免疫クロマト法を原理とした犬糸状虫成虫抗原 検出キットの評価

鬼頭克也¹⁾ 村松昌武²⁾ 五井利恵子³⁾ 近藤昌弘³⁾
中野正和³⁾ 佐々木榮英¹⁾ 北川 均^{1)†}

- 1) 岐阜大学農学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)
2) 財畜産生物科学安全研究所 (〒229-1132 相模原市橋本台3-7-11)
3) ノバルティスアニマルヘルス(株) (〒105-6137 港区浜松町2-4-1
世界貿易センタービル37階)

(2002年4月19日受付・2002年10月15日受理)

要 約

新しく開発された免疫クロマトグラフ法を原理とする犬糸状虫成虫抗原検出キット(免疫クロマトキット)の検出能および信頼性を、2種類の従来製品(対照キットAおよびB)と比較した。免疫クロマトキットの検出能は3キットの中で最も高かった。信頼性は、犬糸状虫寄生犬を陽性に判定した率(感度)と非寄生犬を陰性に判定した率(特異性)で評価した。感度は末梢血マイクロフィラリア(mf)陽性の40例では免疫クロマトキットが100%,対照キットAとBはともに97.5%であった。mf陰性の12例では各キットとも58.3%であった。特異性はいずれのキットも100%(33例)であった。免疫クロマトキットは検出能が高く、感度および特異性は従来製品と同等であった。

——キーワード:犬糸状虫症,犬,犬糸状虫抗原検出キット,免疫クロマトグラフ法。

----- 日獣会誌 56, 28~31 (2003)

犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* 成虫の寄生診断は、末梢血マイクロフィラリア(mf)の検出[8, 14],超音波断層心エコー図法による成虫の確認[6],循環血液中に存在する犬糸状虫成虫抗原の検出などにより行われている。これらのうち成虫抗原検出による診断法は、その簡便さと正確性から広く臨床応用されている。また、犬糸状虫感染予防薬の不完全な投与によりオカルト感染となり、mf検出では診断できない症例が増加傾向にあることから、成虫抗原検出による診断の臨床的意義は、今後ますます重要になると思われる。血中の成虫抗原を検出する方法は、酵素抗体法[1, 5, 7],赤血球凝集反応[4, 11]あるいは免疫クロマトグラフ法[3]を原理とした各種のキットが市販されている。今回、われわれは新しく開発された免疫クロマトグラフ法を原理とする犬糸状虫成虫抗原検出キットの検出能および信頼性を従来製品と比較し、その有用性について検討した。

照としてすでに市販されている酵素抗体法による成虫抗原検出キット^{b)}(対照キットA)および免疫クロマトグラフ法による検出キット^{c)}(対照キットB)を用いた。各キットの操作は、それぞれ添付の取り扱い説明書に従って行い、判定はデバイス反応膜上の検体ラインあるいは検体スポットの発色の有無により肉眼的に陰性および陽性に区分した。

検 出 能 の 比 較

抗原液:寄生犬から採取した犬糸状虫成虫の雌虫体3隻と雄虫体3隻を乳鉢で磨砕し、リン酸緩衝液(pH 7.8)を加えて5%乳剤を作製した。ついで、4℃, 13,000 × gで30分間、遠心分離して上清を採取し、牛胎仔血清^{d)}を用いて最終抗原蛋白質濃度が1 μg/mlとなるように調整した。

対照液:剖検により犬糸状虫および他の寄生虫に感染

材 料 お よ び 方 法

被検キット:免疫クロマトグラフ法による犬糸状虫成虫抗原検出キット^{a)}(免疫クロマトキット)と、その対

- a) Solo Step™ CH, Heska Corporation, U.S.A.
b) Snap HW PF, IDEXX Laboratories, U.S.A.
c) Witness CHW, Synbiotics Corporation, U.S.A.
d) ICN Biomedicals, U.S.A.

† 連絡責任者:北川 均(岐阜大学農学部獣医学科家畜内科学研究室)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎058-293-2950 FAX 058-293-2964

表1 犬糸状虫寄生犬の血漿を用いた検出能の比較

No.	犬糸状虫寄生数			Mf ^{a)}	免疫クロマトキット	対照キットA	対照キットB
	総数	雌虫	雄虫				
1	2	1	1	—	×1	×1	×1
2	5	2	3	+	×1	陰性	陰性
3	5	3	2	—	×4	×2	×1
4	9	3	6	+	×16	×8	×4
5	12	8	4	+	×16	×8	×2
6	12	9	3	—	×8	×4	×1
7	15	5	10	+	×8	×4	×2
8	18	13	5	+	×16	×8	×2
9	20	9	11	+	×32	×8	×4
10	25	16	9	+	×64	×16	×8
11	34	17	17	+	×64	×16	×8
12	48	30	18	+	×64	×32	×16

