

ウサギ抗マウスイムノグロブリンポリクローナル抗体をカップリングさせた。HBS-EP 緩衝液 (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20, pH 7.4) を用い、作製した各種マウスモノクローナル抗体を吸着させ、安定化を確認後、大腸菌で作製した各 MBP 融合蛋白質をロードし、再度安定化を確認後、各種マウスモノクローナル抗体をロードし、レゾナンスシグナルを観察した。

4. サンドイッチ ELISA

各蛋白質に対するモノクローナル抗体を 1 次抗体として用いた。2 次抗体として各蛋白質のポリクローナル抗体を、NHS-LC-biotin (PIEACE 社) にてビオチン化したものを用いた。1 次抗体を 100 mM 炭酸 Buffer (pH 9.5) にて希釈して、ELISA プレートに 12 時間 4°C で吸着させ、PBS-T (0.05% Tween20 in PBS) にて洗った後、ブロッキング試薬でブロッキングを 1 時間室温で行った。サンプルを載せ、1 時間室温で放置後、PBS-T で洗浄した。2 次抗体を加え、室温で 1 時間放置後、PBS-T で洗浄した。20,000 倍に希釈した Neutravidin-POD 溶液を加え、室温で 30 分放置後、PBS-T で洗浄し、酵素発色基質を加え発色させた、2 N の塩酸を加え反応停止し、450 nm で吸光度を測定した。

C. 研究結果

昨年度は、プロトタイプの ELISA 系を構築したが今年度はさらに感度を上げるべく様々な条件検討を行った。

1. モノクローナル抗体のピアコアによる解析

モノクローナル抗体の親和力、抗体同士のエピトープの重なりをピアコアにより調べた。B11a では、6 種類、B11b では、9 種

類のモノクローナル抗体を昨年作製したので、蛋白質濃度をそろえロードし、レゾナンスシグナルの強度等で抗体のスクリーニングを行い (図 1)、それぞれ有望と考えられる抗体の候補 2 種類を選んだ。それらを ELISA 系の 2 次抗体として使用した。

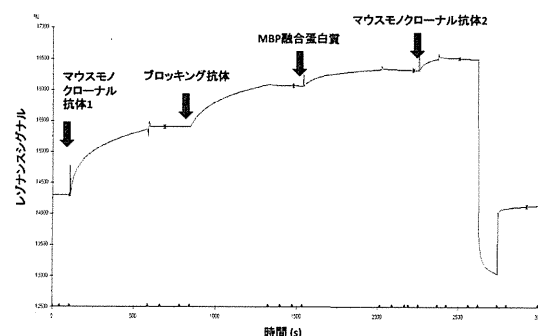


図 1. ビアコアによる抗体のスクリーニングの例

2. ブロッキング剤の検討

1 次抗体として 1. で選択したモノクローナル抗体、2 次抗体としてポリクローナル抗体、サンプルとして大腸菌で作製した GST 融合蛋白質を用いた。11 種類のブロッキング剤を検討した結果、AbDSerotec 社 ELISA ULTRABLOCK BUF033A を用いることにした。

3. 抗体の希釈溶液の検討

上記抗体の組み合わせ、選択したブロッキング剤を使用し、サンプルとして大腸菌で作製した GST 融合蛋白質を用い、2 次抗体の希釈液として 5 種類の溶液を検討した結果、東洋紡社の CanGet signal 1 を用いることにした。

4. B11a, B11b の ELISA 系の再構築

上記 2, 3 の条件にて、1 次抗体 2 次抗体の濃度の条件検討を行った。

B11a の ELISA 系については様々な抗体濃度を試したが、昨年構築した条件より良い条件が見つからなかったが、1 次抗体の濃度を 10 ug/ml から 2.5 ug/ml の濃度に下げ

ることが出来た。YPD 培地による *A. fumigatus* 培養上清中から精製した B11a 標品を用いて native な蛋白質を検出できることが分かった。

