

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06456

研究課題名(和文) 実験動物主要感染症の迅速・簡便な個別別血清診断法：多項目イムノクロマト法の開発

研究課題名(英文) Development of rapid and simple individual diagnostic method for major infectious diseases in laboratory animals : a multiplex immunochromatographic test

研究代表者

土佐 紀子 (Tosa, Noriko)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：20312415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、実験用マウス・ラットの微生物モニタリングは、「おとり動物」を用いた間接的な検査方法から「対象個体」を直接検査する方法への変換・転換が迫られている。申請者等は、動物を安楽死させることなくマウス・ラットの感染症を同時に且つ迅速・簡便に検出できる個別別診断法の確立を最終目的とし、微量血清を用いた多項目イムノクロマト(ICG)法がマウス・ラット感染症の血清診断法として有用であることが明らかになってきた。本研究では、検出感度を維持した状態でICGスティックを3年間もの長期間保管可能な方法と常温郵送により国内だけでなく国外へも検出感度を維持した状態でICGスティックを供給可能な方法を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境保全や震災等の危機管理体制の観点から、実験動物の微生物モニタリングにおいても電気や特殊装置に依存しない検査方法を整備することは重要である。しかし、本ICG法のように、電気や特殊装置を使用することなく、簡便・迅速に肉眼で診断可能な検査法は未だ開発されていない。

本研究により、国外における実験動物用微生物検査の専門機関や検査設備等の環境が整っていない国や、国内における微生物モニタリングが実施できない小規模動物実験施設等への本ICGスティックの供給が可能となり、実験動物の微生物統御の向上、国内外の相互分与の活発化、および、動物福祉3Rsの「数の削減」に寄与し、生命科学研究の発展に貢献する。

研究成果の概要(英文)： In recent years, there has been a need to shift microbial monitoring of laboratory mice and rats from an indirect examination method using a "decoy animal" to a method of directly examining the target individual. The applicants have clarified that the multiplex immunochromatographic (ICG) test using trace serum is useful as a serological diagnostic method for infections in mice and rats, with the purpose of establishing an individualized diagnostic method that can simultaneously detect infectious diseases in mice and rats without euthanizing the animals. In this study, we clarified the conditions under which ICG sticks can be stored for long-term of 3 years while maintaining detection sensitivity, and the conditions under which ICG sticks can be supplied not only in Japan but also abroad by regular mail at room temperature.

研究分野：実験動物学

キーワード：多項目イムノクロマト 実験動物 微生物モニタリング 感染症 血清診断 簡便 保管条件 供給条件

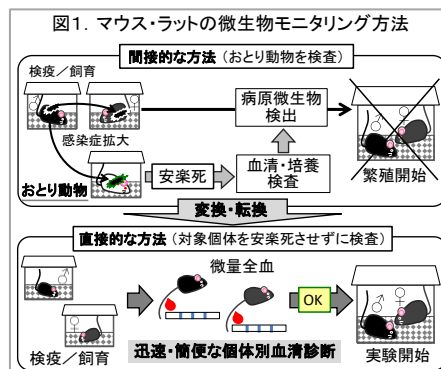
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

学術・科学技術の研究に供する動物の微生物モニタリングは、研究結果の信頼性の担保、および動物福祉の観点から必要不可欠である。

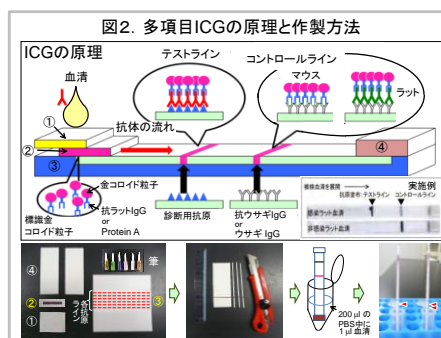
近年、多系統少数個体維持の増加や個別換気型飼育機の普及等により、従来の微生物モニタリング方法、すなわち「おとり動物」の感染症の検出を指標とする間接的な方法では感染症を摘発することが困難となっている(図1)。