× 数字は検出限界を示す。

a) 末梢血ミクロフィラリア；—：陰性，+：陽性。

していないことが確認できた健康犬の血清を用いた。免疫クロマトキット，対照キットAおよびBによって犬糸状虫成虫抗原が陰性であることを確かめた後に使用した。

臨床検体：犬糸状虫寄生犬12例のヘパリン加血漿を臨床検体として用いた。1頭あたりの犬糸状虫成虫の寄生数は2隻から48隻で，末梢血mf陽性犬が9例，mf陰性犬が3例であった（表1）。

試験法：抗原液および臨床検体をそれぞれ対照液で2倍段階希釈し，各希釈液を試験に供した。陽性を示した最大希釈倍数を検出限界として検出能を評価した。

信頼性の比較

供試犬：岐阜大学農学部附属家畜病院に来院した患者等で，年齢が1から11歳，雄45頭，雌40頭の計85頭を用いた。これらは剖検により犬糸状虫の寄生が確認された52例と犬糸状虫が検出されなかった33例に区分した。寄生が確認された52例は，血液1mlを用いたアセトン集虫法により末梢血中にmfが検出された40例をmf陽性群，検出されなかった12例をmf陰性群に分類した。さらに犬糸状虫雌成虫の寄生数により，雄成虫の単性寄生，未成熟虫寄生あるいは死滅虫体が認められた雌成虫0隻寄生例と，雌成虫1隻寄生例，2隻寄生例および3隻以上寄生例に細分した。犬糸状虫が検出されなかった33例を非寄生群とし，消化管内寄生虫非寄生例（16例）と犬回虫，犬鉤虫または犬鞭虫が寄生する消化管内線虫寄生例（9例）および犬条虫寄生例（12例）に細分した。犬条虫寄生例では，犬回虫，犬鞭虫，犬鉤虫および犬鞭虫との混合感染が，それぞれ1，2，1例あった。

被検血漿：抗血液凝固剤としてヘパリンナトリウム水溶液を用いて採血し，血漿を分離した後，ただちに

−30℃で凍結保存した。検査には保存血漿を試験直前に解凍し，遠心分離した上清を使用した。なお，反応結果を客観的に判定するために被検血漿は所属群がわからないようにして検査し，結果を記録した後に犬糸状虫寄生に応じて各群に分類した。

信頼性：信頼性は，犬糸状虫寄生犬を陽性に判定した率（感度）と非寄生犬を陰性に判定した率（特異性）で評価し，それぞれ次式により算出した。

$$\text{感 度}(\%) = \frac{\text{剖検で犬糸状虫の寄生が確認された検体から得た陽性判定数}}{\text{剖検で犬糸状虫の寄生が確認された検体数}} \times 100$$

$$\text{特異性}(\%) = \frac{\text{剖検で犬糸状虫が検出されなかった検体から得た陰性判定数}}{\text{剖検で犬糸状虫が検出されなかった検体数}} \times 100$$

成 績

検出能の比較：抗原液を用いた場合の免疫クロマトキット，対照キットAおよびBの検出限界は，抗原液に含まれる総抗原蛋白質濃度に換算すると，免疫クロマトキットは15.6ng/ml，対照キットAは62.5ng/ml，Bは250ng/mlであり，免疫クロマトキットの検出能が最も高かった。

臨床検体を用いた場合には，いずれのキットも犬糸状虫寄生数が増加すると検出限界が高くなる傾向がみられた（表1）。キット間の検出能を比較すると，犬糸状虫の総寄生数が2隻の1例（No. 1）では各キットの検出限界は×1で，キット間に差は見られなかった。しかし，総寄生数が5隻以上の11例では，5隻寄生の1例（No. 2）で免疫クロマトキットだけが抗原を検出することができた。また，他の10例では免疫クロマトキットの検出限界は対照キットAの2～4倍，対照キットBの4～8倍高く，臨床検体を対象にした場合も免疫クロマトキットの検出能が対照キットよりも高かった。

信頼性の比較：各キットの感度の比較を表2に示した。mf陽性群では，免疫クロマトキットにより40例全例が陽性になった。しかし，対照キットAおよびBでは1例が陰性になったため，この群における各キットの感度は，免疫クロマトキットでは100%，対照キットAとBでは97.5%であった。mf陰性群では，いずれのキットにおいても12例中7例が陽性（感度58.3%）となり，各キットの感度に差は見られなかった。犬糸状虫寄生犬52例をまとめると，免疫クロマトキットでは52例中47例が陽性であり，感度は90.4%であった。いっぽう，対

