

アデノウイルス検索法としての蛍光抗体法とその問題点

——カニクイサルによるアデノ2型ウイルス感染実験から——

京都大学医学部外科学教室第2講座（主任：木村忠司教授）

児玉 宏 正木直也 堀越雄二郎 戸部隆吉

京都大学ウイルス研究所

浜 田 忠 弥

日本大学病理学教室

浜 島 義 博

〔原稿受付：昭和46年6月10日〕

Immunofluorescent Examination for Adenovirus Infection

HIROSHI KODAMA* NAOYA MASAKI* YUJIRO HORIKOSHI*
TAKAYOSHI TOBE* CHUYA HAMADA**
YOSHIHIRO HAMASHIMA***

*The 2nd Surgical Department, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. CHUJI KIMURA)

**Institute for Virus Research, Kyoto University

***Department of Pathology, Nihon University School of Medicine

In order to elucidate the pathological aspects of infection with Adenovirus in experimental animals, and in order to investigate the specificity of the immunofluorescent antibody technique as a demonstration of Adenovirus infection, healthy cynomolgus monkeys were inoculated orally through a polyethylene stomach tube or intravenously with 10^9 TCD₅₀ of human Adenovirus (Type 2) and then sacrificed at regular intervals. The virus in the tissues and organs of monkeys was examined by indirect immunofluorescent antibody technique with parallel histopathologic observation and by virus isolation from tissue homogenates with KB cells.

Indirect-immunofluorescent antibody technique can demonstrate specific Adenovirus antigen in tissues and organs of infected monkeys. Problems of the technique especially about the non-specific staining are also discussed,

目次

緒言
 実験方法および実験材料
 1. 実験動物
 2. 感染材料
 3. 感染方法
 4. 検索方法
 a. 螢光抗体法染色
 b. ウイルス分離
 実験結果
 a. 螢光抗体法所見
 b. ウイルス分離成績
 考按
 結語

緒言

1961年、Ross が小児腸重積症の腸間膜リンパ節、糞便、咽頭ぬぐい液よりアデノウイルスを分離し、さらに術後に血清補体結合抗体価が上昇することを報告して以来、Gardner³⁾、Putten⁴⁾、Bell⁶⁾、White⁷⁾、らが同様の報告をし、今や乳幼児腸重積症の原因として、腹部内臓外科分野におけるアデノウイルス感染症が注目されるに至っている。

われわれもまた、虫垂炎、腸重積症、腸間膜リンパ節炎、限局性回腸炎等の原因あるいは Trigger としてのウイルス感染に注目し、今まで感染実験および臨床例の検討を重ね、数多くの報告⁸⁾、⁹⁾、¹⁰⁾、¹¹⁾、¹²⁾ をして来たが、このたびは、アデノウイルスの感染実験を行い多くの知見を得ている。本稿は、その実験に際しウイルス検索法の一つとして用いている螢光抗体法の有用性とその問題点について検討してみたものである。

実験材料および実験方法

1. 実験動物

日本モンキーセンターより直送された、体重 2.0～2.3 kg の成熟カニクイザルで、実験にさきだち、使用アデノウイルスに対する血清中和抗体法を測定し、いずれも使用アデノウイルスに感染していないことを確認したものである。

2. 感染材料

小児腸積症のさい分離されたアデノウイルスのうち、文献上一番多く報告されている 2 型を用いることとし、京都大学ウイルス研究所保存のアデノウイルス 2 型 (AD-6 株) を組織培養下の KB 細胞によって

増殖させたものを使用した。

3. 感染方法

経口接種および静脈内接種を行った。経口接種にはポリエチレンチューブを胃内に挿入して上記ウイルス液 10^9 TCD₅₀ 相当を注入し、静脈内接種には、同じく 10^9 TCD₅₀ を大腿静脈に注射した。

