

平成 22 年 7 月 6 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19200033
 研究課題名（和文）マイクロビーズ法によるマウス・ラット感染症の微量検査法の開発
 研究課題名（英文）Development of diagnostic tests for infectious diseases of mice and rats by microsphere fluorescent immunoassay

研究代表者
 八神 健一（YAGAMI KEN-ICHI）
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
 研究者番号：40166476

研究成果の概要（和文）：

蛍光マイクロビーズを用いる MFI 法は、微量血清で多項目の抗体検査が可能のため、小型実験動物の感染症診断への応用が期待できる。本研究では、MFI 法による抗体検査システムを構築するため、マウス・ラットの主要感染症の病原体 9 種の抗原を作製し、それらの抗原の特異性や検出感度の評価を行った。その結果、MFI 法は特異性や検出感度が優れ、同時に多数項目の検査においても特異性や感度の低下が見られなかった。MFI 法は実験用マウス・ラットの感染症診断法として優れた方法である。

研究成果の概要（英文）：

Microsphere fluorescent immunoassay (MFI) allows simultaneous detection of antibodies to multiple rodent pathogens using a small volume of sera. In the present study, we examined the specificity and sensitivity of MFI in serologic diagnosis for infections on mice and rats. Antibodies to major 9 pathogens in mice and rats were measured by MFI using recombinant and inactivated antigens. MFI succeeded in multiplex detection of antibodies to the above-mentioned pathogens in a single reaction well without decreasing its specificity and sensitivity. MFI is highly suitable for serodiagnosis in laboratory mice and rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	16,100,000	4,830,000	20,930,000
2008 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2009 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
年度			
年度			
総計	37,300,000	11,190,000	48,490,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：実験動物・微生物検査・血清診断・マイクロビーズ法・マウス・ラット

1. 研究開始当初の背景

ライフサイエンス研究ではマウス・ラット等の実験動物を多用し、特に遺伝子改変マウスの利用は拡大し、ポストゲノム研究に不可欠な存在となっている。それに伴い、遺伝子改変マウスの授受が世界規模で頻繁に行われ、病原体の拡散の危険性が高まっている。特に、従来、日本国内で汚染例の報告がほとんどないいわゆる murine virus に関しては、輸入感染症として国内への汚染拡大が懸念される。一方、マウスは小型であるが故に血清などの検体量が限られ、同一個体での経日的なモニターや多項目の検査は困難である。

2. 研究の目的

本研究では、実験用のマウス・ラットの感染症について、微量サンプルで多項目の抗体測定が可能な検査システムの構築を目的とし、遺伝子組換え等により、検査対象とする9種のマウス・ラットに感染する病原体の精製抗原を開発するとともに、微量検体での高感度検出系として、蛍光マイクロビーズ法を応用し、multiplex 解析の諸条件を検討し、システム化する。

3. 研究の方法

(1) 抗原

マウス肝炎ウイルス (MHV)、センダイウイルス (SV)、肺マイコプラズマ (MP)、ティザー菌 (TZ)、ハンタウイルス (HAN)、マウス微小ウイルス (MVM)、マウスパルボウイルス (MPV)、マウスロタウイルス (EDIM)、マウスノロウイルス (MNV) の9種類の病原体を検査対象とした。これらの病原体に対する抗体検査用抗原として組換えウイルス抗原、不活化ウイルス抗原および不活化菌体抗原を作製し、MFI法における反応性を検討した。

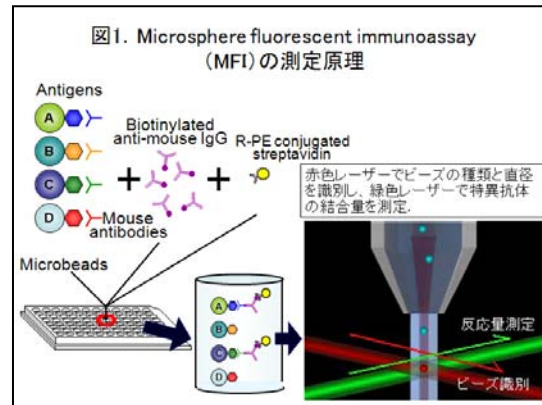
(2) 血清

マウスおよびラットの実験感染血清および100倍希釈した非感染コントロール血清をMFI法による抗体測定に使用した。一部の検査項目については、自然感染血清を収集して100倍希釈で反応性を解析し、ELISA法やIFA法と特異性・検出感度を比較検討した。

