

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300143

研究課題名 (和文) マウス病原性ヘリコバクターの特異的抗原検出診断法の開発

研究課題名 (英文) Development of the antigen detection-based diagnosis method specific for murine pathogenic *Helicobacter* species

研究代表者 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

研究成果の概要 (和文)：

マウスの代表的な病原性ヘリコバクター菌である *Helicobacter hepaticus* (*H. hepaticus*) の抗原検出診断法を確立する目的で、*H. hepaticus* に特異的なモノクローナル抗体 MAb#5-12D を作出した。本抗体を用いて、*H. hepaticus* 菌体を約 10^4 CFU の高感度で検出可能なサンドイッチ ELISA 法、ならびに 10 分間で簡便に本菌の特異的検出が可能なイムノクロマト法の開発に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

To develop an antigen detection-based diagnosis method for murine pathogenic *Helicobacter* species, *H. hepaticus*, we prepared a monoclonal antibody (MAb#5-12D) specific for *H. hepaticus*. A sandwich ELISA using the MAb#5-12D detected as little as 10^4 CFU of *H. hepaticus*. In addition, an immunochromatographic method allowed specific, quick and easy detection of *H. hepaticus* within 10 min.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野： 実験動物学

科研費の分科・細目： 実験動物学

キーワード： 感染症，診断法，マウス，ヘリコバクター，サンドイッチ ELISA 法，イムノクロマト法

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter hepaticus は、マウスを自然宿主とするグラム陰性のウレアーゼ陽性螺旋菌で、大腸や肝臓に定着・増殖し、慢性増殖性大腸炎、慢性活動性肝炎、肝臓癌の原因となる。1994 年に *H. hepaticus* が発見されてから、実験用マウスの多くが *Helicobacter* 属菌に感染していることが判明し、その後、10 菌種以上の *Helicobacter* 属菌が相次いで

分離された。この中で病原性菌種であり汚染率も高いという理由から微生物モニタリングの対象微生物としての必要性が高まっているのが、*H. hepaticus* である。*H. hepaticus* 感染の診断法として、本菌は分離培養および特異的な抗体検査が困難であることから、PCR 法が主流となっている。しかし、PCR 法による感染症診断では、非特異バンドの判定に塩基配列解析が必要なこと、操作中の微

量のコンタミネーションによる擬陽性バンドが生じやすいこと、検査結果の再現性を確保するのに厳密なバリデーションや習熟が必要なことなど、多くの問題点が指摘されている。このように検査法が煩雑であるという理由から、マウスのヘリコバクター検査は普及が遅れているのが現状であり、わが国や米国における2007~2008年頃までの調査でも、実験用マウスの *H.hepaticus* 感染は5~10%の高い汚染率で推移している。したがって、現在も世界中の実験用マウスコロニーに蔓延しているヘリコバクター感染を終息させるには、自家検査に適した簡便なヘリコバクター検査法を開発することが不可欠である。本菌の新規検査法を開発、普及させることにより、わが国のみならず世界各国の実験用マウスにおける *H.hepaticus* の汚染率の減少に貢献できるものと期待される。

2. 研究の目的

マウスの *H.hepaticus* 感染症を自家検査で摘発するのに適した簡易診断法として、サンドイッチ ELISA 法やイムノクロマト法に基づく *H.hepaticus* 特異的抗原検査法を開発することが本研究課題の目的である。抗原検出によるヘリコバクターの検査法は、ヒトの *H.pylori* 感染検査用に開発された実績がある。胃粘液中に産生される *H.pylori* のウレアーゼを特異抗体固相化チップに吸着して酵素活性を測定する方法や、糞便中の *H.pylori* 抗原(カタラーゼなど)を特異抗体によるサンドイッチ法で検出する方法などが体外診断用医薬品として実用化されている。このような抗原検出に基づく診断は、採材時の患者への負担が少なく、汎用されている種々の免疫学的手法を用いて迅速かつ簡便な測定が可能であり、しかも抗体検査とは異なって現在の感染状況を反映した結果が得られるという点から、除菌治療効果の判定等でも有効な検査法として利用されている。また、インフルエンザウイルスやロタウイルスなどヒトのウイルス感染症においても、イムノクロマト法による抗原検査が外来診察時の迅速診断法として近年盛んに用いられている。一方で、実験動物を対象とする検査においては、このような手法の導入が遅れている。抗原検出による診断法は、実験動物の微生物検査においても、感染初期における摘発やヘリコバクターのような慢性感染症の検査、さらには生存個体からのケージサイドでの検査法として、実用化が期待される手法である。本研究課題を通じて得られる開発のノウハウは、*H.hepaticus* 以外の実験動物の感染症診断にも応用可能であり、その研究意義や利用価値は極めて高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) *H.hepaticus* に対する特異抗体の作製

