

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07717

研究課題名(和文) 実験動物由来人獣共通感染症および主要感染症モニタリング用多項目イムノクロマト法

研究課題名(英文) Studies on the immunochromatography for detecting antibody to major zoonoses and infectious diseases among laboratory rat and mouse.

研究代表者

有川 二郎 (ARIKAWA, Jiro)

北海道大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：10142704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：実験用ラットの感染症(センダイウイルス感染症、ティザー病、マイコプラズマ感染症、唾液腺涙腺炎ウイルス感染症、腎症候性出血熱)、及び、実験用マウスの感染症(マウス肝炎、センダイウイルス感染症、ティザー病、マイコプラズマ感染症)について、上記感染症病原体の菌体抽出抗原もしくは固定ウイルス粒子とProtein A標識金コロイド粒子を用い、IgG検出イムノクロマト法テストストリップを作成した。ラットのマイコプラズマ感染症とティザー病を除き、免疫血清や動物血清を用いた解析で、十分な感度と特異性を示し、血清診断法として有効な試験法であった。また本法は、希釈全血液も使用可能で、簡便かつ迅速な試験法であった。

研究成果の概要(英文)：Immunochromatography test for detecting antibody against causative agents of diseases of laboratory rat (Sendai virus, Tyzzer's disease, Mycoplasma, sialodacryoadenitis virus, hemorrhagic fever with renal syndrome) and laboratory mouse (mouse hepatitis, Sendai virus, Tyzzer's disease, Mycoplasma) was developed by using extracted antigen or virus particle as antigens and Protein A labeled colloidal gold particle. Results with immune serum and rat and mouse sera collected from multiple animal facilities showed the sufficient specificity and sensitivity. Further, this immunochromatography test is available with diluted blood specimens. These results indicated that this immunochromatography test is rapid and sensitive serodiagnostic tool among laboratory mouse and rats.

研究分野：ウイルス学

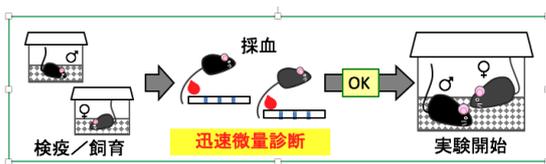
キーワード：イムノクロマト 実験動物 モニタリング 人獣共通感染症 血清診断

1. 研究開始当初の背景

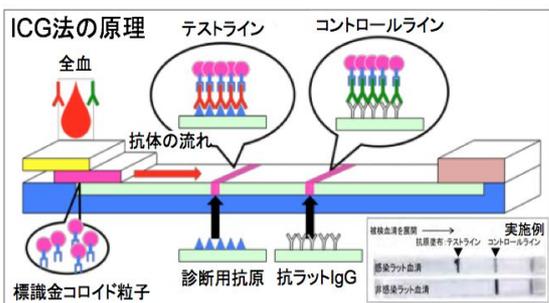
遺伝子改変マウスやラットの生命科学研究所への使用が増加したことに伴い、それら実験動物の感染症への予防がますます重要になった。従来、おとり動物の検査によって感染症の検出が行われてきたが、以下の問題点が明らかとなり、従来のおとり動物を用いた検査に限界が生じている。

- (1) 多系統動物の維持の増加により多数の「おとり動物」が必要。
- (2) 少数での維持・分与の増加により「抜き取り検査」ができない。
- (3) 個別換気飼育の増加により「おとり動物」への感染が成立しづらい。

これらの問題を解決するため、対象個体毎に安楽死させずにその後の繁殖に使用できる状態で検査することが必要となり、微量全血・高感度診断法の開発が必要とされている。

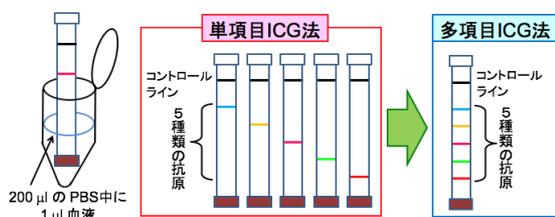


ハンタウイルス組換え抗原を用いて、ヒトとラット血清を対象としたイムノクロマト (ICG) 法に関する基礎的研究を実施し、高感度、高特異性、簡便、迅速な診断法である事を確認した (Amada, Arikawa, et al., J. Virol Methods 2013; Amada, Arikawa et al Virol J 2014)。そこで、簡便かつ高感度の診断法として、イムノクロマト法に注目した。