(3) MFI法

15種類の抗原タンパク質をカルボキシルコートビーズにカップリングし、各種抗原ビーズを調製した。抗原ビーズは1%BSA-PBSでブロッキング処理し、測定時まで4°Cで遮光保存した。測定時には、まず各抗原ビーズをフィルター付マイクロプレートのwell中で混合し、被検血清と室温で1時間反応させた。次に、well中の抗原ビーズをビオチン標識抗マウス/ラットIgGと室温で1時間反応させた。再度洗浄後、R-PE標識ストレプトアビジンと室温で30分間反応させた。反応後の抗原ビーズは、Luminex200を使用して蛍光強度

を測定し、各抗原ビーズにつき100個以上での測定データにもとづく中央値を median fluorescent intensity (MFI) として算出した。MFI法の原理を図1に示す。



4. 研究成果

(1) 各種抗原の作製

種々の方法で調製した抗原をマイクロビーズにカップリングし、MFI法における反応性を予備検討した結果、以下の抗原がMFI法による抗体検査に利用可能であることが明らかになった。すなわち、MPとTZは培養菌体を超音波破碎した不活化抗原が有効であった。MHVおよびSVは超音波破碎・UV不活化したウイルス抗原が利用可能であり、さらに大腸菌から発現・精製した組換え抗原も有効であった。HAN、MVM、MPV、MNVについても組換え抗原が有効であり、EDIMについてはサルロタウイルス (SRV) の超音波破碎・UV不活化抗原が利用可能であった。これらの抗原を用いてMFI法で検出される実験感染血清との反応強度は、抗原濃度および血清希釈倍数に依存しており、一方で非感染血清との反応は極めて微弱なことから、MFI法による抗体測定系の特異性が確認された。新た開発した5種の組換え抗原、MHV (rS1, rS2, rSmid), SV (rNP), mouse norovirus (rVP1) を含む計9種類の病原体に対する15種類の抗原 (表1) を用いて反応条件を検討した。

表1. MFI法による抗体測定に使用した抗原

マウス (9病原体)								
病原体	MHV					SV		
抗原	MHV S株 vion	MHV S株 rN	MHV S株 rS1	MHV S株 rS2	MHV S株 rSmid	SV MN株 vion	SV MN株 rN	
病原体	MP	TZ	MNV	Parvo	MVM	MPV	EDIM	HAN
抗原	MP m53株	TZ RJ株	MNV rVP1	MVM rNS1	MVM rVP2	MPV rVP2	SRV vion	HAN rN
ラット (6病原体)								
病原体	SDA				SV			
抗原	MHV S株 vion	MHV S株 rN	MHV S株 rS2	MHV S株 rSmid	SV MN株 vion	SV MN株 rN		
病原体	MP	TZ	Parvo	HAN				
抗原	MP m53株	TZ RJ株	MVM rNS1	HAN rN				

(2) 反応条件の検討

100倍希釈した非感染コントロール血清30検体以上を用いて、抗原の種類と濃度ごとにカットオフ値（バックグラウンドMFI平均値+3×標準偏差）を算出した。このカットオフ値と実験感染血清での陽性MFI値との比較に基づき、シグナル/ノイズ（S/N）比の高い抗原濃度を抗原種類ごとに選択した結果、5～40μg/mlの範囲で至適抗原濃度が設定された。また、至適抗原濃度におけるカットオフ値は400～1,000MFIであり、S/N比は2.3～40.0であった（表2及び3）。