表2 各キットの感度の比較

区 分	例 数	免疫クロマトキット		対照キットA		対照キットB	
		陽性数	感度(%)	陽性数	感度(%)	陽性数	感度(%)
Mf ^{a)} 陽性群	40	40	100.0	39	97.5	39	97.5
Mf 陰性群	12	7	58.3	7	58.3	7	58.3
犬糸状虫寄生犬合計	52	47	90.4	46	88.5	46	88.5
0 隻 ^{b)}	5 (4) ^{c)}	2	40.0	2	40.0	2	40.0
雌成虫 1 隻 ^{d)}	6 (5)	5	83.3	5	83.3	5	83.3
寄生数 2 隻 ^{e)}	5 (1)	4	80.0	3	60.0	3	60.0
3 隻以上 ^{e)}	36 (2)	36	100.0	36	100.0	36	100.0

a) 末梢血ミクロフィラリア。b) 雄成虫単性寄生例3例，未成熟虫寄生例1例および死滅虫体寄生例1例。

c) かっこ内の数字は末梢血ミクロフィラリア陰性数を示す。d) 雌成虫単性寄生例2例と両性寄生例4例。e) 両性寄生例。

照キットAとBでは52例中46例が陽性であり，感度は88.5%であった。これらを雌成虫の寄生数別に区分すると，0隻寄生例と1隻寄生例では各キットとも40%と83.3%の感度で，2隻寄生例では免疫クロマトキットが80%，対照キットAおよびBは60%の感度であった。また，3隻以上の寄生例では各キットとも100%の感度であり，いずれのキットにおいても雌成虫の0隻寄生例に対する感度が最も低い値であった。

非寄生群では，免疫クロマトキット，対照キットAおよびBにおいて33例すべてが陰性となり，特異性は各キットとも100%であった。

考 察

免疫クロマトキットは，対照キットよりも低濃度の抗原を検出することが可能で，検出能は3キットの中で最も高かった。免疫クロマトキットが犬糸状虫成虫抗原を検出する原理は，免疫学的反応とペーパークロマトグラフィーを組み合わせた免疫クロマトグラフ法である。この方法は操作が簡便で判定に要する時間は短い [13] が，抗原の検出感度は酵素抗体法と同等 [15] かむしろ低い [10] と報告されている。本研究においても，免疫クロマトグラフ法を原理とする対照キットBの検出能は，酵素抗体法を原理とする対照キットAの検出能よりも低かった。したがって，免疫クロマトキットの検出能が対照キットよりも高かったのは，抗原検出の原理によるものではないと考えられた。

免疫クロマトキットと対照キットは，抗原検出に用いる抗体の種類が異なっている。免疫クロマトキットは，一次抗体にラテックス粒子で標識した抗犬糸状虫成虫抗原IgGモノクローナル抗体を用い，この抗体と成虫抗原との免疫複合体を捕捉する抗体には，抗犬糸状虫成虫抗原IgMモノクローナル抗体を使用している。いっぽう，対照キットAは一次抗体にペルオキシダーゼ標識抗犬糸状虫成虫抗原ポリクローナル抗体を用い，免疫複合体の捕捉には抗犬糸状虫成虫抗原ポリクローナル抗体を使用

している。また，対照キットBは一次抗体には金コロイド粒子で標識した抗犬糸状虫成虫抗原モノクローナル抗体を使用し，免疫複合体の捕捉には抗犬糸状虫成虫抗原モノクローナル抗体F(ab')₂フラグメントを用いている。免疫クロマトキットの検出能が高かった理由には，この様な抗体の種類が関与している可能性が推察された。

免疫クロマトキットは，mf陰性群に対する感度がmf陽性群よりも低く，また雌成虫の寄生数別では0隻寄生例に対する感度が最も低かった。これらの結果は，対照キットでも同様であった。免疫クロマトキットならびに対照キットAおよびBは，いずれも雌成虫由来抗原と結合する抗体を抗原検出に使用している [12]。このため，雌成虫寄生数の減少により雌由来の循環抗原量が減少し，その結果，感度が低下したことが考えられた。また，mf陰性群に対する感度が低かったのは，mf陰性群では雌成虫の0隻と1隻寄生例が多かったことが原因であると考えられた。昨今，犬糸状虫感染予防薬の不完全な投与によるオカルト感染が増加する傾向にあることから，これを正確に診断することが臨床的には重要である。免疫クロマトキットのmf陰性群に対する感度は対照キットAおよびBと同一であったことから，免疫クロマトキットはオカルト感染犬を従来製品と同等に検出できると考えられた。