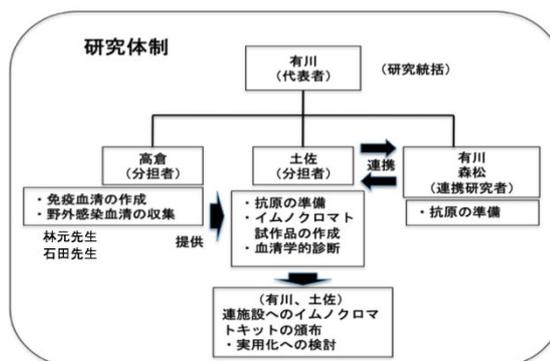
2. 研究の目的

- (1) ELISA 使用抗原を応用したイムノクロマト (ICG) 法の確立
マウスとラットを対象とする人獣共通感染症を含む主要感染症を対象。
- (2) 全血を使用する ICG 法を開発
全血を PBS で希釈後直接測定。迅速、簡便化。
- (3) 多項目(マルチプレックス) ICG 法に発展
複数の病原体に対する抗体を同時に測定する方法に発展させる。



3. 研究の方法

(1) 研究体制



(2) 検出対象とした主要感染症

赤枠で示した感染症は、各種 ELISA キット用として既に作成されている抗原がイムノクロマト法に適用出来るか検討するため、高倉 (実中研) より、赤枠の病原体 (MHV, HLV, Tyzzer, Myco, SDAV) の抗原と抗血清の供与を得た。

人獣共通感染症を含む主要感染症(7疾患)

| 動物 | 疾患名 | 抗原 | マウス | ラット |
|------------|--------------------|------------|-----|-----|
| マウス | リンパ球性疥癬腫炎 (LONV)* | 大腸菌発現組換え抗原 | 0 | - |
| | マウス肝炎 (MHV) | 固定ウイルス粒子 | 0 | - |
| マウス ラット | センダイウイルス感染症 | 固定ウイルス粒子 | 0 | 0 |
| | ティザー病 | 菌体抽出抗原 | 0 | 0 |
| マイコプラズマ感染症 | 0 | | 0 | |
| ラット | 種液腺疫ウイルス感染症 (SDAV) | 固定ウイルス粒子 | - | 0 |
| | 腎症候性出血熱 (HFRS)* | 組換え核蛋白抗原 | - | 0 |

(3) 用いた抗原及び抗血清の詳細

抗原

- HVJ : 1) タンパク濃度 465µg/ml 0.43ml (2015年8月26日)
- MHV : 1) タンパク濃度 390µg/ml 1.02ml (2015年8月26日)
2) タンパク濃度 970µg/ml 0.50ml (2015年11月24日)
- Myco : 1) タンパク濃度 790µg/ml 0.25ml (2015年8月26日)
- Tyzzzer : 1) タンパク濃度 331µg/ml 0.12ml (2015年8月26日)
2) タンパク濃度 580µg/ml 0.50ml (2015年11月24日)

抗血清(10倍希釈血清で供与)

- マウス
 - HVJ : 1) 0.5ml (2015年8月26日)
 - MHV : 1) 0.5ml (2015年8月26日)
 - Myco : 1) 0.5ml (2015年8月26日)
 - Tyzzzer : 1) 0.5ml (2015年8月26日)
- ラット
 - HVJ : 1) 0.5ml (2015年8月26日)
 - MHV : 1) 0.5ml (2015年8月26日)
 - Myco : 1) 0.5ml (2015年8月26日)
 - Tyzzzer : 1) 0.5ml (2015年8月26日)
2) ① 0.5ml (2016年1月14日)
3) ② 0.5ml (2016年1月14日)

4. 研究成果

(1) ラットとマウス血清を用いた多項目 ICG 法の抗原と抗血清の濃度の検討

既に検出条件が確立している HFRS の条件を参考に各抗血清の希釈倍率を 200 倍で実施し、抗原の濃度を検討した。

また、Tyzzzer と SDAV に関しては、抗原の濃度を 2 倍にして、各抗血清の希釈倍率を検討した。

これらの成績により、各感染症ごとに検査において使用する抗原と抗血清の濃度を決定した。

| ラット | 検出条件 | |
|--------------------|----------|-------|
| | 抗原 | 抗血清 |
| 腎症候性出血熱(HFRS) | 1.0mg/ml | x 200 |
| マイコプラズマ感染症(Myco) | 1.0mg/ml | x 200 |
| センダイウイルス感染症(HVJ) | 0.5mg/ml | x 200 |
| ティザー病(Tyzzzer) | 0.6mg/ml | x 200 |
| 唾液腺腺炎ウイルス感染症(SDAV) | 1.0mg/ml | x 200 |