表2. マウス病原体各抗原の至適濃度とcut-off値

病原体	MHV					SV	
	virion	rN	rS1	rS2	rSmid	virion	rN
抗原濃度 (μg/ml)	40	10	10	5	5	10	20
Positive (MFI)	23,000	22,000	1,400	20,000	12,000	20,000	19,000
Cut-off (MFI)	900	750	600	500	750	1,000	600
S/N比	25.6	29.3	2.3	40.0	16.0	20.0	31.7

病原体	MP	TZ	MNV	Parvo	MVM	MPV	EDIM	HAN
	bacteria	bacteria	rVP1	MVM rNS1	rVP2	rVP2	SRV virion	rN
抗原濃度 (μg/ml)	40	10	20	40	20	20	40	20
Positive (MFI)	15,000	23,000	12,000	10,000	9,000	12,000	20,000	21,000
Cut-off (MFI)	400	800	800	1,000	400	600	600	1,000
S/N比	37.5	28.8	15.0	10.0	22.5	20.0	33.3	21.0

表3. ラット病原体各抗原の至適濃度とcut-off値

病原体	SDAV				SV	
	MHV virion	MHV rN	MHV rS2	MHV rSmid	virion	rN
抗原濃度 (μg/ml)	40	10	5	5	10	20
Positive (MFI)	4,000	5,000	12,000	7,000	18,000	20,000
Cut-off (MFI)	700	400	450	450	500	1,000
S/N比	5.7	12.5	26.7	15.6	36.0	20.0

病原体	MP	TZ	Parvo	HAN
	bacteria	bacteria	MVM rNS1	rN
抗原濃度 (μg/ml)	40	10	40	20
Positive (MFI)	6,000	23,000	23,000	21,000
Cut-off (MFI)	400	800	900	1,000
S/N比	15.0	28.8	25.6	21.0

(3) 特異性と感度の評価

さらに、各抗原ビーズを混合し、単一反応well中で血清反応を行ったところ、各病原体由来の不活化抗原または組換え抗原はそれぞれの病原体に対する陽性血清と反応し、高いS/N比が認められた（表4および5）。今回の測定系ではMHV抗原として不活化ウイルス抗原および4種類の組換え抗原を用いたが、これらの抗原によりマウスのMHV抗体のみならずラットのSDAV抗体も効率よく検出可能であった。また、パルボウイルスのNS1抗原はパルボウイルス種間で共通抗原性が強いので、マウスのパルボウイルスであるMVMとMPVおよびラットのパルボウイルスであるRPVとH-1に対する抗血清が共に高いS/N比でNS1抗原と反応した。同時に、MVM

表4. マウス9種病原体(15種抗原)を用いたMFI法による特異性と感度の評価

	MHV					SV		MP	TZ	MNV	Parvo	MVM	MPV	EDIM	HAN
	Virion	N	S1	S2	Smid	Virion	N			VP1	NS1	VP2	VP2	Virion	N
抗MHV	25.8	27.6	2.5	40.5	23.0	0.8	0.6	0.3	0.5	0.6	0.2	0.3	0.3	0.9	2.2
抗SV	0.1	0.2	0.2	0.4	0.4	21.8	39.7	0.2	0.1	0.6	0.1	0.2	0.2	0.5	0.8
抗MP	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.5	0.2	60.7	0.1	0.6	0.1	0.1	0.1	0.5	0.4
抗TZ	0.5	0.4	0.5	0.9	0.7	0.5	0.4	0.2	30.3	0.8	1.7	0.3	0.8	0.9	0.9
抗MNV	0.4	0.4	0.6	1.0	0.8	2.4	1.2	0.4	0.5	8.6	0.4	0.4	0.4	1.6	0.7
抗MVM	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.1	0.3	0.1	6.0	0.8	10.8	23.1	0.6	0.5	0.1
抗MPV	4.0	0.5	0.8	0.9	0.8	0.9	0.8	0.4	1.2	0.8	16.2	2.2	19.9	1.3	0.5
抗EDIM	0.4	0.3	0.4	0.8	0.7	0.4	0.5	0.3	0.1	1.8	0.2	0.3	0.4	31.2	0.7
抗HAN	0.2	0.4	0.3	0.4	0.2	0.4	0.3	0.2	0.1	0.5	0.1	0.3	0.2	0.6	24.0