4. 検索方法

a. 螢光抗体法

抗血清作成：1 次抗血清は、前記ウイルス液 10^8 TCD₅₀ 相当を Freund の incomplete Adjuvant と充分混和したのち、正常家兎の筋肉内に、週 2 回ずつ計 8 回注射し、最後に booster としてウイルスのみを注射、2 週間後に採血したもので、アデノウイルス 2 型に対して 1024 倍の中和抗体価を示すものである。2 次抗血清は、抗家兎 γ グロブリン-山羊グロブリンを FITC でラベルしたもので、その蛋白対色素結合モル比は 1.25 である。

検索材料：末梢血塗沫標本と臓器切片について検索した。すなわち血液塗沫標本は接種後連日作成し、4℃、95%エタノールで 30 分間固定したのち -20℃ に保存、48 時間以内に染色した。一方屠殺は接種後 5 日毎におこない、25 にわたる臓器を採取し、4℃、95%エタノールで 24 時間固定し、ついで 4℃ 無水エタノールで 48 時間脱水し、キシロールを通したのち、56℃パラフィンで 15 分以内に包埋し、切片作成後は 24 時間以内に染色した。

染色方法：Coons-浜島¹³⁾ による間接法を用いた。

抗血清は、あらかじめ正常カニクイザル肝臓のアセトン抽出粉末で十分に吸収し、1 次抗血清は 8 倍、2 次抗血清は 2 倍に希釈して使用した。なお反応条件は、1 次、2 次反応ともに 37℃、2 時間とした。

一方、コントロールとして、非感染ザルの各臓器および末梢血塗沫標本を染色するとともに、感染群については、正常家兎血清および同様に作成した抗アデノ 12 型家兎血清、抗コクサッキー B₅ 型家兎血清を 1 次血清として用いて染色した。

b. ウイルス分離

ウイルス接種後連日、血液、糞便、咽頭ぬぐい液を採取し、一方屠殺時には螢光抗体法検索と同様、25 におよぶ各臓器を採取して、これらのホモゲネートを乳鉢による細胞磨砕および凍結融解により作成し、その上清を、組織培養下の人胎児腎細胞に接種、適時継代を重ね、30 日間観察を行い、アデノウイルスに典型的な細胞変性の生じたものを陽性とした。

