

学 位 論 文 題 名

エキノコックス感染終宿主診断法としての
糞便内抗原検出に関する研究

学位論文内容の要旨

エキノコックス症は世界に広く見られる重要な人獣共通寄生虫病であり、病原体として特に重要な種は多包条虫 *Echinococcus multilocularis* と単包条虫 *E. granulosus* である。これらエキノコックスの終宿主の感染状況の把握は疫学上および感染予防上重要であり、実施が容易で信頼できる診断法の開発が待たれている。本研究では、より確実に簡便なエキノコックス感染終宿主の診断法の開発を目的に、糞便内抗原検出法について検討を加えた。まず多包条虫成虫抗原に対するマウスモノクローナル抗体を作出し、抗体が認識する抗原の性状を調べた。さらに、エキノコックス実験感染終宿主における糞便内抗原の検出時期および特異性を検討し、最後にエキノコックス自然感染終宿主へ野外応用し、他の診断方法と比較した。

1. 多包条虫成虫の虫体抗原に対して11種のモノクローナル抗体を作出し、多包条虫抗原に対して特異性が高いモノクローナル抗体EmA9 (IgG3) を糞便内抗原検出用抗体として選択した。

2. EmA9が認識する抗原の性状を解析した結果、次の結論を得た。

(1) 抗原は感染後2日目から虫体のテグメントに発現し始め、4日目には柔組織およびテグメントに広く検出されたことから、EmA9を用いたエキノコックス感染の早期診断が可能である。

(2) 過ヨウ素酸を用いた抗原の糖分解処理によってその抗原性が失われたことおよび熱やタンパク分解処理に安定であることから、EmA9が認識するエピトープの特異性に糖が関与し、抗原性が安定である。

(3) レクチンプロット法により、EmA9が認識するエピトープを構成する糖鎖を検索した結果、これらはマンノース、グルコースとN-アセチルグルコサミンを含む。

3. 糞便内抗原検出は、モノクローナル抗体EmA9および多包条虫成虫の分泌・排泄 (ES) 抗原に対するポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAにより行った。すなわちELISAプレートにポリクローナル抗体を吸着させた後、糞便内抗原液を反応させた。次にEmA9を反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体、基質の順に反応させ、反応産物を吸光度により測定した。本法を実験感染動物の糞便へ適用し以下の知見を得た。

(1) イヌの多包条虫感染実験において、200,000個の原頭節を感染させた個体で抗原検出は感染3～5日目から可能となり、感染の経過に伴い剖検時まで検出値は上昇した。また、感染17日目の駆虫後、糞便内の抗原が速やかに消失したことから、本検出法は感染の状

況を迅速に反映すると考えられた。また、抗原の検出限界濃度は、4 ng/g糞便と算定され、すでに報告されている糞便内抗原検出法に比べ非常に優れた感度を有する。

(2)糞便内抗原の抗原性はホルマリンおよび熱処理(70℃、12時間)に対して安定であり、糞便検体の長期保存が可能となるほか、抗原抽出が容易であった。さらに、この熱処理により、検査時に検査者への虫卵感染を防ぐことができる。

(3)本検出法の特異性を調べるため、*Taenia crassiceps*、*Toxocara canis*、*Trichuris vulpis*感染犬および*Taenia taeniaeformis*感染猫の虫卵排泄開始後の糞便を用いて糞便内抗原の検出を試みるとともに、*Taenia hydatigena*実験感染を行い、経時的に採集した糞便から糞便内抗原の検出を試みた。その結果、*T. hydatigena*での老熟片節の排泄に伴って糞便内抗原がわずかに交差反応するのみで、その他の寄生虫感染では交差反応は認められず、特異性が高かった。

(4)免疫抑制処置を施したゴールデンハムスターに、多包条虫原頭節数を変えて投与し、糞便内抗原の検出を試みた。その結果、感染後10日目頃までは投与原頭節数によって検出抗原量に差がみられ、感染20日後の剖検では、回収虫体数と検出抗原量に比較的高い相関が認められた。以上の成績から糞便内抗原の検出値が同一宿主の感染状況の推移のモニタリングに非常に有効であり、感染個体間で比較する場合は、寄生虫体数に大きな差がみられる場合に比較が可能であることが示された。

4. 単包条虫流行地域であるウルグアイのイヌの感染診断に応用する目的で、単包条虫実験感染犬の糞便内抗原の検出を行った。検出にあたっては、単包条虫成虫ES抗原に対する抗体を用い、モノクローナル抗体はEmA9を使用した。その結果、単包条虫の糞便内抗原も多包条虫同様、感染の初期においても検出できることが明らかとなった。