15種の抗原ビーズを混合し、9種病原体に対する100倍希釈感染血清との反応性を検討した。MFI値とcut-off値から算出したS/N比を示す。

表5. ラット7種病原体(10種抗原)を用いたMFI法による特異性と感度の評価

	MHV				SV		MP	TZ	Parvo	HAN
	Virion	N	S2	Smid	Virion	N			NS1	N
抗SDAV	9.1	19.1	47.3	26.9	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1
抗SV	0.2	0.5	0.3	0.3	47.6	23.8	0.2	0.3	0.2	0.2
抗MP	0.3	1.0	0.2	0.1	0.1	0.1	14.4	0	0	0.1
抗TZ	0.2	0.6	0.5	0.4	0.2	1.1	0.2	30.3	0.1	0.1
抗RPV	0.1	0.6	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.2	23.9	0.4
抗H1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	7.1	0.2
抗HAN	0.2	0.5	0.4	0.4	0.7	0.1	0.3	0.5	0.1	24.0

10種の抗原ビーズを混合し、7種病原体に対する100倍希釈感染血清との反応性を検討した。MFI値とcut-off値から算出したS/N比を示す。

とMPVそれぞれのVP2抗原を用いることで、MVMとMPVの感染を鑑別することも可能であった。このように、MFI法では感度の損失なく、上記検査項目のマルチプレックス抗体検査が可能であった。

また、自然感染血清が入手できたMHV、SV、MP、MNVについては現行のELISA法やIFA法との比較解析を行い、MFI法がELISA法やIFA法と比較して同等もしくはそれ以上の特異性と感度を有することが確認された。

(4) 今後の展望

MFI法による抗体検査では1つの病原体に対して複数の組換え抗原を用いた測定が可能であるため、陽性反応時の特異性の確認や検出率の向上にも有利であることが示唆された。微量の血清サンプルから一度に多項目にわたる抗体検査成績が得られ、しかも特異性の向上が期待できることから、MFI法はELISA法に代わるハイスループットな血清検査法として普及していくものと予想される。

今後、わが国の中核的な検査機関であるICLASモニタリングセンターの血清検査メニューに含まれるすべての検査項目について、MFI法による抗体測定系の構築を継続し、マウス・ラット血清検査の1次スクリーニングをMFI法に移行させる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

- ①Kitagawa Y, Tohya Y, Ike F, Kajita A, Park SJ, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Indirect ELISA and indirect immunofluorescent antibody assay for detecting the antibody against murine norovirus S7 in mice. *Exp Anim.* 59(1):47-55. 2010. (査読有)
- ②Sasaki H, Kawamoto E, Tanaka Y, Sawada T, Kunita S, Yagami K. Identification and characterization of hemolysin-like proteins similar to RTX toxin in *Pasteurella pneumotropica*. *J Bacteriol.* 191:3698-705. 2009. (査読有)
- ③Goto K, Hayashimoto N, Yasuda M, Ishida T, Kameda S, Takakura A, Itoh T. Molecular detection of murine norovirus from experimentally and spontaneously infected mice. *Exp Anim.* 58(2):135-40. 2009. (査読有)
- ④Truong TT, Yoshimatsu K, Araki K, Lee BH, Nakamura I, Endo R, Truong UN, Arikawa J. Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in northern Vietnam. *J Vet Med Sci.* 71(10):1357-63. 2009. (査読有)
- ⑤後藤一雄. わが国の実験用マウスにおけるマウスノロウイルスの汚染状況. *LABIO* 21. 38:9-13. 2009. (査読無)
- ⑥高倉 彰. わが国のマウス・ラット動物実験施設の微生物汚染の現状. *LABIO* 21. 31:26-28. 2008. (査読無)
- ⑦Goto K, Horiuchi H, Shinohara H, Motegi K, Hashimoto K, Hongo S, Gemma N, Hayashimoto N, Itoh T, Takakura A. Specific and quantitative detection of PCR products from *Clostridium piliforme*, *Helicobacter bilis*, *H. hepaticus*, and mouse hepatitis virus infected mouse samples using a newly developed electrochemical DNA chip. *J Microbiol Methods.* 69(1):93-9. 2007. (査読有)
- ⑧國田 智・八神健一. マウスにおけるパルボウイルス感染. *アニテックス.* 19:53-55. 2007. (査読無)
- ⑨Ike F, Bourgade F, Ohsawa K, Sato H, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Takimoto K, Yamada YK, Jaubert J, Berard M, Nakata H, Hiraiwa N, Mekada K, Takakura A, Itoh T, Obata Y, Yoshiki A, Montagutelli X. Lymphocytic choriomeningitis infection undetected by dirty-bedding sentinel monitoring and revealed after embryo