①モノクローナル抗体の作製

H.hepaticus および *H.bilis* のウレアーゼ B(UreB)タンパク質をコードする UreB 遺伝子を pGEX ベクターにクローニングし、*E.coli* BL21 株で Glutathion S transferase (GST) との融合タンパクとして発現させた。発現した UreB-GST タンパク質を glutathion-sepharose B カラムで精製し、免疫原および抗 UreB 抗体測定用の標準抗原として使用した。*H.hepaticus* UreB-GST タンパク質を BALB/cA マウスの後肢足蹠に2週間隔で2回免疫し、膝下リンパ節細胞と SP2/O-Ag14 ミエローマ細胞を融合した。HAT および methylcellulose を含む ClonaCell-HY Medium D での選択培養により、ハイブリドーマのクローン化コロニーを得た。コロニーを HT を含む 10%FBS-DMEM に移して培養し、培養上清中の anti-UreB 抗体を *H.hepaticus* UreB-GST タンパク質を抗原として用いた ELISA 法によりスクリーニングした。スクリーニングで陽性と判定されたクローンについて、*H.bilis* UreB-GST タンパク質を抗原として用いた ELISA 法で陰性を示すことを指標に *H.hepaticus* UreB に対する特異的な抗体産生クローンを選別した。

H.hepaticus を 10% FBS 添加 Brucella broth を用いて 10%CO₂, 5%O₂ インキュベータで培養し、遠心により集菌した後、0.5% ホルマリン-PBS 中で 37°C1 時間処理し、PBS で遠心洗浄することで不活化 *H.hepaticus* 菌体を作製した。この不活化 *H.hepaticus* 菌体を上述と同様の方法で BALB/cA マウスに免疫して *H.hepaticus* 菌体成分に対するモノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体のスクリーニングは不活化 *H.hepaticus* 菌体を抗原とする ELISA 法により実施し、さらに *H.bilis* および *H.muridarum* 不活化菌体を抗原とする ELISA 法で陰性を示すことを指標に *H.hepaticus* に対する特異的なモノクローナル抗体を選別した。

選別した *H.hepaticus* 特異的モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを BALB/cA マウスの腹腔内に接種して得た腹水の遠心上清を 33%飽和硫酸で塩析後、protein A カラムを用いて IgG 分画をアフィニティ精製した。

②ポリクローナル抗体の作製。

不活化 *H.hepaticus* 菌体をウサギ (JW) 皮下に4回免疫し、全採血して血清を採取した。血清を 33%飽和硫酸で塩析後、protein A カラムを用いたアフィニティ精製により、IgG 分画を得た。

(2) モノクローナル抗体の特性解析

①アイソタイプの同定

MAb isotype kit を使用し、各モノクローナル抗体のアイソタイプの同定を行った。

②菌体凝集反応

0.1%ゼラチン添加 PBS を用いてモノクローナル抗体を 100 μ g/ml から 0.78 μ g/ml まで希釈し、U 底プレートに 25 μ l/well ずつ加えた。次いで 1.0 OD₆₀₀ の不活化 *H. hepaticus* 菌体抗原を 25 μ l/well 加え、37°C で 2 時間、次いで 4°C で一晩静置後、凝集を判定した。