B11b に関しては、1 次抗体濃度 2.5 ug/ml、2 次抗体濃度 1 ug/ml で昨年より感度が上がる条件が見つかった。この系についても YPD 培地による *A. fumigatus* 培養上清中から精製した B11b 標品を用いて同様に検出できることが分かった。

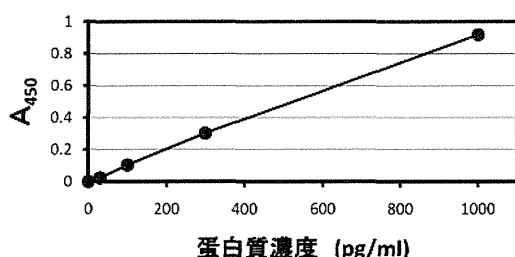


図 2. B11b の標準曲線

5. 培養液、マウスモデルでの検討

再構築した B11a, B11b サンドイッチ ELISA を用いて 8 種類の各種培養液中に放出される蛋白質について調べた。これら蛋白質は血清により誘導されることが分かっているため、培地中に血清を加えた実験区についても検討した。その結果、図 3 の様に培地の種類により放出量に差が見られた。B11a についても再構築した系を用いて検討した結果、培地の種類により放出量に差が見られた。

侵襲性肺アスペルギルス症マウスモデルから経時的に血清を調整し B11a, B11b の再構築した ELISA 系に供したが、再現性のある結果が得られなかった。

D. 考察

今年度は、様々な条件検討により ELISA 系の再構築を行ったが、系が不安定という問題が生じた。うまく行くとときには、数十

pg/ml までの感度が得られることもあるが、悪い時には ng/ml オーダーの感度しか得られないこともあり、両 ELISA 系とも安定した系を確立することが出来なかった。それが、マウスモデルでの検出の 1 つの原因であると考えられる。ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の組み合わせが問題である可能性があるため、今後モノクローナル抗体同士の ELISA 系を構築し検討することも必要と考えられる。

B11a, B11b とも分泌蛋白質であり、構築した ELISA 系で *A. fumigatus* の培養上清中の蛋白質が検出できたことは、糖鎖修飾されていても native な蛋白質を検出できることが分かった。

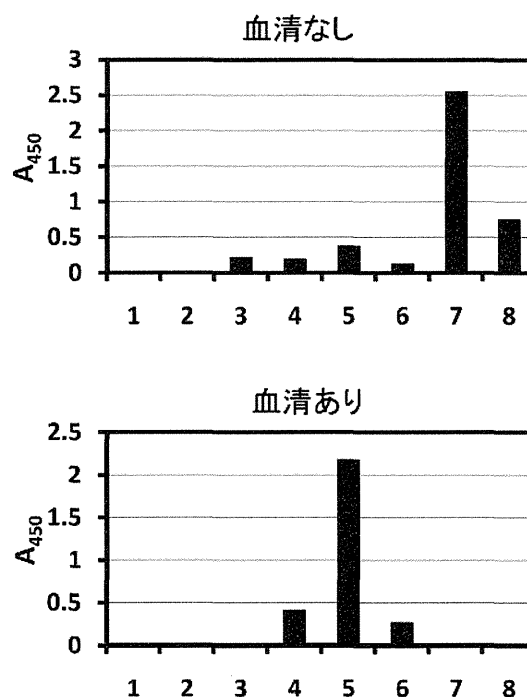


図 3. 8 種類の培養液中の B11b 蛋白質の検出

E. 結論

SST-REX 法を用いて得られた *A. fumigatus* の細胞外蛋白質のなかで 2 つの蛋白質 B11a, B11b についてサンドイッチ

ELISA 系の再構築を行った。B11a については改善が見られなかったが、B11b に関して感度を上げることができた。さらに、培養液中の B11a, B11b 蛋白質を検出できた。侵襲性肺アスペルギルス症マウスモデルの血清中の B11a, B11b の ELISA 系に供したが、再現性のある結果が得られなかった。

G. 研究発表

論文発表

英文

1. Miyazaki H, Kobayashi R, Ishikawa H, Awano N, Yamagoe S, Miyazaki Y, Matsumoto T. Activation of COL1A2 promoter in human fibroblasts by *Escherichia coli*. FEMS Immunol Med Microbiol. 65:481-487, 2012.
2. Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. Jpn J Infect Dis. 66:51-55, 2013.
3. Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, Tarumoto N, Niimi M, Ohno H, Doe M, Fujiwara N, Kinjo Y, Miyazaki Y. The mannan of *Candida albicans* lacking β -1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. Med Mycol. in press.
4. Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y.