実験結果

a. 蛍光抗体法所見

経口接種群では、全標本ともにアデノウイルス抗原の存在を示すような特異蛍光は全く認められなかった。

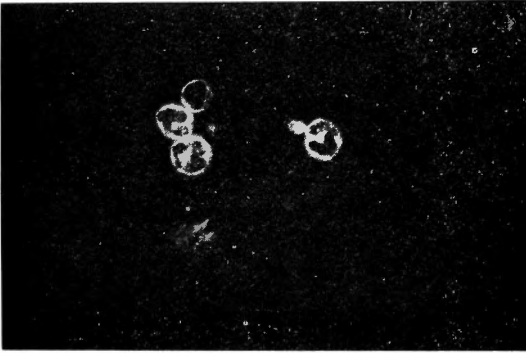


図1 ウイルス血症の時期における末梢血中の多核白血球。細胞質内に特異蛍光を証明する。

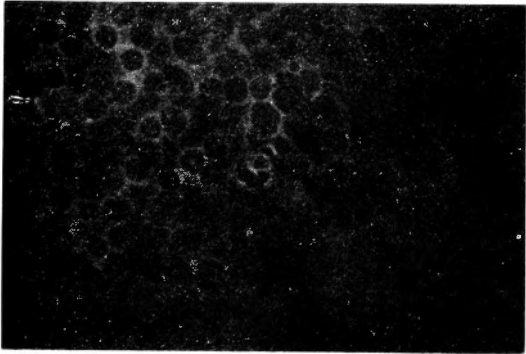


図2 非感染猿の末梢血塗抹標本。中央にみられる多核白血球に特異蛍光を認めない。

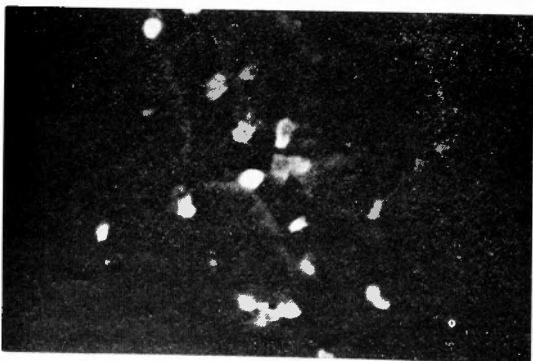


図3 静脈内接種9日後の回腸。アデノウイルス抗原をもったリンパ球様細胞が腸管上皮を経て、腸管腔内に剥落してゆくのが見られる。

静脈内接種群では、接種2日後より6日後までの末梢血塗抹標本で、多核白血球細胞質にはっきりした蛍光が証明される。(図1)。一方、非感染ザルの場合には全く光らない。(図2)。臓器切片では、感染初期にはわずかに腸管粘膜固有層のリンパ球様円形細胞に特異蛍光を散見するのみであるが、接種9日後の腸管では、粘膜固有層に著明な蛍光を有する多くのリンパ球様円形細胞の浸潤を認め、特に回腸では、これらが粘膜上皮を経て腸管腔内に脱落してゆくのがはっきりと認められる。(図3)。なお、この時期には、後述するように糞便からアデノウイルスが分離される。腸管以外の臓器では、わずかに肺の気管支の杯細胞に特異蛍光を認めるにすぎない。

対照染色では、正常家兎血清および全く同様にして作成した抗アデノ12型家兎血清、抗コクサッキー B₅型家兎血清を1次血清として染色したものでは、全標本とも全く特異蛍光を認めなかった。一方、非接種ザルの臓器切片染色で、空腸の Lieberkühn 氏腺細胞内に顆粒状の一見、特異的と思われる蛍光を認めたものがあつたが、抗血清を正常カニクイザルの腸管粘膜のアセトン抽出粉末で吸収したのち使用したところ、この蛍光は消失した。なおこのほかの臓器には全く蛍光を認めなかった。

b. ウイルス分離成績

経口接種群では、いずれの検体からもアデノウイルスは分離されなかった。一方、静脈内接種群では、2～4日後の末梢血、2～6日後の糞便、臓器では十二指腸、空腸、回腸、盲腸、肝臓、心臓等から分離され、これらは殆んど蛍光抗体法所見とよく一致している。

考 按

Coons^{14), 15)} が Mumps ウイルスの証明に蛍光抗体法を使用して以来、細胞内ウイルスの検索に蛍光抗体法が広く用いられるようになり、臨床的には、ウイルス感染症の早期診断への応用の報告も^{16), 17), 18), 19), 20), 21)} 数多く見られる。アデノウイルスについても、組織培養細胞内における増殖過程や感染相などの観察の報告^{22), 23), 24), 25)} は散見されるが、臨床例に蛍光抗体法を用いてアデノウイルス抗原の組織内の所在を明らかにしたものは、小児虫垂炎の粘膜下リンパ濾胞の細胞内にアデノウイルス7型抗原を証明した Tobe の報告^{8), 9)} 以外は見当たらない。このたびの、われわれの感染実験は、アデノウイルス検索法としての蛍光抗

体法に、新しい知見を加え、さらにさまざまな問題を提起している。

その第1は、検索組織切片の作成法の問題である。従来ウイルス感染組織の螢光抗体法には、凍結切片によるのが通例であったが、Williamson²⁶⁾が Newcastle 病ウイルス感染の鶏卵を 2°C、95%エタノールで固定、パラフィン包埋法を用いて、ウイルス抗原を特異的に染色し、ついで Tobe^{11), 12)}らは猿によるコクサッキー B₅ 型ウイルスの感染実験で、4°C、95%エタノール固定、56°Cパラフィン包埋によって作成した組織切片でウイルス抗原を明確に証明している。これと同様に行ったこのたびの実験に於ても、螢光抗体法にて特異的螢光を証明しえたものはすべてウイルス分離でも陽性であり、アデノウイルスに関する限り、4°C、95%エタノール固定、55°C、15分間パラフィン包埋によるパラフィン包埋法で充分目的がはたされ、あえて凍結切片作成をする必要がないことが明らかにされた。