③モノクローナル抗体認識抗原の解析

認識抗原をウェスタンブロット法で検出するため、*H. hepaticus*、*H. bilis*、および *H. muridarum* を培養後、10000 \times g で 4°C 30 分間遠心して得た各菌体を PBS で 3 回遠心洗浄し、超音波破碎した。これに等量の 2 \times sample buffer [125mM Tris-HCl(pH8.0), 4% SDS, 4% 2-ME, 20% Glycerol, 0.04% BPB] を加えた後、95°C で 5 分間加熱して可溶化した。この可溶性抗原を用いて 15%アクリルアミドゲル上で SDS-PAGE を行い、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング液 (2% ECL-blocking reagent, 0.05% Tween20, 0.02M Tris, 0.5M NaCl) 中にて 4°C で一晩放置したのち、モノクローナル抗体と室温で 60 分間反応させ、洗浄液 (0.05% Tween20, 0.02M Tris, 0.5M NaCl) で 3 回洗浄した。次いでブロッキング液で 10000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG と室温で 60 分間反応させ、4 回の洗浄後、ECL-Advance による化学発光をルミノイメーリアナライザー-LAS3000 で検出し、認識抗原の分子量を推定した。さらに、10unit/ml のトリプシン処理を 37°C 3 時間、10unit/ml のキモトリプシン処理を 25°C 24 時間、および 60~90°C の加熱処理を 30 分間行った

H. hepaticus 抗原を用いてウェスタンブロットを実施し、抗原の生化学的特性を解析した。

認識抗原の精製には、*H. hepaticus* 培養液 500ml を 10000 \times g で 4°C 15 分間遠心して得たペレットを使用した。10ml の PBS で遠心洗浄したペレットを 600 μ l の 0.5% TritonX-100 添加 PBS に浮遊して超音波破碎した後、10000 \times g で 4°C 15 分間遠心し、その上清から Affi-Gel Hz immuneaffinity kit を使用して抗原をアフィニティ精製した。モノクローナル抗体を固定したカラムからの抗原溶出には酸性溶出液 [0.05% TritonX-100, 0.2M Glycine-HCl(pH2.5)] を用いた。アフィニティ精製した抗原を SDS-PAGE で分画した後、ウェスタンブロット法によるモノクローナル抗体との反応性解析、タンパク染色、および PAS 反応による糖染色を行った。

(3) サンドイッチ ELISA 法の構築

抗 *H. hepaticus* ウサギ IgG (6.25 μ g/ml に PBS で調製) を 96-well EIA プレートに 200 μ l/well ずつ分注し、4°C で一晩静置して固相化した。固相化プレートを 250 μ l/well の PBS で 3 回洗浄後、ブロッキング液

(1%BSA, 0.05% Tween20 添加 PBS) を

250 μ l/well 加え、37°C で 90 分間静置してブロッキングを行った。抗原サンプル液 200 μ l/well との反応を 37°C で 1 時間実施し、250 μ l/well の PBS で 3 回洗浄した後、捕捉された抗原を検出するため、200 μ l/well 抗 *H. hepaticus* マウスモノクローナル抗体

(6.25 μ g/ml に PBS で調製) と 37°C で 1 時間反応させた。250 μ l/well の PBS による 3 回の洗浄の後、0.1%BSA 添加 PBS で 4000 倍希釈したビオチン標識抗マウス IgG(H+L) 200 μ l/well を 37°C で 1 時間反応させた。続いて 250 μ l/well の PBS で 3 回洗浄し、0.1%BSA 加 PBS で 10000 倍希釈した HRP 標識 NeutrAvidin 200 μ l/well を 37°C で 1 時間反応させた。250 μ l/well の PBS で 4 回洗浄後、200 μ l/well の OPD 発色基質液 (0.4mg/ml *o*-phenylenediamine, 0.01% H₂O₂-PBS) との反応を遮光下で 37°C 10 分間実施し、25 μ l の 3.5 N H₂SO₄ を添加した後、発色強度を OD₄₉₀ 値として測定した。

(4) 感染マウス検体での抗原診断の評価

約 2 \times 10⁸ CFU/ml の *H. hepaticus* 培養液 0.5ml を 5 週齢の BALB/cA マウスに経口接種し、一部のマウスには 3 日後に再接種した。感染 1 週間後から 9 週目まで毎週、約 10 個の新鮮な糞便を採取し、サンドイッチ ELISA と nested-PCR を実施して感染診断の比較評価を行った。また非感染マウスからも糞便を採取してサンドイッチ ELISA を行い、OD₄₉₀ の平均値 + 3 \times 標準偏差より算出した 0.2 をカットオフ値として設定した。

サンドイッチ ELISA 用サンプルの調製法は、100mg のマウス糞便を Lysing matrix C チューブに入れ、3.5 倍濃度の Complete mini protease inhibitor 添加 PBS 323 μ l と 1M NaOH 71 μ l (終濃度 0.18M) を加えた。FastPrep FP120A を用いて、30 秒間の破碎を 5 回繰り返した。破碎後のチューブを室温で 10 分静置後、1M Tris-HCl(pH6.8) を 106 μ l 加えて中和し、再度 30 秒間の破碎を 1 回行った。3000 \times g で 4°C 10 分間遠心し、その上清を抗原サンプルとして使用した。