上記の背景から微生物モニタリングは、「対象個体」を直接検査する方法へ大きく変換・転換する必要がある。この問題を解決するためには、動物を安楽死させることなく微量全血を用い、マウス、ラットの主要感染症を同時に且つ迅速・簡便に検出できる個別別血清診断法の確立が必要であると考えられる(図1)。



申請者らは、これまでに微量血清を用いてマウスおよびラットの感染症を同時に且つ迅速・簡便に検出できる「多項目イムノクロマト(ICG)法」の開発に取り組み、以下の感染症においては高い抗体検出率を示すことを確認し、動物を安楽死させずに迅速・簡便に検出できる個別別血清診断法として期待できるところまで研究を進めた(図2. 引用文献1, 2)。

- 1) マウス：マウス肝炎ウイルス感染症(MHV)、センダイウイルス感染症(HVJ)、ティザー病(Tyzzar)
- 2) ラット：唾液腺涙腺炎ウイルス感染症(SDAV)、HVJ、腎症候性出血熱(HFRS)



しかし、以下の課題を解決する必要がある。

- 1) 上記感染症 ICG 法の実用性が不明である。
- 2) 以下の主要感染症の ICG 法の確立が出来ていない。
 - ・肺マイコプラズマ感染症(Myco) (マウスとラット) : 伝染力が強く動物を致死させる恐れのある微生物
 - ・Tyzzar (ラット) : 免疫不全動物において問題となる微生物

2. 研究の目的

本研究では、多項目 ICG 法について、以下の二点を明らかにすることを目的とした。

- 1) 下記の感染症についての本 ICG 法の実用性を検証する。
 - ・マウス：MHV、HVJ、Tyzzar
 - ・ラット：SDAV、HVJ、HFRS
- 2) マウスとラットの Myco、および、ラットの Tyzzar の ICG 法の確立を行う。

3. 研究の方法

図3に示した実験計画の概要に従って下記の実験を実施した。

- 1) 多項目 ICG 法の実用性の検証 (マウス：MHV、HVJ、Tyzzar、ラット：SDAV、HVJ、HFRS)
 - ① 多数陽性検体の確保やICG法の検出感度・特異性を検証するための協力施設を得るため、国内外の学会等で関連機関・施設へのICGスティックの頒布活動を行い、下記の協力施設を得た。
 - ・島根大学 総合科学研究支援センター実験動物部門 (桐原氏、花井氏)
 - ・岡山大学 自然生命科学研究支援センター動物資源部門 (樫木氏)
 - ・鹿児島大学 農水産獣医学域獣医学系 共同獣医学部 獣医学科 (浅野氏)
 - ・National Laboratory Animal Center, National Applied Research Laboratories, Taiwan (Dr. Yu-Chia Su)
 - ・山口大学 大学研究推進機構 総合科学実験センター 生命科学実験施設 (村田氏)
 - ② 多項目 ICG スティックの保管方法を確立するため下記の実験を行った。

温度の影響に関しては室温、4度、-30度の条件を設定し、湿度および酸化の影響については乾燥剤の有無、抗酸化剤の有無、および真空状態の有無について検討した。保管期間3ヶ月間、6ヶ月間、12ヶ月間、18ヶ月間、および、36ヶ月間において、各病原体

に対する陽性血清を用いて検出・感度特異性への影響を調べた。

③ 多項目 ICG スティックの供給方法を確立するため下記の実験を行った。

実験 1)

高温多湿環境下での ICG スティックの輸送を想定し、ICG スティック作製直後に、40 度、湿度 60% の環境を維持した孵卵器内に、以下の条件で ICG スティックを保管し、保管後 3 日、5 日、10 日、14 日、21 日において、各病原体に対する陽性血清を用いて検出・感度特性を解析した。保管条件：チャック付ポリ袋（ポリ袋）、乾燥剤を入れたポリ袋、ポリ袋内を真空状態にしたもの（真空ポリ袋）、および、乾燥剤を入れた真空ポリ袋。