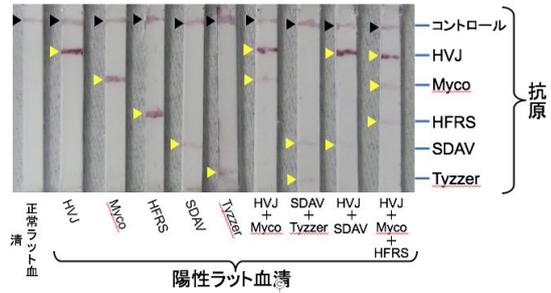
| マウス | 検出条件 | |
|------------------|---------------|-----------|
| | 抗原 | 抗血清 |
| リンパ球性脈絡髄膜炎(LCMV) | 抗原と抗血清の入手先が未定 | |
| マウス肝炎(MHV) | 0.5mg/ml | x 200 |
| センダイウイルス感染症(HVJ) | 0.5mg/ml | x 200 |
| ティザー病(Tyzzzer) | 0.6mg/ml | x 100-200 |
| マイコプラズマ感染症(Myco) | 非特異反応を検出 | |

(2) ラット血清を用いた多項目 ICG 法の成績

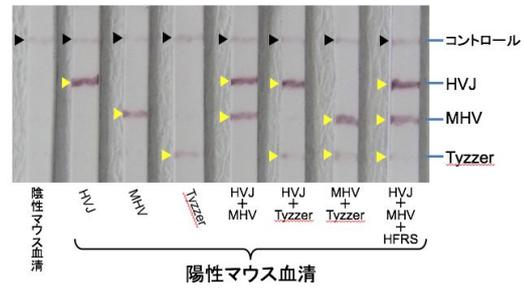
HVJ, Mycoplasma, HFRS, SDAV, Tyzzzer の 5 種類の抗原を塗布し、それぞれに対する陽性ラット血清を用いて反応性を検討した。

各抗血清において該当する抗原位置にラインが検出され、他の抗原位置にはラインが検出されなかった。また、複数の抗

血清を混合した血清では、該当する複数の抗原が同時に検出された。



(3) マウス血清を用いた多項目 ICG 法の成績 HVJ, MHV, Tyzzzer の 3 種類の抗原を塗布し、それぞれに対する陽性ラット血清を用いて反応性を検討した。



各抗血清において該当する抗原位置にラインが検出され、他の抗原位置にはラインが検出されなかった。また、複数の抗血清を混合した血清では、該当する複数の抗原が同時に検出された。

(4) 多項目 ICG 法の検出感度の解析

マウス血清として、マウス肝炎ウイルス (MHV) 陽性検体：計 32 検体。

センダイウイルス (HVJ) 陽性検体：計 10 検体。

ティザー病 (Tyzzzer) 陽性検体：計 10 検体

ラット血清として、唾液腺腺炎ウイルス (SDAV) 陽性検体：計 32 検体

マイコプラズマ (Myco) 陽性検体：計 32 検体

腎症候性出血熱（HFRS）陽性検体：計 14 検体
 センダイウイルス（HVJ）陽性検体：計 10 検体
 ティザー病（Tyzzer）陽性検体：計 10 検体
 陰性検体：計 5 検体

以上の血清を用いて、多項目 ICG 法の検出感度を解析した。

| ラット | 各感染症の陽性検体 (ELISA 及び IFA で確定診断済み) | | | | | 陰性検体 (%) |
|--------|----------------------------------|-----------|-------------|------------|------------|----------|
| ICG 法 | HFRS (%) | Mycro (%) | HVJ (%) | Tyzzer (%) | SDAV (%) | |
| HFRS | 10/14 (71) | 0/32 (0) | 0/10 (0) | 0/10 (0) | 0/32 (0) | 0/5 |
| Mycro | 0/14 (0) | 0/32 (0) | 0/10 (0) | 0/10 (0) | 0/32 (0) | 0/5 |
| HVJ | 0/14 (0) | 0/32 (0) | 10/10 (100) | 0/10 (0) | 0/32 (0) | 0/5 |
| Tyzzer | 0/14 (0) | 0/32 (0) | 0/10 (0) | 3/10 (30) | 0/32 (0) | 0/5 |
| SDAV | 0/14 (0) | 0/32 (0) | 0/10 (0) | 0/10 (0) | 26/32 (81) | 0/5 |

| マウス | 各感染症の陽性検体 (ELISA 及び IFA で確定診断済み) | | | 陰性検体 (%) |
|--------|----------------------------------|-------------|------------|----------|
| ICG 法 | MHV (%) | HVJ (%) | Tyzzer (%) | |
| MHV | 10/10 (100) | 0/10 (0) | 0/10 (0) | 0/3 |
| HVJ | 0/10 (0) | 10/10 (100) | 0/10 (0) | 0/3 |
| Tyzzer | 0/10 (0) | 0/10 (0) | 9/10 (90) | 0/3 |