第2には、ウイルスを静脈内に接種して、人為的とはいえウイルス血症の状態にした場合の末梢血塗沫標本で、多核白血球内に特異的螢光を証明した事実である。Hamashima²⁷⁾らは日本脳炎患者の、Sommerville²⁰⁾はコクサッキー B₅ 型ウイルス感染患者の末梢血塗沫標本に螢光抗体法を用いて、白血球内ウイルス抗原の証明を行い、Coons¹⁵⁾もこの末梢白血球によるウイルス抗原の早期決定の可能性を強調しているが、われわれの所見はこれを実験的に再現し確認したものである。

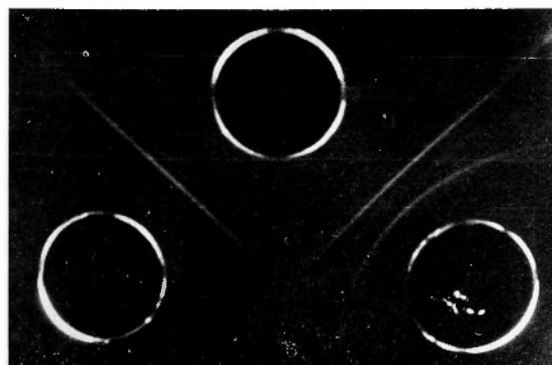


図4 Ouchterlony ゲル内沈降反応。中央の抗アデノ2型血清は右下のアデノ2型ウイルスの可溶性抗原 A, B, C のそれぞれに対して明確な沈降線を作り、左下のアデノ12型ウイルスとの間には群共通抗原A に対してのみ沈降線を作る。

第3には、アデノウイルスの型特異性の問題である。組織培養細胞で増殖させたアデノウイルスには A (Late), B (Toxin), C (Early) の3つの可溶性抗原の存在することが知られている^{28), 29), 30), 31)}。とくに A 抗原は群共通抗原であると考えられており、われわれも2型と12型との間に共通抗原があることを Ouchterlony ゲル内沈降反応で確認している(図4)。一方、Boyer²⁴⁾らは、Hela 細胞内のアデノ7型ウイルスを5型ウイルスに対する抗血清によって染色し、特異螢光を認めている。ところがわれわれの実験では、明らかに2型ウイルスの存在が証明されている回腸を、同様にして作成した12型ウイルスに対する抗血清を用いて染色しても全く螢光を認めない。つまり、われわれの行った螢光抗体法では、アデノウイルスの型相互間に交叉反応が見られないのである。これを一体どう考えるか。A 抗原が群共通性であるという考えは、補体結合反応や沈降反応に基ずくものであるが、螢光抗体法レベルでは型によっては共通性がないのか、或いは組織培養細胞内と感染組織内とはアデノウイルス抗原のあり方に相違があるのか、現在のところこの問題を解明する手がかりは全くないが、臨床的に螢光抗体法を用いる際、われわれの実験のように、アデノウイルスが型特異的に染色されるとすれば、これは極めて重要な事実であるといわなければならない。今後、検討をすすめたいと考えている。

第4には、非感染猿の空腸に非特異的螢光が認められたことである。これは猿腸管のアセトン抽出粉末で抗血清を吸収することにより殆んど消失したことから、おそらく分泌顆粒の非特異的螢光であったろうと考えられる。このように腸管粘膜のような多様の蛋白の存在する臓器の検索を行うときには、肝末による吸収だけでは不十分で、腸管そのもので吸収した抗血清を使用する必要があるように思われる。

最後に、この実験で接種されたアデノウイルスが、はたして猿の組織内で感染増殖していたのであろうか、または単に接種されたウイルスが血流とともに各組織に分布され、あるいは多核白血球に貪食され、最後に粘膜上皮を経て排出されただけであらうか。アデノウイルスに典型的な核内封入体を確認していないので、われわれの実験だけでは、この間にはっきり答えることは出来ない。一般には人アデノウイルスは他種動物には感染しないとされている³²⁾が、文献上人以外の動物に感染させた報告も少なくない^{33), 34), 35)}。しかしこれとて、確実にウイルスが増殖しているという