実験 2)

協力施設へ上記 1) ③ で良好な結果が得られた乾燥剤入りポリ袋に ICG スティックを収容し常温郵送し、協力施設において ICG 法を実施し、ELISA 等の自家検査結果または専門検査機関における検査結果と比較し、ICG 法の検出感度、特異性を明らかにした。

④ -30 度で保管した ICG スティックの輸送が可能であるか明らかにするため下記の実験を行った。

実験 1)

-30 度で 1 ヶ月間保管した ICG スティックを、30 分間室温に置いた後、40 度、湿度 60% の環境を維持した孵卵器内に上記 ③ 実験 1) の 4 条件で保管し、保管後 14 日、21 日において、各病原体に対する陽性血清を用いて検出・感度特性を解析した。

実験 2)

-30 度で 1 ヶ月間保管した ICG スティックを、30 分間室温に置いた後、協力施設に常温郵送し、協力施設において ICG 法を実施し、ELISA 等の自家検査結果または専門検査機関における検査結果と比較し、ICG 法の検出感度、特異性を明らかにした。

⑤ 協力施設から供与された自然感染陽性検体を用いて多項目 ICG 法の検出感度・特異性を明らかにした。

2) Myco (マウス、ラット) と Tyzzer (ラット) の ICG 法の確立

① 抗原を ICG メンブレンに塗布する際の処理方法を検討した。

4. 研究成果

環境保全や震災等の危機管理体制の観点から、実験動物の微生物モニタリングにおいても電気や特殊装置に依存しない検査方法を整備することは重要である。しかし、本 ICG 法のように抗原塗布した ICG スティックを抗体が希釈された PBS 溶液に浸けるだけで数分以内に肉眼で診断可能な検査法は未だ開発されていない (図 2)。マウスおよびラットの感染症の多項目 ICG 法の開発に取り組んでいるのは、国内外において申請者ら以外にはいない。

ICG スティックの作成には、時間、労力、および、ある程度の作成技術と設備が必要とされ (引用文献 1, 2)、抗原・抗体を準備することが困難な場合もあり、誰でも作成することが出来ないことが指摘されている。また、感染症の発生は予想できず、ICG スティックを保管・供給できる体制が必要とされている。

本研究で得られた結果は、長期間保管した ICG スティックを常温郵送で国内だけではなく国外へも供給が可能であることを示唆しており、国外における実験動物用微生物検査の専門機関や検査設備等の環境が整っていない国や、国内における微生物モニタリングが実施できない小規模動物実験施設等への本 ICG スティックの供給が可能となり、実験動物の微生物統御の向上、国内外の相互分与の活発化、および、動物福祉 3Rs の「数の削減」に寄与し、生命科学の発展に貢献すると考えられる。

1) 保管条件の検討

チャック付きポリ袋に入れて -30 度で保管したマウス用およびラット用 ICG スティックは、保存期間 36 ヶ月においても、乾燥剤の有無、抗酸化剤の有無、および真空状態の有無に関係なく、検査対象とした感染症において非特異的の反応を示すことなくコントロールラインおよびテストラインのバンドが明瞭だった (図 4)。一方、4 度、または、室温で保管した場合は、保管期間が長くなると薄くなる傾向を示し、保管期間 36 ヶ月の室温保管では、全ての条件でコントロールラインおよびテストラインのバンドが検出されなかった。また、抗酸化剤を入れて室温保存した ICG スティックは、保管期間 3 ヶ月でコントロールラインおよびテストラインのバンドが薄かった。