Nested PCR 用サンプルの調製には、2 個の新鮮糞便を Isogen 1ml と共に Lysing matrix C チューブに入れ、FastPrep FP120A を用いて 40 秒間破碎した。14000 \times g で 5 分間遠心し、その上清にクロロホルムを加えて混和後、14000 \times g で 10 分間遠心し、水層の RNA をエタノール沈殿により回収した。抽出した RNA 約 600ng から cDNA を合成し、Goto らの方法 (Curr.Microbiol. 41:161-166) に従って *H. hepaticus*-specific primer を用いて 16S rRNA 配列をターゲットにした nested PCR を行った。

(5) イムノクロマト法の構築

①抗体感作粒子の作製条件の検討

金コロイド粒子およびラテックス粒子に 5

～25μg/ml の濃度でモノクローナル抗体を感作し、10%BSA によるブロッキングの後、1～2%の感作粒子濃度に調製してコンジュゲートパッドに塗布、減圧乾燥したものを至適条件の検討に用いた。

②メンブレンへの抗体塗布条件の検討

抗 *H. hepaticus* ウサギ IgG およびモノクローナル抗体を 1mg/ml 濃度で 1～2μl/cm の塗布量でライン塗布後、ブロッキング処理したものを至適条件の検討に使用した。同時に、HF120 と HF135 の 2 種類のメンブレンによる反応性の差も検討した。

③イムノクロマトストリップの作製

上記検討結果に基づき、HF120 メンブレンに 1mg/ml の抗 *H. hepaticus* ウサギ IgG を 1μl/cm の塗布量でテストライン塗布、0.5mg/ml の抗マウス IgG を 1μl/cm の塗布量でコントロールライン塗布した。25μg/ml モノクローナル抗体で感作したラテックス粒子を 1%濃度でコンジュゲートパッドに塗布し、これをメンブレン、サンプルパッド、吸収パッドと共にアセンブリし、イムノクロマトストリップとして使用した。被検抗原サンプルをサンプルパッド部に 85μl 滴下し、室温で 10 分間静置後に判定を行った。

4. 研究成果

(1)モノクローナル抗体の特性解析

組換え UreB タンパク質に対してモノクローナル抗体を作製し、*H. hepaticus* UreB に特異的な抗体を選別することができた。しかし、*H. hepaticus* 菌体を抗原として用いたダイレクト ELISA およびサンドイッチ ELISA で高反応性を示す抗体は得られず、抗原検出検査法の標的抗原として UreB は適していないことが示唆された。

続いて、ホルマリン不活化 *H. hepaticus* 菌体に対するモノクローナル抗体を作製し、ダイレクト ELISA とサンドイッチ ELISA によりスクリーニングを実施した結果、11 種類の *H. hepaticus* 特異的抗体と 2 種類の交差反応性抗体を得ることができた。*H. hepaticus* 特異的な MAb#5-12D と交差反応性の MAb #9-6B のダイレクト ELISA の結果を Fig.1 に示した。

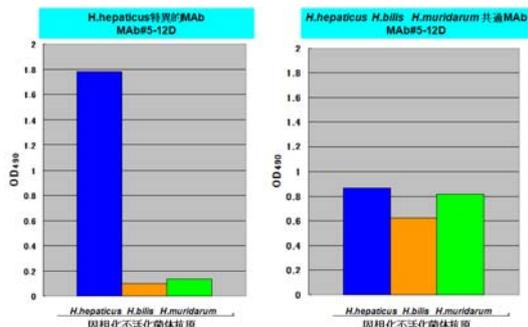


Fig.1. ホルマリン不活化*H. hepaticus* *H. bilis* *H. muridarum*菌体を固相化したダイレクトELISAによるモノクローナル抗体のスクリーニング

上記 13 種類のモノクローナル抗体の特性 (アイソタイプ、ダイレクト ELISA での反応性、サンドイッチ ELISA での反応性、菌体凝集能、ウェスタンブロット法における反応性と認識抗原の分子量)を Table 1 に示した。