証拠に乏しい。ただこの実験ではっきり言えることは、生体内のアデノウイルス抗原の追究に蛍光抗体法は充分にその威力を發揮するものであると同時に、その施行にあたってはなお幾多の問題点を残しているということである。なお、アデノウイルスの感染病理については、他型ウイルスの感染実験、臨床例の検討等をすゝめているので、近々報告する予定である。

結 語

小児腸重積症、腸間膜リンパ節炎、虫垂炎、限局性回腸炎等の原因あるいは Trigger としてのアデノウイルス感染に注目し、カニクイザルに人アデノウイルス2型を経口的または静脈内に接種して、その感染動態をウイルス分離とともに蛍光抗体法(間接法)を用いて追跡した。このさい蛍光抗体法実施について次のような所見を得た。

1) 4°C, 95%エタノール固定, 56°Cパラフィン15分間包埋によるパラフィン包埋切片で十分にアデノウイルス抗原証明が可能であり、あえて凍結切片を作成する必要はない。

2) ウイルス血症の時期における末梢血中の多核白血球に特異的蛍光を認める。これは Coons らの臨床例の報告を実験的に確認したものである。

3) 補体結合反応および沈降反応のうえで交叉するアデノ12型ウイルスに対する抗血清を使用したときは、アデノ2型ウイルス感染組織に特異的蛍光を認めない。このことは、感染組織の蛍光抗体法に関する限り、アデノウイルスは型特異的に蛍光染色されることを示唆する。

4) 多様な蛋白の存在する腸管に蛍光抗体法を用いる場合には、抗血清を非感染腸管で充分吸収してから使用する必要がある。

本稿の要旨は、第17回日本アレルギー学会総会(昭和42年11月・熊本)に於て発表した。

稿を終るに臨み、御指導御校閲いただいた京都大学外科学教室・木村忠司教授、京都大学ウイルス研究所長・植竹久雄教授及び同研究所・花岡正男教授に感謝いたします。また本研究は京都大学病理学教室第2実験室諸氏の協力および財団法人坂本奨学会の援助を受けたものであり、附記して謝意を表します。

文 献

1) Ross, J. G., and Potter, C. W.: A possible causal factor in intussusception in infancy.

Lancet 1: 81, 1961.

2) Ross, J. G., Potter, C. W., and Zachary, R. B.: Adenovirus infection in association with intussusception in infancy. Lancet 4: 221, 1962.

3) Gardner P. S.: Adenovirus and intussusception. Brit med J., 2: 495, 1961.

4) Gardner, P. S., Knox, E. G., Court, S. D. M., and Green, C. A.: Virus infection and intussusception in childhood. Brit. med. J., 2: 697, 1962.

5) Rutten, A., and Oudejans, E.: Abdominal manifestations of adenovirus infection in infants Lancet, 2: 597, 1961.

6) Bell, T. M., and Steyn, J. H.: Viruses in lymph nodes of children with mesenteric adenitis and intussusception. Brit. med. J., 2: 700, 1962.

7) White, D. O., and Solomon, J. R.: Adenovirus and intussusception. Med. J. Australia. 447, March 12, 1966.

8) Tobe, T.: Inapparent virus infection as a trigger of appendicitis, Lancet 1: 1342, 1965.

9) 戸部隆吉: 虫垂炎 Trigger のとしてのウイルス感染. 日本医事新報, 2166. 27. 1965.

10) 戸部隆吉, 堀越雄二郎: 虫垂炎の成因——虫垂炎の Trigger としてのウイルス感染. 外科治療 14: 415, 1966.

11) 戸部隆吉: ウイルス性虫垂炎について——Coxsackie B₅型ウイルスをもつての経口感染痕における免疫組織学的研究の示唆するもの. 日本臨床 25: 1263, 1967.

12) Tobe, T., Horikoshi Y., Hamada, C., and Hamashima, Y.: Virus infection as a trigger of appendicitis: Experimental investigation of Coxsackie B₅ virus infection in monkey intestine. Surgery. 62: 927, 1967.

13) 浜島義博, 京極方久: 免疫組織学. 医学書院 1965.

14) Coons, A. H., and Kaplan, M. H.: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. exp. Med., 91: 1, 1950.

