



Title	沖縄島産マンゴースにおけるELISA法を用いた血清診断のための二次抗体の選定
Author(s)	石橋, 治; 角田, かおり; 西島, 拓; 飯塚, 信二; 須藤, 健二; 山下, 勝弘; 小倉, 剛; 砂川, 勝徳; 仲田, 正
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(55): 7-10
Issue Date	2008-12
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/9908
Rights	

沖縄島産マングースにおける ELISA 法を用いた 血清診断のための二次抗体の選定

石橋治^{1,2*}, 角田かおり¹, 西島拓¹, 飯塚信二³, 須藤健二⁴, 山下勝弘⁵, 小倉剛¹, 砂川勝徳¹, 仲田正⁶

1 琉球大学農学部生産環境学科, 2 厚生労働省広島検疫所, 3 厚生労働省神戸検疫所,
4 株式会社南西環境研究所, 5 八千代エンジニアリング株式会社九州支社, 6 琉球大学農学部生物生産学科

Selection and test of the serodiagnostic test with IgG-ELISA method in the small Asian mongoose.

Osamu ISHIBASHI^{1,2*}, Kaori SUMIDA¹, Taku NISHIJIMA¹, Shinji IIZUKA³, Kenji SUDO⁴,
Katsuhiro YAMASHITA⁵, Go OGURA¹, Katsunori SUNAGAWA¹ and Tadashi NAKADA⁶

¹Department of Environmental Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus,

²Hiroshima Quarantine Station, Ministry of Health, Labour and Welfare, ³Kobe Quarantine Station,

Ministry of Health, Labour and Welfare, ⁴Nansei Environmental Laboratory Co., Ltd.,

⁵Yachiyo Engineering Co., Ltd., ⁶Department of Bioproduction, Faculty of Agriculture,

University of the Ryukyus,

Abstract

The small Asian mongoose (*Herpestes javanicus*) was introduced from India in 1910 to control rat and habu snake (*Protobothrops flavoviridis*) populations on Okinawajima island. It has been clarified that the mongoose possesses *Leptospira* and *Salmonella*. On human beast common infectious disease with these situations or the possibility in which the mongoose propagates, it is very important to investigate the infection status in prevention of epidemic. There is variously serodiagnostic method epidemiologically used at present, and it has the defect for economical efficiency and sensitivity. However, it is possible to comparatively little do in labor and time that the IgG-ELISA method is excellent for economical efficiency and both sensitivity and that it catches it in the experiment. In this experiment, secondary antibody which was optimum for doing the IgG-ELISA method using the serum of the mongoose for the mongoose was selected. Eleven kinds of secondary antibody marketed were used for the experiment. In-human, rabbit, rat, guinea pig, hamster, cat, mouse IgG, protein G, protein L that there was color reaction by the junction with IgG antibody of the mongoose in two types of anti-ferret IgG and protein A and that the hoop resists it, the reaction hardly could be accepted. However, there was the significance for OD value which became an index to the intensity of the reaction by the individual in protein A. And, the difference of the OD value between individuals of the result which the OD value is inferior to protein A showed the proportion of the change in which the OD value is fixed for the dilution degree of the secondary antibody small in anti-ferret IgG. Therefore, available and optimum secondary antibody to the mongoose seems to be anti-ferret IgG.

キーワード：マングース、二次抗体、IgG-ELISA、沖縄島

Key word : small Asian mongoose, secondary antibody, IgG-ELISA, Okinawajima island

緒言

沖縄島のジャワマングース (*Herpestes javanicus*) (以下、マングースとする) は、ネズミやハブ (*Protobothrops flavoviridis*) を駆除するために1910年にインドから移入された外来動物である¹⁾が、本来その地域に存在しない動物であるため、その存在は移入された環境に対して多岐にわたり影響を与えていると考えられる。近