Table 1. スクリーニングによって選抜したモノクローナル抗体の特性

スクリーニング	アイソタイプ	不活化菌体抗原			サンドイッチ抗原			菌体凝集能			ウェスタンブロット			
		UreB	UreA	UreC	UreB	UreA	UreC	+	-	+	-	+	-	
#5-01H	Mb21.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	55kDa
#5-02C	Mb21.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	55kDa
#5-03D	Mb21.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	55kDa
#5-12D	Mb21.a	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12kDa
#5-11D	Mb21.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	55kDa
#5-12A	Mb21.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	55kDa
#5-10	Mb1.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
#5-02C	Mb21.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	25.5kDa
#5-05	Mb1.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	27.25kDa
#5-03D	Mb21.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	39kDa
#5-07A	Mb21.a	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	55kDa
#5-03D	Mb21.a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	55kDa
#5-07E	Mb1.a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	69kDa

H. hepaticus 特異的モノクローナル抗体のうち、#5-12D は培養上清との強い反応性を示し、菌体凝集能も陽性であった。ウェスタンブロット法により *H. hepaticus*、*H. bilis*、*H. muridarum* に対する反応性を解析した結果、認識抗原を検出することができなかった #3-1D を除き、12 種類のモノクローナル抗体の全てでダイレクト ELISA と同様の特異性を確認することができた。*H. hepaticus* 特異的抗体#5-12D と 3 菌種共通抗体#9-6B のウェスタンブロットの結果を Fig.2 に示した。

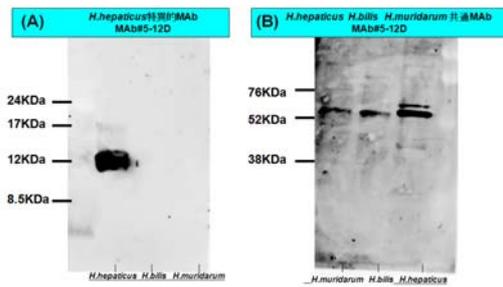


Fig.2. ウェスタンブロットによるMAb#5-12DとMAb#9-6Bの認識抗原解析 (A)MAb#5-12D(15%アクリルアミドゲルに抗原を電気泳動し、メンブレンに転写した。) (B)MAb#9-6B(10%アクリルアミドゲルに抗原を電気泳動し、メンブレンに転写した。) ハイブリードマ培養上清との反応後、HRP標識抗マウス抗体とECL-Advanceで検出した。

モノクローナル抗体#5-12D は *H. hepaticus* の 12KDa の抗原を特異的に検出し、#9-6B は 3 菌種すべてにおいて 55KDa の抗原を検出した。#5-12D が認識する菌体成分を推定するため、プロテアーゼ処理菌体抗原と加熱処理菌体抗原に対する反応性をウェスタンブロットで解析した結果、いずれの処理を施した抗原にも#5-12D は処理前と同様の反応性を示した。さらにイムノアフィニティ法により#5-12D の認識抗原を精製し、これを SDS-PAGE 後、タンパク染色および糖染色した結果、12KDa の抗原は糖染色のみで検出された。以上の結果より、#5-12D は糖質を認識する抗体であることが示唆された。

(2) サンドイッチ ELISA 法による *H. hepaticus* 抗原検出法の確立と評価
固相化抗体として抗 *H. hepaticus* ウサギ

IgG、検出用一次抗体としてモノクローナル抗体#5-12D、さらに検出用二次抗体としてビオチン標識抗マウス IgG(H+L)、酵素標識物としてHRP標識 NeutrAvidin を使用したサンドイッチ ELISA を構築し、本法による *H.hepaticus* 抗原検出の特異性と感度を解析した。Fig3.に示したように、ホルマリン不活化 *H.hepaticus*、*H.bilis*、*H.muridarum* 菌体を抗原として実施したサンドイッチ ELISA において、不活化 *H.hepaticus* を $OD_{600}=0.0008$ まで検出可能であったのに対し、不活化 *H.bilis* および *H.muridarum* に対しては最高抗原濃度に設定した $OD_{600}=0.2$ でも陰性値 ($OD_{490}<0.2$) を示し、本サンドイッチ ELISA により *H.hepaticus* を特異的に検出可能であることが明らかになった。