酵素抗体法による抗原検出キットでは寄生数が多くなると反応程度が強くなる傾向が認められている [2, 5, 7, 9]。本研究では酵素抗体法による対照キットAのほか，免疫クロマトグラフ法による免疫クロマトキットと対照キットBにおいても，犬糸状虫寄生数の増加によって検出限界が高くなる傾向がみられた。これは，犬糸状虫寄生犬の循環抗原量が寄生成虫数に依存して増加する [9] ためである。しかし，これらのキットは簡便性を考慮して判定基準が2ないし3段階に設定してある。このため，各キットとも雌成虫の3隻以上寄生例ではすべて陽性となり，キットの反応程度から犬糸状虫の寄生数を推定す

ることは困難であった。

免疫クロマトキットの感度は90%以上、特異性は100%で、信頼性は対照キットと同様に高かった。キットの操作性では、いずれのキットも全血、血漿または血清で測定が可能であるが、免疫クロマトキットは検体の前処置が不要で展開液等の試薬を必要とせず、対照キットに比べて操作が簡便であること、判定までの時間が短いこと、キットが室温で保存できることなどの長所がある。さらに、免疫クロマトキットの検出能は今回比較した3キットの中で最も高く、犬糸状虫成虫の寄生診断法として臨床の有用性が高いと考えられた。

引用文献

- [1] Courtney CH, Cornell JA : J Am Vet Med Assoc, 197, 724-729 (1990).
- [2] Courtney CH, Zeng QY : J Am Anim Hosp Assoc, 23, 387-390 (1987).
- [3] Courtney CH, Zeng QY : Vet Parasitol, 96, 317-322 (2001).
- [4] Euclid JM, Copeman DB : Parasite, 4, 287-289 (1997).
- [5] 古井裕二, 茶谷公一, 水村芳弘, 北川 均, 佐々木榮英 : 日獣会誌, 45, 492-495 (1992).
- [6] 萩尾光美, 大塚宏光, 小川博之, 熊谷丑二 : 日獣会誌, 37, 497-501 (1984).
- [7] 鬼頭克也, 水村芳弘, 北川 均, 佐々木榮英 : 日獣会誌, 48, 109-112 (1995).
- [8] 大石 勇 : 犬糸状虫症, 大石 勇編, 初版, 105-123, 文永堂出版, 東京 (1990).
- [9] 大石 勇 : 犬糸状虫症, 大石 勇編, 初版, 132-135, 文永堂出版, 東京 (1990).
- [10] Paek SH, Lee SH, Cho JH, Kim YS : Methods, 22, 53-60 (2000).
- [11] Wang LC : Ann Trop Med Parasitol, 92, 73-77 (1998).
- [12] Weil GJ, Malane MS, Powers KG, Blair LS : J Immunol, 134, 1185-1191 (1985).
- [13] Weller MG : Fresenius J Anal Chem, 366, 635-645 (2000).
- [14] Wylie JP : J Am Vet Med Assoc, 156, 1403-1405 (1970).
- [15] Zhu Y, He W, Liang Y, Xu M, Yu C, Hua W, Chao G : J Immunol Methods, 266, 1-5 (2002).

Evaluation of a New Test Kit for Detecting Heartworm Antigens by Means of the Immunochromatography Method

Katsuya KITO^{*}, Masatake MURAMATSU, Rieko GOI, Masahiro KONDOH,
Masakazu NAKANO, Yoshihide SASAKI and Hitoshi KITAGAWA[†]

^{} Faculty of Agriculture, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan*

SUMMARY

Detection ability, sensitivity, and specificity of a new test kit (New Kit) for detecting circulating adult heartworm antigens by means of the immunochromatography method were compared with those of an enzyme immunoassay test kit (Control A) and another immunochromatography test kit (Control B). The detection ability of the New Kit was the highest of the 3. In microfilaremic dogs (n = 40), sensitivity of the New Kit was 100% in comparison with 97.5% for both Control A and Control B. In microfilaria-negative dogs (n = 12), sensitivity of all 3 kits was 58.3%. Dogs without heartworm infection (n = 33) were negative with all 3, indicating a specificity of 100% for all. Detection ability of the New Kit was highest of the 3 kits, and sensitivity and specificity of the New Kit were on a par with those of Controls A and B.

— Key words : dirofilariasis, dog, heartworm-antigen test kit, immunochromatography method.

[†] Correspondence to : Hitoshi KITAGAWA (Faculty of Agriculture, Gifu University)

1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan TEL 058-293-2950 FAX 058-293-2964

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 56, 28 ~ 31 (2003)