

犬回虫第2期幼虫排泄分泌抗原のモノクローナル抗体作製とそれらを用いた循環抗原の検出

石山 聡子

はじめに

犬回虫は全国に分布しており、本回虫を起因とする犬回虫症は、幼虫包蔵卵を経口的に摂取した後、腸で孵化した幼虫が、肝、肺、脳、眼に移行し内臓幼虫移行症を起こす原因となっている。本症の診断としてこれまで犬回虫第2期幼虫排泄分泌抗原（ES抗原）を用いたELISAにて血清学的診断を行ってきたが、他の蠕虫類と交差反応する可能性があり、正確に診断することができなかった。そこで本研究では犬回虫に特異的なモノクローナル抗体を作製し、循環抗原検出するサンドイッチELISAの検討を行った。

方法

サンドイッチELISAに用いるモノクローナルの作製はBALB/c マウス♀に犬回虫第2期幼虫排泄分泌抗原（ES抗原）とFreund's 完全アジュバントを混合した液を腹腔内に接種し免疫をした。そしてそのマウスの脾臓とミエローマ細胞（P3U1）とで細胞融合を行った。その後、限界希釈を行い、4種類のモノクローナル抗体産生細胞を得た。そしてそれらのクラスを決定した。抗体産生細胞をBALB/cマウスの腹腔内に投与して、得られた腹水をモノクローナル抗体として特異性の検討をした。その特異性は交差反応（5種類の犬回虫に関する抗原と5種類のその他の蠕虫抗原）とウエスタンブロットで確認を行った。そしてこのモノクローナル抗体を用い循環抗原を検出するサンドイッチELISAの検討を行った。

結果と考察

犬回虫のES抗原に対するモノクローナル抗体が4種類得られ、そのクラスは3種はIgG1でありTCMAB 2, 12, 13と名づけ、また1種類はIgMでありTCMAB24と名づけた。特異性の検討はIgG1の3種類を用いた。

交差反応は、TCMAB12, 13についてES抗原および犬回虫第2期幼虫抗原の2種類に反応したのに対して、TCMAB2はES抗原のみに反応した。これらモノクローナル抗体はその他の抗原とは交差反応を示さなかった。

ウエスタンブロットによる解析結果はTCMAB12について80, 50, 30 kDaの3本のバンドが検出され、これに対してTCMAB2と13については30 kDaの1本のバンドが検出された。

TCMAB2はES抗原のみに反応するという点で最良のモノクローナル抗体だと考えられたが、このモノクローナル抗体の力価が低いこと、そしてマウスに接種した際の腹水の収量が少ない等の理由によりこれ以上の検討はできなかった。またTCMAB13についても同様の理由で検討が行えなかった。

サンドイッチELISAはTCMAB12を用いて行った。陰性検体を用いカットオフ値（平均 + 2 SD）を計算した結果、吸光度0.295の値が得られ、0.295（5ng/ml）以上を陽性、それ以下を陰性と判断し、これを抗原検出限界とした。

これらの結果よりこのサンドイッチELISAは血清中のES抗原を検出するために十分な検出感度であると考えられるが、感染動物や患者からの検出は未だ試みておらず今後の課題である。