年、マングースはほぼ沖縄島の全域に生息範囲を拡大し^{2,3)}、在来動物の捕食による生態系への影響^{4,5)}や養鶏場における被害⁶⁾等の問題を引き起こしており、また、感染症病原体の保有や媒介の可能性に関しては、レプトスピラ^{7,8)}、サルモネラ^{9,10)}およびE型肝炎¹¹⁾について明らかとなってきた。

感染症の検査方法としては、菌の分離やPCRなどの抗原学的検査法と血球凝集反応、補体結合反応、ラテックス凝集反応、酵素

* Corresponding author (E-mail: ishibashi-osamu@keneki.go.jp)

免疫測定法 (Enzyme Linked Immuno-solvent assay ; ELISA 法等) などの血清学的検査法がある¹²⁾が、菌の培養に時間を要する抗原学的検査法に比べ、培養過程を伴わない血清学的検査法は迅速診断法として有効な方法であり、特に、ELISA 法は経済性と鋭敏性に優れ、同時に多数の検体を処理できる利点がある¹³⁻¹⁵⁾など、野生動物を介した感染症調査の手法として優れている。

我々は ELISA 法のうち、病原体特異 IgG 抗体の有無を検査する手法である IgG-ELISA 法を用いて、マンガースが持つ可能性のある病原体の血清学疫学的調査を行うこととしているが、当該検査に必要となるマンガース IgG を認識するペルオキシダーゼ (Horse Radish Peroxydase ; HRP) 標識二次抗体等は市販されていない。一般的には、マンガースの IgG をウサギ (*Oryctolagus cuniculus*)、ヒツジ (*Ovis aries*) またはヤギ (*Capra aegagrus*) などに接種して得られる免疫血清を利用するが、自家調製することが困難なことから、入手しやすい市販の各種動物 IgG 認識二次抗体等を用いてマンガース IgG との反応性を比較検討し、最適な二次抗体の選定を行った。

実験材料および方法

1. 材料

1) 被検血清

2004年7月から9月に沖縄島東村にて捕獲されたマンガース雄3頭をペントバルビタールナトリウム (ネンプタル®、大日本製薬、0.7mg/BW、腹腔内投与) で深麻酔後、腹大動脈からの全採血によって血液を得た。血液は遠心分離 (3,000rpm、15分間) を行い、血清部分を 1.5ml チューブに入れ-20°C で分析まで保存した。

2) 市販二次抗体等

HRP 標識された抗-動物 IgG 抗体 (抗-ヒト、抗-ウサギ、抗-ラット、抗-モルモット、抗-マウス (ZYMED 社)、抗-ハムスター (SBA 社)、抗-フェレット (BETHYL 社)、抗-ネコ (ROCKLAND 社)) ならびに、動物 IgG と特異的に結合する細菌由来タンパク質であるプロテイン A、プロテイン G (ZYMED 社)、プロテイン L (ACTigen 社) の各 HRP 標識物質の計 11 種類を用いた。

3) 発色基質の調製

発色基質液はクエン酸緩衝液 (精製水 1000ml あたり、クエン酸 4.68g およびリン酸二ナトリウム・二水和物 9.12g を溶解) 25ml にオルトフェニルジアミン 1錠 (和光純薬、10mg/錠) を溶解し、使用直前に 30%過酸化水素水 10 μ l を加えて遮光しながら調製した。

2. 実験方法

本実験は Lee BH¹⁶⁾ の方法に準じて行った。

1) 被検血清の固層化

被検血清を炭酸・重炭酸緩衝液 (精製水 1,000ml に炭酸ナトリウム 1.6g と重炭酸ナトリウム 2.92g を溶解) で 100 倍希釈し、マイクロプレート (Nunc Maxysorp flat plate) の well に 100 μ l ずつ分注し、4°C で一晩静置し固層化した。

なお、被検血清と二次抗体以外の非特異反応を見るため、被検

血清を固層化しない空試験区を設けた。

2) 二次抗体の投入

一晩静置したマイクロプレートの各 well を 0.05% Tween20 添加リン酸緩衝液 (以下、PBST とする) を用いて洗浄し、5% スキムミルク (Difco 製) 添加 PBST (以下、Milk-PBST とする) 200 μ l を各 well に分注し、1 時間室温にて静置し、再度 PBST で 2 回洗浄した。Milk-PBST で各種の二次抗体をそれぞれ 1,000 倍から 16,000 倍まで 2 倍段階希釈し、各 well に 100 μ l ずつ分注し、室温にて 1 時間静置した。