本結果は、チャック付きポリ袋に入れ-30 度で保管する簡便な方法で本多項目 ICG テストの検出感度を長期間維持することが可能であることが示唆している。

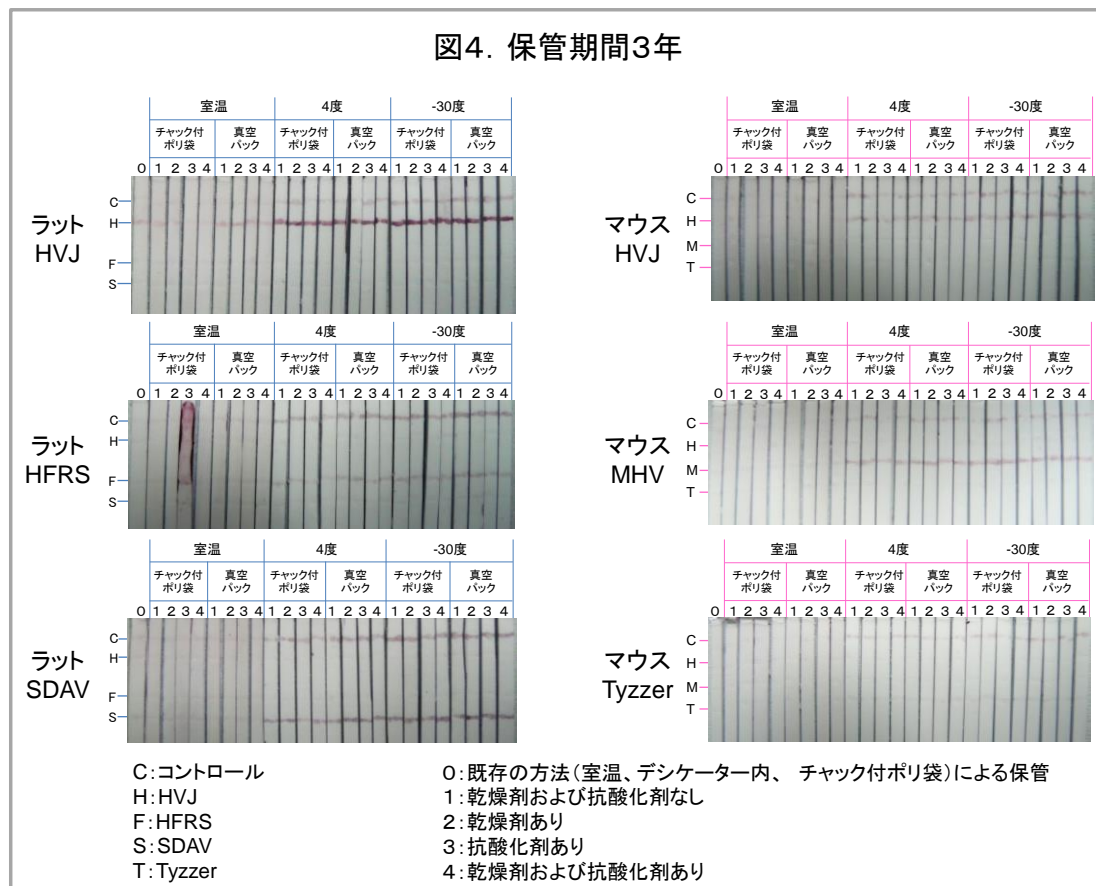
2) 輸送条件の検討

マウス用およびラット用 ICG スティックは、真空加工だけでなくチャック付きポリ袋に乾燥剤を入れることにより、40 度、湿度 60%の高温多湿の環境下で 21 日間の保管においても、各病原体の陽性血清に対して非特異的反応を示すことなくコントロールラインおよびテストラインが検出された (図 5A にマウス HVJ と MHV の結果を示した)。

次に、良好な結果が得られた乾燥剤入りポリ袋に ICG スティックを収容し協力施設へ ICG スティックを常温郵送し、協力施設において各感染症が陰性であることを確認した血清・血漿および全血を用いて検出感度への影響を解析した。マウス血清・血漿検体 85 個、及び、ラット血清・血漿検体 68 個、全てにおいてコントロールラインが明瞭に検出され、非特異的反応は見られなかった。一方、全血検体においては、マウス 45 個中 2 個、ラット 27 個中 6 個において、非特異的反応が検出された。