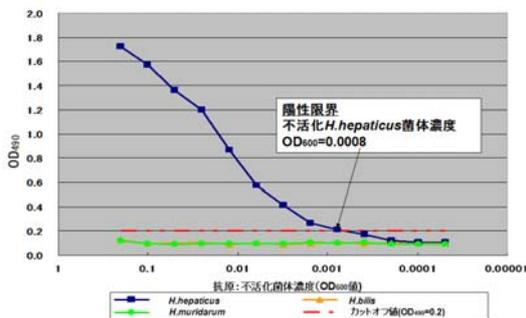


Fig.3. サンドイッチELISAによるホルマリン不活化*H.hepaticus*、*H.bilis*、*H.muridarum*菌体に対するMAb #5-12Dの反応性

次に、*H.hepaticus* 生菌液を抗原としてサンドイッチ ELISA を行った結果、 $OD_{600}=0.00005$ (約 8×10^4 CFU/ml) まで検出可能であることが明らかになった(Fig.4)。我々が構築したサンドイッチ ELISA のプロトコールでは、被検抗原液 100 μ l を使って抗原検出を行っていることから、検出感度は 8×10^3 CFU と推定された。

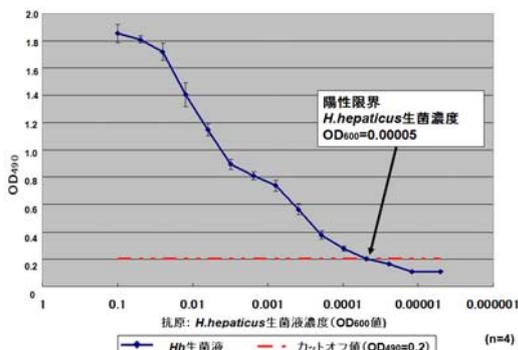


Fig.4. サンドイッチELISAによる*H.hepaticus*生菌の検出感度

さらに、感染動物サンプルからの検出感度を評価するため、*H.hepaticus* を実験感染したマウス(n=11)の糞便を用いて、サンドイッチ

チ ELISA と nested-PCR を実施した。感染 1 週目から糞便中に *H.hepaticus* が検出される個体が両検出法で認められた。感染 1 週～9 週間までの両検出法での陽性率を比較した結果、サンドイッチ ELISA の陽性率は 71.9%、PCR の陽性率は 55.1%であり、計 89 検体の糞便サンプルを用いたサンドイッチ ELISA と PCR の一致率は 76.4%であった(Table 2)。一方、実験感染前の非感染対照の糞便サンプルでは、両検査法で被検個体全例(n=27)が陰性と判定された。以上の結果から、今回確立したサンドイッチ ELISA は、現在ヘリコバクター感染マウスの検査に広く利用されている nested PCR と同等もしくはそれ以上の検出感度を有していると推察された。

Table 2 *H.hepaticus* 実験感染マウス糞便サンプルを用いたサンドイッチELISAとPCRでの検出感度比較

Nested-PCR サンドイッチ ELISA	+	-	計
+	46	18	64
-	3	22	25
計	49	40	89

H.hepaticus を経口投与したマウス11匹、糞便サンプル採取期間感染1～9週 計89サンプル

感染1～9週のサンドイッチELISA陽性率[(46+18)/89]=71.9%
感染1～9週のNested-PCRの陽性率[(46+3)/89]=55.1%

(3) イムノクロマト法による *H.hepaticus* 抗原検出法の確立と評価

ホルマリン不活化 *H.hepaticus*、*H.bilis*、*H.muridarum* 菌体を抗原としてイムノクロマト法を実施したところ、*H.hepaticus* 抗原との反応でテストライン上に陽性の赤色シグナルが出現した。不活化 *H.hepaticus* の検出は $OD_{600}=0.002$ まで可能であったが、不活化 *H.bilis* および *H.muridarum* に対しては $OD_{600}=0.02$ でもテストライン上に陽性シグナルは検出されず、本イムノクロマト法により *H.hepaticus* を特異的に検出可能であることが明らかになった(Fig.5)。