3) 発色・測定

各 well を PBST で 4 回洗浄の後、発色基質液 100 μ l を分注し、10 分間反応させる。反応後、1M 硫酸 50 μ l を各 well に分注して反応を停止させ、各 well について 492nm の吸光度を測定した。吸光度測定には、マイクロプレートリーダー (コロナ (株)、MTP-32) を使用した。被検血清を固層化した well の値から空試験区の値を差し引いた値を OD 値とした。

実験結果

1. 二次抗体の反応性

実験に用いた 3 頭のマンガースごとに 11 種の二次抗体を 1,000 倍から 16,000 倍希釈して反応させた。その結果、抗-ヒト、ウサギ、モルモット、ハムスター、ネコの各 IgG およびプロテイン G とプロテイン L は、OD 値が 0.05 未満であり、ほとんど反応がなかった (図 1)。抗-マウス IgG における 1,000 倍希釈から 4,000 倍希釈の OD 値は 0.15 から 0.01 の反応があったが、それ以降は値にならなかった。抗-フェレット IgG では 1,000 倍希釈から 16,000 倍希釈まで 1.18 から 0.12 の反応が見られた。また、プロテイン A では 1,000 倍希釈から 16,000 倍希釈まで 1.84 から 1.07 の反応が見られた (図 2)。

2. 二次抗体の希釈倍率と反応の相関

全ての希釈倍率において反応が見られた抗-フェレット IgG とプロテイン A について希釈倍率を x 、OD 値を y として回帰式を求めた。その結果、抗-フェレットでは $y = -0.2597x + 1.3097$ 、 $R^2 = 0.9288$ であり、プロテイン A では $y = -0.2004x + 2.1040$ 、 $R^2 = 0.9742$ となり、希釈倍率と OD 値には負の相関が見られた。また、希釈倍率 1,000 倍時の OD 値を 100 とし、希釈倍率 16,000 倍時の OD 値の割合を求めたところ、抗-フェレットは 10.3、プロテイン A は 57.8 であった。二次抗体の希釈倍率が高くなるにつれて抗-フェレットの OD 値の低下は顕著であった。また、二次抗体の希釈倍率における測定個体間の変動係数を求めたところ、抗-フェレットでは 17.8 から 30.9、プロテイン A では 33.9 から 39.0 であり、抗-フェレットの方が個体間のばらつきが少なかった (表 1)。

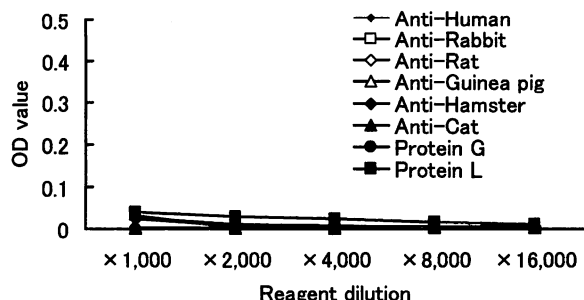


Fig. 1 Selection of secondary reagent to IgG-ELISA test on small Asian mongoose (8 kinds of reagents).

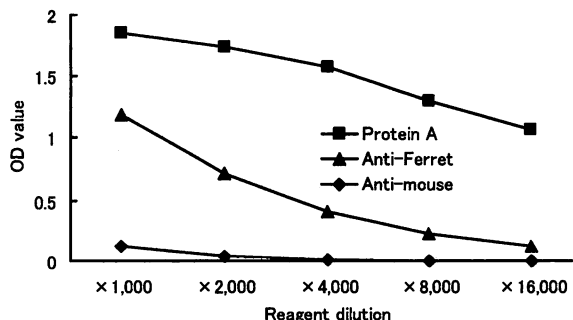


Fig. 2 Selection of secondary reagent to IgG-ELISA test on small Asian mongoose (3 kinds of reagents).