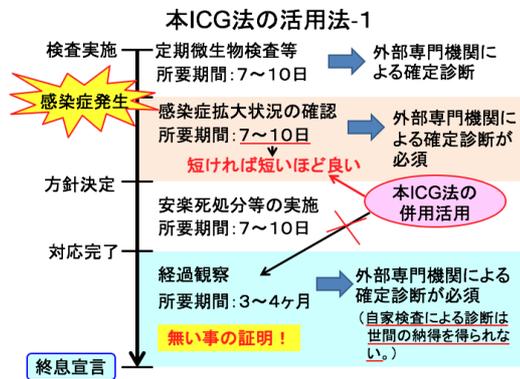
(5) 考察

ラットの多項目 ICG 法では、高い検出率を示した感染症もあったが、検出率の低い感染症もあり、検出率の向上が今後の検討課題である。

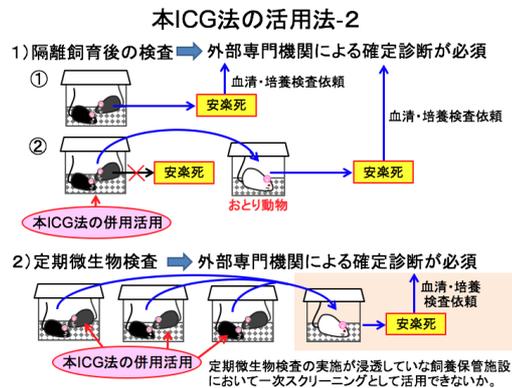
マウスの多項目 ICG 法は、検出対象とした MHV, HVJ 及び Tyzzer の 3 種類のマウスの主要感染症の血清診断に有用と考えられた。

本 ICG 法の活用法としては、以下の 3 点が考えられる。

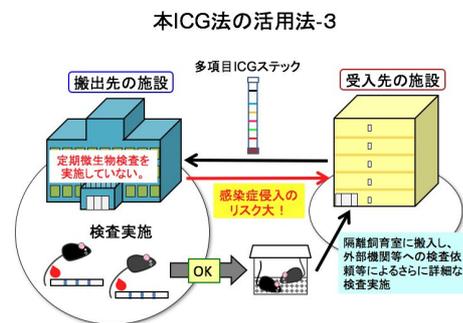
- i 動物施設などで感染症の発生が確認された際、自家検査として迅速に多数検体を検査し、感染拡大状況を速やかに明らかにする。また、感染終息を確認するため、多数検体を検査する。



- ii 隔離飼育を開始する前に自家検査をし、陽性だった場合は、おとり動物を用いた検査に要する時間を省くことができる。また、定期微生物検査の実施が浸透していない施設において、一次スクリーニングとして活用する。



- iii 搬出先の施設のあらかじめ ICG スティックを送付して微生物検査を実施してもらおう。これにより、陽性があった場合、感染動物が搬入される危険性が少なくなる。



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 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 土佐紀子、石田智子、吉松組子、林元展人、高倉彰、有川二郎：ラット・マウス主要感染症血清モニタリング用多項目イムノクロマト法の開発，第160回日本獣医学術集会，鹿児島大学，鹿児島・鹿児島市，2017年9月13日～2017年9月15日

2. 土佐紀子、吉松組子、石田智子、林元展人、塩川愛絵、高倉彰、有川二郎：マウス主要感染症血清モニタリング用イムノクロマト法の開発，第64回日本実験動物学会総会，ビッグパレットふくしま，福島・郡山市，2017年05月25日～2017年05月27日

3. Noriko Tosa, Kumiko Yoshimatsu, Tomoko Ishida, Nobuhito Hayashimoto, Kanae Shiokawa, Akira Takakura, Jiro Arikawa: Single and multiplex immunochromatographic test for diagnosis of major infections in laboratory rats, The 11th Japan-China International Conference of Virology, 琴弾荘，香川・観音寺市，2016年07月01日～2016年7月2日

4. 土佐紀子、吉松組子、石田智子、林元展人、塩川愛絵、高倉彰、有川二郎：ラット主要感染症モニタリング用イムノクロマト法の開発，第63回日本実験動物学会総会，ミュージア川崎シンフォニーホール，神奈川・川崎市，2016年5月18日～2016年05月20日

1.
〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
有川二郎 (ARIKAWA Jiro)
北海道大学・大学院医学研究院・特任教授
研究者番号：10142704

(2)研究分担者
土佐紀子 (TOSA Noriko)
北海道大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20312415

高倉彰 (TAKAKURA Akira)
公益財団法人実験動物中央研究所・事業部門・理事
研究者番号：60167484

(3)連携研究者
()
研究者番号：

(4)研究協力者
()