さらに、-30 度で保管した ICG スティックにおいても、乾燥剤入りチャック付きポリ袋に収容することにより検出感度を維持した状態で常温郵送が可能か確認するため、-30 度で一ヶ月間保管した ICG スティック (マウス用およびラット用) を 40 度、湿度 60%の高温多湿の環境下で保管したところ、保管期間 21 日においても、真空加工だけでなくチャック付きポリ袋に乾燥剤を入れることにより、各病原体の陽性血清に対して非特異的反応を示すことなくコントロールラインおよびテストラインが検出された (図 5B マウス HVJ と MHV の結果を示した)。

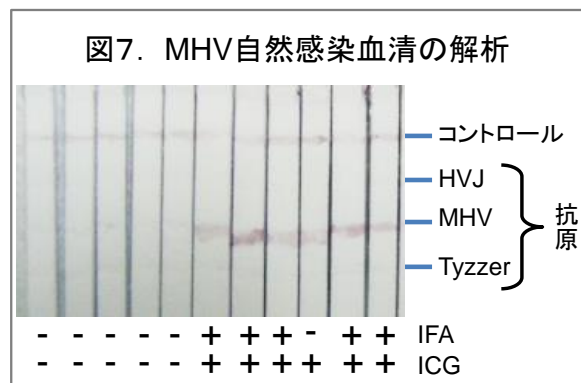
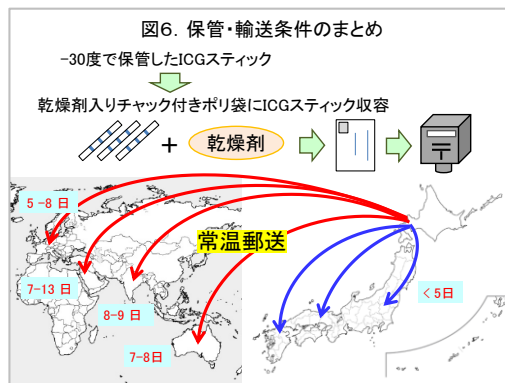
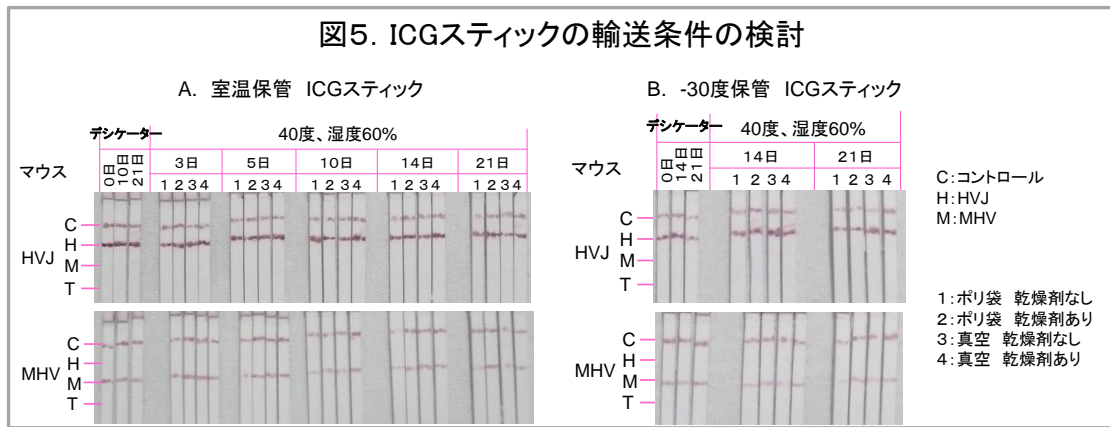
本結果は、血清・血漿を検査試料とした場合は、乾燥剤入りチャック付きポリ袋に ICG スティック収容した常温郵送による簡便な方法で、検出感度を維持した状態で国内だけではなく国外へも ICG スティックの供給することが可能であることを示唆している (図 6)。一方、全血検体において非特異的反応が検出された原因については、郵送条件によるものなのか、または血球成分によるものなのかは、今後さらに解析する必要があると考えられる。



