全過程を合わせても 1 時間以内で診断することが可能である。現在、全国の地方衛生研究所に抗ワクシニア標識抗体およびアセトン固定塗抹標本のキットを密閉送付し、痘瘡発症を想定したシュミレーションと模擬テストを試みている。ウイルス感染細胞および感染動物病巣塗抹の不活化・固定までの前処理操作は、いずれも国立感染症研究所病原体等安全管理規定を参考に P3 レベル以上の設備内で行っている。

文 献

- 1) Di Giulio DB, Eckburg PB : Human monkey-pox : an emerging zoonosis. *Lancet Infect Dis* 2004 ; 4 : 15—25.
- 2) Kitamoto N, Kobayashi T, Kato Y, Wakamiya N,

Ikuta K, Tanaka T, *et al.* : Preparation of monoclonal antibodies cross-reactive with Orthopoxviruses and their application for direct immunofluorescence test. *Microbiol Immunol* 2005 ; 49 : 219—25.

- 3) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, *et al.* : LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *J Virol* 2006 ; 80 : 5179—88.
- 4) Ravanella MP, Hruby DE : Characterization of the vaccinia virus LIR myristylprotein as a component of the intra-cellular virion envelope. *J Gen Virol* 1994 ; 75 : 1479—83.
- 5) VanSlyke JK, Franke CA, Hruby DE : Proteolytic maturation of vaccinia virus core proteins : identification of a conserved motif at the N termini of the 4b and 25K virion proteins. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 411—6.
- 6) Van Meir E, Wittek R : Fine structure of the vaccinia virus gene encoding the precursor of the major core protein 4a. *Arch Virol* 1988 ; 102 : 19—27.

Anti-vaccinia Monoclonal Antibodies Cross-reactive with Monkey Pox Virus and Their Application

Noritoshi KITAMOTO¹⁾, Shigeru MORIKAWA²⁾, Masayuki SAIJO²⁾, Yoji KATO¹⁾ & Tomoyuki TANAKA³⁾

¹⁾School of Human Science and Environment, University of Hyogo,

²⁾National Institute of Infectious diseases, ³⁾Sakai City Institute of Public Health

[J.J.A. Inf. D. 82 : 224~225, 2008]