Table 1 Comparison of secondary reagent to IgG-ELISA test on small Asian mongoose.

Reagent	Reagent dilution					
	×1,000	×2,000	×4,000	×8,000	×16,000	
Protein A	OD492 ave.	1.846	1.738	1.572	1.291	1.068
	Max-Min	1.290	1.343	1.158	0.916	0.722
	S.D.	0.662	0.677	0.589	0.459	0.362
	CV	35.9	39.0	37.5	35.6	33.9
Anti-Ferret	OD492 ave.	1.179	0.714	0.406	0.233	0.122
	Max-Min	0.413	0.334	0.212	0.137	0.074
	S.D.	0.210	0.167	0.106	0.072	0.037
	CV	17.8	23.4	26.1	30.9	30.3

考 察

11 種類の市販の HRP 標識抗体等と沖縄島産のマンガース IgG との吸着反応を評価したのは本実験が初めてである。IgG-ELISA 法は、動物の感染症への罹患の有無を早急にかつ、経済的に測定する方法として有意義である。¹³⁻¹⁵⁾ この方法は適切な二次抗体の作成が重要であるが、すべての動物種について市販の二次抗体が作成されているわけではない。プロテイン A やプロテイン G については、実験動物や家畜動物、また、野生の様々な哺乳類に対する高い親和性を示しているが^{17, 18)}、マンガースに対する検討は行われていない。野生動物における感染症の調査を IgG-ELISA 法により行うために適切な二次抗体の選定を市販抗体の中から行うことは、早急な検査の実施という観点のみならず、検査精度管理上にも大きな意味があると考えられる。

今回の実験により、プロテイン A と抗-フェレットの市販二次抗体等にマンガース IgG との反応が見られた。反応値が最も高かったのはプロテイン A であったが、個体間のばらつきが大きいため、OD 値を陽性または陰性の判断基準として抗体保有の有無の検査を行う ELISA 法には不適であると考えられる。これに対して、抗-フェレットは二次抗体の各希釈倍率に対する OD 値の変化の割合が同一で、また、プロテイン A に比べて個体間のばらつきが小さい。これらのことより、抗-フェレットは今回用いた 11 種類の市販二次抗体の中では最もマンガースの調査に適していると考えられる。

要 約

感染症の検査として従来から用いられている病原体の培養を主とする検査法は、検査結果を得るまでに時間がかかるという欠点を有する。経済性と鋭敏性に優れる IgG-ELISA 法は、培養法に比べて検査時間の短縮に貢献できるが、検査対象の動物種ごとに適切な二次抗体の選定が必要である。そこで今回ジャワマンガースについて市販の 11 種類の二次抗体について検討した。その結果、抗-フェレット IgG とプロテイン A の 2 種類において、ジャワマンガースの IgG 抗体との接合による発色反応が認められた。このうち、プロテイン A はジャワマンガース個体間において反応の強さの有意差が認められたが、抗-フェレットでは反応の強さはプロテイン A より低い、ジャワマンガース個体間の差は少なく、二次抗体の希釈倍率に対して一定の変化を示した。以上のことから、ジャワマンガースにおける ELISA 法に最適な二次抗体は抗-フェレット IgG であると考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、琉球大学農学部の平良東紀准教授ならびに厚生労働省新潟検疫所望月靖所長に大変お世話になりました。また、本研究にご協力いただきました琉球大学農学部亜熱帯動物学講座の学生の皆さまに感謝申し上げます。

* Corresponding author (E-mail: ishibashi-osamu@keneki.go.jp)