3) 自然感染血清における本 ICG 法の検出感度の検討

協力施設より供与された IFA にて確定診断した MHV 自然感染血清 (6 検体) と非感染血清 (6 検体) について本 ICG 法を実施したところ、非感染血清 1 検体において陽性を示したが、MHV 自然感染血清では全て陽性を示した (図 7)。本結果は、自然感染血清においても本 ICG 法で抗体検出が可能であることを示唆している。

図5. ICGスティックの輸送条件の検討



<引用文献>

1. Tosa N, Ishida T, Yoshimatsu K, Hayashimoto N, Shiokawa K, Takakura A, and Arikawa J: Simultaneous serodetection of major rat infectious pathogens by a multiplex immunochromatographic assay. *Exp. Anim.* 70(2), 161-168, 2021 (査読有) doi: 10.1538/expanim.20-0099. Online ahead of print. PMID: 33177250
2. Tosa N, Ishida T, Yoshimatsu K, Hayashimoto N, Shiokawa K, Takakura A, and Arikawa J: Development of a multiplex immunochromatographic test for serological diagnosis of major infectious diseases in laboratory mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 58(6), 790-796, 2019 (査読有)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tosa N, Ishida T, Yoshimatsu K, Hayashimoto N, Shiokawa K, Takakura A, and Arikawa J	4. 巻 70(2)
2. 論文標題 Simultaneous serodetection of major rat infectious pathogens by a multiplex immunochromatographic assay.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp. Anim.	6. 最初と最後の頁 161-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.20-0099.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土佐紀子、石田智子、吉松組子、林元展人、高倉彰、有川二郎
2. 発表標題 ラット・マウス感染症血清診断用多項目イムノクロマトスティックの保管条件の検討
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会（仙台）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土佐紀子、石田智子、吉松組子、林元展人、高倉彰、有川二郎
2. 発表標題 ラット・マウス感染症血清診断用多項目イムノクロマトスティックの保管条件の検討
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会（オンライン）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土佐紀子、石田智子、吉松組子、林元展人、高倉彰、有川二郎
2. 発表標題 マウス感染症血清診断用多項目イムノクロマトスティックの輸送条件の検討
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会（筑波）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土佐紀子
2. 発表標題 IVCシステムにおける感染事例（ネズミ盲腸蟻虫・ネズミ大腸蟻虫）への対応・原因究明・対策
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会（筑波）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐紀子、石田智子、吉松組子、林元展人、高倉彰、有川二郎
2. 発表標題 マウス感染症血清診断用多項目イムノクロマトスティックの抗体検出感度に及ぼす温度と湿度の影響検討
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会（オンライン）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tosa N, Ishida T, Yoshimatsu K, Hayashimoto N, Takakura A, Arikawa J
2. 発表標題 Analysis of storage and transport conditions of multiplex ICG sticks for diagnosis of infectious diseases in rats and mice.
3. 学会等名 The 9th AFLAS Congress 2023, Jeju, Korea（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1) 9th AFLAS Congress 2023 Travel Award, Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations, September, 2023
2) 土佐紀子：マウス用個別換気飼育（IVC）システムにおける蟻虫感染事例，寄稿，LABIO 21 91, 17-21, 2024

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林元 展人 (Hayashimoto Nobuhito) (30332208)	公益財団法人実験動物中央研究所・ICLASモニタリングセンター・センター長 (72611)	
研究分担者	石田 智子 (Ishida Tomoko) (40311237)	公益財団法人実験動物中央研究所・ICLASモニタリングセンター・副センター長 (72611)	
研究分担者	森松 組子 (吉松組子) (Yoshimatsu Kumiko) (90220722)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授 (10101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高倉 彰 (Takakura Akira)	公益財団法人実験動物中央研究所 (72611)	
研究協力者	有川 二郎 (Arikawa Jiro)	長崎大学	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
その他の国・地域(台湾)	National Laboratory Animal Center		