15) Coons, A. H., Snyder, J. C., Cheever, F. S., and Murray, E. S.: Localization of antigen in tissue cells. IV. Antigens of rickettsiae and mumps virus. J. exp. Med., 91: 31, 1950.

16) Liu, C.: Rapid diagnosis of human influenza infection from nasal smears by means of fluorescein labeled antibody. Proc. Soc. exp. Med., 92: 883, 1956.

- 17) Biegeleisen, J. Z., Jr., Scoot, L. V and Lewis, V., Jr.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection with fluorescent antibody. *Science*, **129**: 640, 1959.
- 18) Hinuma, Y., Miyamoto, T., Murai, Y. and Ishida, N. Detection of Coxsackie virus antigen in urinary cells by immunofluorescence. *Lancet*. **2**: 179, 1962.
- 19) 日沼頼夫, 沼崎義夫: 螢光抗体法によるウイルス感染症の診断. *小児科臨床* **15**: 887, 1962.
- 20) Sommerville, R. G., and Mac Farlane, P. S. The rapid diagnosis of virus infections by immunofluorescent techniques applied to blood leucocytes. *Lancet*. **1**: 911, 1964.
- 21) Coons, A. H.: Labeling techniques in the diagnosis of viral diseases. *Bact. Rev.*, **28**: 397, 1964.
- 22) Armstrong, J. A., and Hopper, R. K., Fluorescence and phase contrast microscopy of human cell cultures infected with adenovirus. *Exp. Cell. Res.*, **16**: 584, 1959.
- 23) Boyer, G. S., Denny, F. W., and Ginsberg, H. S.: Intracellular localization of type 4 adenovirus. II. Cytological and fluorescein-labelled antibody studies., *J.exp. Med.*, **109**: 85, 1959.
- 24) Boyer, G. S., Denny, F. W., and Ginsberg, H. S., Sequential cellular changes produced by type 5 and type 7 adenoviruses in Hela cells and in human amniotic cells., *J.exp. Med.*, **110**: 827, 1959.
- 25) Pereira, H. G., Allison, A. C., and Balfour, B.: Multiplication of adenovirus type 5 studied by infectivity titrations and by the fluorescent antibody technique. *Virology*. **7**: 300, 1959.
- 26) Williamson, A. P., and Blattner, R. J.: Immunofluorescence of Newcastle disease virus in paraffin embedded tissues of early chick embryos. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **118**: 576, 1965.
- 27) Hamashima, Y., Kyogoku, M., Hiramatsu, S., Nakashima, Y., and Yamauchi, R.: Immuno-cytological studies employing labelled active protein. III. Encephalitis Japonica. *Acta. Path. Jap.*, **9**: 89, 1959.
- 28) Pereira, H. G., Allison, A. C., and Farthing, C. P., Study of adenovirus antigens by immunoelectrophoresis *Nature*. **183**: 895, 1959.
- 29) Klemperer, H. G., and Pereira, H. G.: Study of adenovirus antigens fractionated by chromatography on DEAE-cellulose. *Virology*. **9**: 536, 1959.
- 30) Haruna, I., Yaoi, H., Kono, R., and Watanabe, I., Separation of adenovirus by chromatography on DEAE-cellulose. *Virology*. **13**: 264, 1961.
- 31) Wilcox, W. C., and Ginsberg, H. S., Purification and immunological characterization of type 4 and type 5 adenovirus-soluble antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **47**: 512, 1961.
- 32) Horsfall, F. L., Jr., and Tamm, I., Viral and rickettsial infections of man. *J. B. Lippincott Co.*, **871**: 1965.
- 33) Pereira, H. G., and Kelly, B., Latent infection of rabbits by adenovirus type 5. *Nature*, **180**: 615, 1957.
- 34) Betts, A. O., Jennings, A. R., Lamont, P. H., and Page, Z., Inoculation of pigs with adenoviruses of man. *Nature*, **193**: 45, 1962.
- 35) Pereira, H. G., Allison, A. C., and Niver, J. S. F.: Fatal infection of new-born hamsters by an adenovirus of human origin. *Nature*, **196**: 244, 1962.