文 献

- 1) 岸田久吉. 1931. 渡瀬先生とマングース輸入. 動物学雑誌 43 : 70-78.
- 2) 梁井貴史. 2002. 渡瀬庄三郎によるマングース放獣の謎. 川口短大紀要 第16号.
- 3) 阿部慎太郎. 1994. 沖縄島の移入マングースの現状. チリモス 5 : 34-43.
- 4) 小倉剛, 川島由次, 織田統一. 2003. 外来動物ジャワマングースの捕獲個体分析および対策の現状と課題. 獣医畜産新報 56 : 295-301.
- 5) 小倉剛, 佐々木健志, 当山昌直, 嵩原建二, 仲地学, 石橋治, 川島由次, 砂川勝徳, 織田統一. 2002. 沖縄島北部に生息するジャワマングース (*Herpestes javanicus*) の食性と在来種への影響. 哺乳類科学 42 : 53-62.
- 6) 与儀元彦, 小倉剛, 石橋治, 川島由次, 砂川勝徳, 織田統一. 2006. 沖縄島の養鶏業におけるマングースの被害. 沖縄畜産 41 : 5-13.
- 7) 福村圭介. 1984. 沖縄県のレプトスピラ症の疫学的研究第2報 沖縄島本島におけるレプトスピラ症およびレプトスピラの血清学的研究. 山口医学 33 : 269-277.
- 8) 石橋治, 阿波根彩子, 中村正治, 盛根信也, 平良勝也, 小倉剛, 川島由次, 仲田正. 2006. 沖縄島北部のジャワマングース (*Herpestes javanicus*) およびクマネズミ (*Rattus rattus*) におけるレプトスピラ (*Leptospira* spp.). 日本野生動物医学学会誌 11 : 35-41.
- 9) 新田芳樹, 大村修二, 又吉正直, 翁長友理子. 2002. 野生鳥獣からのサルモネラ分離と疫学的関連性. 家畜保健衛生業績発表会集録. 沖縄県 : 33-36.
- 10) 石橋治, 吉川貴之, 飯塚信二, 新田芳樹, 我如古創, 須藤健二, 小倉剛, 砂川勝徳, 仲田正. 2007. 沖縄島の家畜および野生動物におけるサルモネラ調査. 琉球大学農学部学術報告 54 : 47-52.
- 11) Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T and Takeda N. 2006. Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am J Trop Med Hyg* 74 : 932-936.
- 12) 那須勝, 平松和史, 平井一弘. 1997. 感染症診断の進歩. 感染症. 井村裕夫, 尾形悦郎, 高久史麿, 垂井清一郎監修. 中山書店. 東京. 95-104.
- 13) 古賀宏延, 道津安正, 中島学, 長沢正夫, 中里博子, 重野秀明, 森賢治, 田中光, 伊藤直美, 河野茂, 重野芳輝, 山口恵三, 広田正毅, 斉藤厚, 原耕平. 1986. ELISA 法 (酵素免疫測定法) による *Legionella pneumophila* に対する血清抗体価測定に関する研究. 感染症学雑誌 60 : 443-452.
- 14) 三日月勝見, 平沢勉, 境陽子, 大原眞代子, 根縫弘子, 高橋恵子. 1992. モルモットにおける *Bordetella bronchiseptica* 感染の血清診断法としての Enzyme-linked immunosorbent assay の評価. *Exp Anim* 41 : 357-362.
- 15) Tsujimura K, Mizutani T, Kariwa H, Yoshimatsu K, Ogino M, Morii Y, Inagaki H, Arikawa J and Takashima I. 1999. A serosurvey of Borna disease virus infection in wild rats by a capture ELISA. *J Vet Med Sci* 61 : 113-117.
- 16) Lee BH, Yoshimatsu K, Araki K, Ogino M, Okumura M, Tsuchiya K, Kariwa H and Arikawa J. 2003. Detection of antibody for the serodiagnosis of hantavirus infection in different rodent species. *Arch Virol* 148 : 1885-1897.
- 17) Richman DD, Cleveland PH, Oxman MN, Johnson KM. 1982. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. *J Immunol* 128 : 2300-2305.
- 18) Akerstrom B, Brodin T, Reis K, Bjorck L. 1985. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol* 135 : 2589-2592.