Serum cholesterol promotes the growth of *Candida glabrata* in the presence of fluconazole. J Infect Chemother. in press.

5. Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. J Infect Chemother. in press.

学会発表

国際学会

1. Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
2. Umeyama T, Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Multi-locus sequence typing epidemiology of *Cryptococcus neoformans* strains clinically isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
3. Tanabe K, Ohno H, Umeyama T, Yamagoe S, Chibana H, Miyazaki Y. Genetic analysis of echinocandin-resistant *Candida glabrata* isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.

国内学会

1. 大野秀明, 田辺公一, 杉田 隆, 畠山修司, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 渋谷和俊, 亀井克彦, 宮崎義継. 北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性、病原因子の解析-国内臨床分離株を中心に-. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
2. 渋谷和俊, 大久保陽一郎, 大野秀明, 宮崎義継, 田辺公一, 金子幸弘, 山越智, 梅山 隆, 安藤常浩, 若山 恵. *Cryptococcus gattii* 感染症における病理組織学的解析. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
3. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質 B-11 の病原性の解析とサントールイッチ ELISA 系の構築. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
4. 名木 稔, 田辺公一, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* はユニークなステロールトランスポーターによりアゾール耐性となりうる. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
5. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. 侵襲性肺アスペルギルス症の主要原因菌 *Aspergillus fumigatus* による肺胞上皮細胞への接着と侵入. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
6. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* プロテインキナーゼの特異的阻害による病原性制御. 第 60 回日本化学療法学会学術集会. 4 月 26-27 日, 2012 年, 長崎.
7. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の肺胞上皮細胞への接着と侵入機構. 第 33 回関東医真菌懇話会学術集会. 5 月 26 日, 2012 年, 東京.
8. 宮崎義継, 荒岡秀樹, 梅山 隆, 田辺公一, 山越 智, 大野秀明. シンポジウム 2 症例から考える真菌症: 診断・治療の難しさ、感染症としての面白さ 4) 接合菌症を疑うときに何をするか. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会/第 95 回日本細菌学会関東支部総会. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
9. 金城雄樹, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. カンジダ細胞壁マンナンの構造と炎症性サイトカイン誘導の関係. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会/第 95 回日本細菌学会関東支部総会. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
10. 宮崎義継, 梅山 隆, 田辺公一, 山越智, 金城雄樹, 大野秀明. 教育講演-4 肺真菌症をいかに診断するか. 第 49 回日本臨床生理学会総会. 10 月 18-19 日, 2012 年, 長崎.
11. 田辺公一, 名木 稔, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 回日本化

- 学療法学会東日本支部総会/第 95 回日本細菌学会関東支部総会. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
12. 田辺公一, 名木 稔, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込み活性化機構. 第 41 回薬剤耐性菌研究会. 10 月 25-26 日, 2012 年, 下呂.
13. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 栃木直文, 笹井大督, 石渡誉郎, 中山晴雄, 下平佳代子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 職 玉珠, 北原加奈子, 山本慶郎, 渋谷和俊. マウス肺クリプトコッカス症モデルを用いた感染防御ならびに構築変換の解析. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
14. 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の生体内における病原因子; 鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
15. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 橋本ゆき, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の細胞壁、分泌蛋白質 B-11 の機能解析. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
16. 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の生体内における病原因子: 鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
17. 田辺公一, 名木 稔, 中山浩伸, 山越智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* における細胞外ステロール取り込み. 第 35 回日本分子生物学会年会. 12 月 11-14 日, 2012 年, 福岡.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得
なし。
- 実用新案登録
なし。
- その他
なし

