

イヌ回虫卵の培養と人工孵化に関する研究

石山 聡子

はじめに

ヒトに幼虫移行症を起こすイヌ回虫症の診断には、現在モノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISAの方法が用いられている。そのモノクローナル抗体の作製のためにイヌ回虫の第2期幼虫の排泄分泌(ES)抗原を精製する必要があり、そのために今回、イヌ回虫の(1)1細胞卵から幼虫包蔵卵への培養、(2)幼虫包蔵卵の人工孵化、そして(3)人工孵化後の懸濁液から幼虫のみを純化することについて検討を行った。

材料と方法

(1) 1細胞卵から幼虫包蔵卵への培養における発育培地と温度の影響

培地または温度変化により1細胞卵から幼虫包蔵卵になるまでの発育率の検討を行った。発育培地は蒸留水、生理的食塩液、RPMI1640およびRPMI1640+10%馬血清を添加したものを使用し検討した。温度に関して4℃、25℃、37℃で検討した。

(2) マグネティックスターラーとホモジナイザーを使用した幼虫包蔵卵の人工孵化の検討

(i) マグネティックスターラー法

3 mlビーカーにガラスビーズの直径、個数、処理時間を変化させ検討した。

(ii) ホモジナイザー法

ホモジナイザーの外径、ストローク数、液量を変化させ検討した。

(3) 幼虫純化の検討

Whatman製濾紙、クレシア製キムワイプ、およびFALCON製セルストレーナーのポアサイズや枚数を変化させ、幼虫の純化を試みた。

結果および考察

(1) 1細胞卵から幼虫包蔵卵への培養

培養温度25℃で栄養リッチな培養液とそうでない培地との比較をした結果、発育率に大きな差は認められなかった。培養は25℃以外にも4℃と37℃とで行ったが、4℃の場合は発育を認めず、37℃の場合では幼虫が培養の途中でその発育を停止してしまう傾向にあった。虫卵が発育する場所は土壤中であり、その適応により極端に寒い温度や暑い温度では発育できないことが示唆された。

(2) 幼虫包蔵卵の人工孵化

ホモジナイザー法は孵化率、幼虫生存率ともにマグネティックスターラー法を上回る結果が得られた。ホモジナイザー法に関して、液量や回転数で幼虫包蔵卵への物理的刺激が変化し、最適条件が決められたが、ガラスビーズ法はビーズとスターラーの回転だけでは物理刺激が少なく、分厚い卵殻を持った虫卵が破碎されなかったことが示唆された。

(3) 幼虫純化の検討

濾紙については幼虫が濾過されず、キムワイプを用いた場合、幼虫は濾過されたが純化度に問題があった。これらに対して、40 μ mセルストレーナーを用いた場合には、純化度と回収率が最も良いという結果が得られた。さまざまな種類の濾過膜で検討したが、膜の厚さやポアサイズが適切ではなく、容易に幼虫のみが通過できるのはこのセルストレーナーであった。