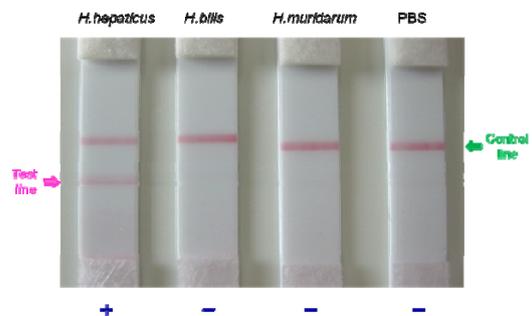


Fig. 5. イムノクロマト法の特異性の検討

1% Latex, ホルマリン不活化菌液(0.02 OD_{600})85 μ l, 10min反応

さらに、*H.hepaticus* 生菌液を抗原としてイムノクロマト法を実施した結果、OD₆₀₀ = 0.00016 (約 2.4×10⁵CFU/ml) まで検出可能であることが明らかになった(Fig.6)。我々が構築したイムノクロマト法のプロトコールでは、被検抗原液 85μl を使って抗原検出を行っていることから、検出感度は 2×10⁴CFU と推定された。

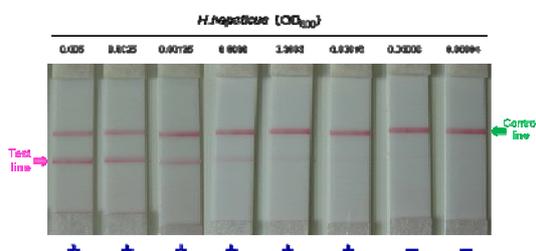


Fig.6. *H.hepaticus*生菌を用いたイムノクロマト法の検出感度の検討
1% Latex, *H.hepaticus*増菌液(全量)85μl, 10min反応

以上の結果より、イムノクロマト法はサンドイッチ ELISA 法より数分の1程度検出感度が劣るものの、10分間という短時間で簡便に *H.hepaticus* の特異的な検出が可能であることから、迅速診断法として極めて高い実用性を有していることが示唆された。

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 3 件)

- ① S. Kunita, K Kato, M Ishida, K Hagiwara, S Kameda, T Ishida, A Takakura, K Goto, F Sugiyama, K Yagami, Simultaneous Detection of antibodies to mouse hepatitis virus recombinant structural proteins by a microsphere-based multiplex fluorescent immunoassay. Clin Vaccine Immunol., 査読有、18、2011、758-766.
- ② H. Sasaki, E. Kawamoto, Y. Tanaka, T. Sawada, S. Kunita, K. Yagami, Identification and characterization of hemolysin-like proteins similar to RTX toxin in *Pasteurella pneumotropica*., J. Bacteriol. , 査読有、191、2009、3698-3705.
- ③ H. Sasaki, E. Kawamoto, Y. Tanaka, T. Sawada, S. Kunita, K. Yagami, Comparative analysis of *Pasteurella pneumotropica* isolates from laboratory mice and rats, Antonie Van Leeuwenhoek, 査読有、95、2009、311-317.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 國田 智、マウス・ラット微生物検査の最近の話題、第 57 回日本実験動物学会総会 JALAM シンポジウム、平成 22 年 5 月 11 日、京都テルサ
- ② A. Fuke, S. Kunita, K. Goto, F. Sugiyama, K. Yagami, Diagnosis method based on sandwich ELISA using *Helicobacter hepaticus*-specific monoclonal antibody, 60th American Association for Laboratory Animal Science National Meeting, 平成 21 年 11 月 9 日、Denver Convention Center, Colorado, USA
- ③ 富家彰浩, 國田智, 後藤一雄, 杉山文博, 八神健一, *Helicobacter hepaticus* 特異的モノクローナル抗体を用いた抗原診断法の開発、第 56 回日本実験動物学会総会、平成 21 年 5 月 14 日、大宮ソニックシティ
- ④ 富家彰浩, 國田智, 後藤一雄, 杉山文博, 八神健一, *Helicobacter hepaticus* ウレアーゼ B サブユニットに対するモノクローナル抗体の作製と診断への応用、第 55 回日本実験動物学会総会、平成 20 年 5 月 16 日、仙台国際センター

[図書] (計 1 件)

- ① 國田智, 他、(社)日本実験動物学会監修、アドスリー、実験動物としてのマウス・ラットの感染症対策と予防、2011、176

[その他]

ホームページ等
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/yagami/helico.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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) 研究分担者

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
後藤 一雄 (GOTO KAZUO)
(財) 実験動物中央研究所・ICLAS モニタリングセンター・室長
研究者番号：02205593
林元 展人 (HAYASHIMOTO NOBUHITO)
(財) 実験動物中央研究所・ICLAS モニタリングセンター・研究員
研究者番号：30332208