transfer of an inbred strain derived from wild mice. *Comp Med.* 57(3):272-81. 2007. (査読有)

⑩Sasaki H, Kawamoto E, Kunita S, Yagami K. Comparison of the in vitro susceptibility of rodent isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pasteurella pneumotropica* to enrofloxacin. *J Vet Diagn Invest.* 19(5):557-60. 2007. (査読有)

[学会発表] (計 27 件)

- ①國田 智ほか. 蛍光マイクロビーズ法によるマウス・ラット感染症のマルチプレックス抗体検査. 第 57 回日本実験動物学会総会. 2010 年 5 月 12 日. 京都
- ②國田 智. 蛍光マイクロビーズ (MFI) 法によるマウス・ラット感染症の多項目血清検査. 日本実験動物協会教育セミナー. 2010 年 3 月 6 日. 東京
- ③Fuke A. et al., Diagnosis Method Based on Sandwich ELISA Using *Helicobacter hepaticus*-Specific Monoclonal Antibody. American Association for Laboratory Animal Science (AALAS) National Meeting. Nov. 10, 2009. Denver (USA).
- ④安田俊平ほか. ハンタウイルス自然感染ラットと実験感染ラットにおける病態の比較. 第 57 回日本ウイルス学術集会. 2009 年 10 月 27 日. 東京
- ⑤Ike F. et. al., Detection of emerging zoonotic infection in mice by high sensitive multiplexed microfluidic immunoassay system. The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Oct. 7, 2007. Paris(France).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: マウス肝炎ウイルスの組換え抗原
発明者: 國田 智・八神健一・高倉 彰
権利者: 国立大学法人 筑波大学
財団法人 実験動物中央研究所
種類: 特許
番号: 特願 2010-061032
出願年月日: 2010 年 3 月 17 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/yagami/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八神 健一 (YAGAMI KEN-ICHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：40166476

(2) 研究分担者

① 國田 智 (KUNITA SATOSHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：10195472

② 有川 二郎 (ARIKAWA JIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10142704

③ 大沢 一貴 (OHSAWA KAZUTAKA)
長崎大学・学内共同利用施設・教授
研究者番号：90244756

④ 後藤 一雄 (GOTO KAZUO)
帝京大学・医療技術学部・准教授
研究者番号：00205593

⑤ 池 郁生 (IKE FUMIO)
(独) 理化学研究所・バイオリソースセンター・研究員
研究者番号：40183157

⑥ 高倉 彰 (TAKAKURA AKIRA)
(財) 実験動物中央研究所・ICLAS モニタリングセンター・部長
研究者番号：64167484

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

① 加藤 花名子 (KATO KANAKO)
筑波大学・生命科学動物資源センター・研究員

② 亀田 周子 (KAMEDA SYUKO)
(財) 実験動物中央研究所・研究員

③ 石田 智子 (ISHIDA TOMOKO)
(財) 実験動物中央研究所・研究員