5. エキノコックス自然感染終宿主の診断のために、糞便内抗原検出法を野外応用した。

(1)多包条虫自然感染終宿主として知られるキタキツネの剖検個体から得られた直腸便(1985年、1987年、1988年、1989年、1993年採材)、あるいはキツネ巣穴周辺で採集された糞便(1990年、1992年採材)について、モノクローナル抗体EmA9を用いたサンドイッチELISA法によって糞便内抗原の検出を試みた。1993年に剖検が行われた430の1%ホルマリン保存検体における糞便内抗原検出の結果は、剖検時虫体陽性103例中90例が抗原陽性、13例が陰性で、感度は87.4%となった。この陰性13例中11例は、検出虫体数が10未満であった。また、10%ホルマリンに3年以上保存されていた糞便検体(1985年、1987年、1988年、1989年採材)についても糞便内抗原の検出を試みたところ、感度は十分であり、検出抗原が非常に安定であることが示された。巣穴周辺で採集された糞便は、テニア科の虫卵検出陽性検体に対する抗原陽性検体がそれぞれ38/40(95.0%)、95/97(97.9%)と非常に高い感度を示した。さらに採集時の糞便の新旧にかかわらず、抗原の検出が可能であった。

(2)イヌの単包条虫感染調査(アレコリンによる駆虫虫体の検出)実施時に採集した糞便82検体を多包条虫糞便内抗原検出法(ポリクローナル抗体に抗多包条虫ES抗体を使用)で検査したところ、虫体陽性14検体中抗原陽性は5検体(35.7%)であった。また別の糞便59検体を単包条虫糞便内抗原検出法(ポリクローナル抗体に抗単包条虫ES抗体を使用)で検査したところ、虫体陽性8検体のうち抗原陽性は3検体(37.5%)で、感度が低く、単包条虫糞便内抗原検出に関しては今後の検査の改善が課題として残された。

以上の成績から、本法を用いたエキノкокスの糞便内抗原の検出は、感染終宿主の早期診断を可能とし、さらに従来 of 診断法に比べ高い特異性と感度を有することが示された。また、検出抗原は非常に安定で、糞便の熱処理による虫卵感染防止が可能となることに加え、ホルマリン内での長期保存が可能であることから野外で採集された感染動物の糞便を用いた疫学調査への応用にも極めて有用であることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	神谷	正男
副査	教授	喜田	宏
副査	教授	小沼	操
副査	助教授	奥	祐三郎

学位論文題名

エキノコックス感染終宿主診断法としての 糞便内抗原検出に関する研究

エキノコックス(多包条虫および単包条虫)の終宿主の診断はヒトへの感染源対策上重要であるが、虫卵が他のテニア科条虫卵と区別できないこと、アレコリンを用いた駆虫診断および剖検は感染の危険性、労力および特別な施設が必要なことなど問題があり、新たな診断法が必要とされている。申請者は、終宿主の小腸に寄生する虫体から分泌・排泄され、糞便中に含まれる抗原(糞便内抗原)の検出法として、サンドイッチELISAを応用し、エキノコックス感染終宿主の診断法の開発を試みた。

まず、包条虫成虫の虫体抗原に対してモノクローナル抗体を多数作出し、この中から特異性が高いモノクローナル抗体EmA9(IgG3)を選択した。EmA9の認識抗原は感染後2日目から虫体の体表に発現し、エピトープには糖が関与していた。このモノクローナル抗体EmA9および多包条虫成虫の分泌・排泄抗原に対するポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAにより糞便内抗原検出を試み、以下の知見を得た。

多包条虫実験感染犬において、糞便内抗原は感染3~5日目以降ずっと検出され、虫卵が排泄されるよりかなり前から検出され、検出感度も高かった。検出された糞便内抗原はホルマリンおよび加熱処理に対して安定であり、糞便を加熱処理し殺卵後も検出できることから術者への感染の危険性を除くことができる。他種の寄生虫感染犬の糞便でも交差反応は認められず、特異性が高い。この糞便内抗原の検出抗原量の推移は、同一宿主での虫体の発育や虫体数の減少などの感染状況のモニタリングにも有効であった。

野外応用のために、430検体の剖検されたキタキツネの直腸便から多包条虫抗原の検出を試み、剖検時の虫体検出状況を比較したところ、抗原検出法の感度は87.4%であった。また、長期間(3年間)保存された糞便材料でも抗原検出が可能であり、さらに巣穴周辺で採集された137検体の糞便でも、テニア科の虫卵検出陽性検体に対する抗原陽性検体の率が97.1%で、従来の方法に比べて高い感度を示した。

最後に、単包条虫実験感染犬における糞便内抗原検出を試み、多包条虫抗原同様、感染の初期においても糞便内抗原が検出できたが、単包条虫自然感染犬における抗原検出感度は40%前後と低く、今後の検査法の改善が課題として残された。

以上のように、申請者はエキノкокスの終宿主における糞便内抗原のサンドイッチ ELISAによる検出を試み、安全で、高い特異性と感度を有する診断法を開発した。この成果は、今後のエキノкокス防除対策のみならず類似の寄生虫病診断法の改善にも寄与するものと思われる。よって審査員一同は、酒井博史氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分にあるものと認めた。