

肝蛭症を北海道の現場で診断できる抗体検査キットの開発

守屋 歩 [株式会社ホクドー 札幌ラボ/課長]
関 まどか [岩手大学/准教授]
丸 山 治彦 [宮崎大学/教授]

背景・目的

肝蛭(かんてつ)症は「顧みられない熱帯病」に分類される人獣共通寄生虫症で、世界中で甚大な被害がある。国内でもヒト症例が散発し、北海道ではエゾシカが保虫宿主である。エゾシカの抗体陽性率は平均43.9%に達し、北海道は家畜やヒトへの伝播が危惧される肝蛭症の高度流行地であるが、現場で活用可能な検査キットが存在せず、実態把握は進んでいない。本研究の目的は ①ウシを対象としたELISAキットの信頼性評価と製品化、②イムノクロマトグラフィー法を用いた簡易診断キットを開発し、現場の診断ニーズに応えることである。

内容・方法

①ウシを対象としたELISA試作キットの信頼性評価と製品化

ELISAキットを市販品とするために、流通に適した試薬を用いてELISA条件の最適化を行った。具体的には、乾燥プレートへの移行、ブロッキング液、希釈緩衝液、発色試薬の種類を検討した。本年度は、最適化した条件下でウシの感染歴が明確なコントロール血清95検体を用いてカットオフ値を決定した。また、と畜場で採取したウシ血清944検体を用いて診断の精度を判定した。

②イムノクロマトグラフィー法を用いた簡易診断キットの開発(対象:全ての動物種)

ELISAは多検体を一度に扱える利点があるが、プレート、マイクロピペット、プレートリーダーなどの機材や、各種反応試薬を必要とする。獣医療の現場である酪農・畜産農家やジビエの提供現場では、このような機材を準備することは難しい。そこで本研究では、感染歴が明確なウシのコントロール血清を用いて微量の検体を滴下するだけで診断可能なシステムを構築した。また、ヒトその他の動物種まで宿主域が広い肝蛭症の特徴を見据えて、全ての動物種に適応可能な系を検討した。

結果・成果

①ウシを対象としたELISA試作キットの信頼性評価と製品化

最適化条件下(乾燥プレート、希釈緩衝液:0.5% Fish Gelatin、0.05% Tween、0.3M NaCl/PB、発色試薬: TMB)でコントロール血清を用いてELISAのカットオフ値を決定した。その結果、感度89.2%、特異度95.0%を達成した(図1)。また、ELISAの信頼性を示すROC曲線の曲線下面積(AUC)は0.98を達成し、非常に信頼性が高いことが示された。

北海道由来ウシ血清944検体に対して、共同研究先の岩手大学で実施した従来のELISA系と、本研究で作製した試作キットの診断精度を比較したところ、従来の方法では偽陰性と判定された肝蛭陽性血清7検体のうち、4検体を正しく陽性判定することができた(図1)。これらの7検体のウシ血清は、サンプリング条件の悪いと畜場で採材されたサンプルであり、本研究で作製した試作キットを用いれば、質の悪いサンプルであっても従来法よりも正確に診断できることが確認された。報告書の提出時点で、944検体全てに対して試作キットの適用試験中で、試験が終了次第、製品としての信頼性を示すために、国際誌に論文投稿する予定である。

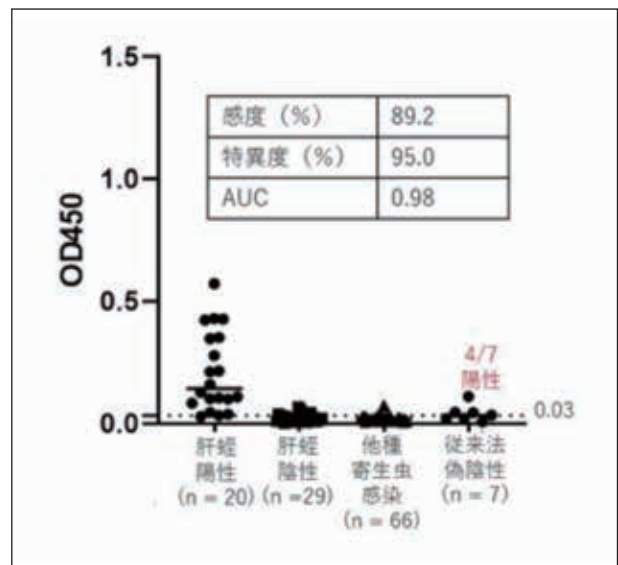


図1:ELISA試作キット

②イムノクロマトグラフィー法を用いた簡易診断キットの開発(対象:全ての動物種)

ELISAと同じ抗原に基づき、ウシ血清中の抗肝蛭抗体を検出できるイムノクロマトグラフィー法を構築した。感染歴が明確なウシのコントロール血清を用いて「テストライン抗原ProteinA/G×肝蛭抗原感作金コロイド溶液」の組み合わせで、良好な反応を確認できた(図2)。テストライン抗原ProteinA/Gのシステムは、本研究で試験したウシに加えて、ヒトやシカなど他の動物種においても、同一のキットで抗肝蛭抗体を検出することが可能である。したがって、この系の構築に成功したことは、宿主域が広い本疾患において、広範な動物種への適用を見据えた試作品の作製に成功したことを意味し、国内外での疫学調査への多大な貢献が見込まれる。一方、本研究では野外のウシ血清試料を用いて検討を行ったため、感染歴が明確でも、個体差その他の要因による非特異的と考えられる反応が一部の検体で認められた(偽陽性or偽陰性)。そのため、今後は当該抗原に対するウサギ標準血清を作製し、抗体濃度既知の条件下で反応の最適化を図り、診断精度を向上させる。

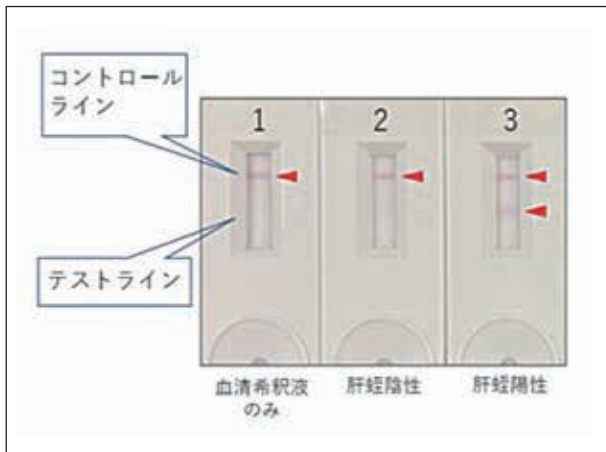


図2:簡易診断キット試作品の結果

今後の展望

本研究ではELISAキットはウシを対象に検討を進めた。今後はELISAキットの信頼性を示す論文を国際誌へ投稿するとともに、共同研究者らの協力を得て流行地での使用実績を蓄積したい。また、ELISAキットについても全ての宿主動物に適用可能な系への展開も検討し、事業化のさらなる推進を図りたい。イムノクロマトグラフィー法を用いた簡易診断キットについては、より精度の高い条件検討を実施して診断精度の検証とヒト、シカへの適用範囲の拡大を進め、実用性の高い商品化を実現したい。これまでに肝蛭症診断用の簡易診断キットが実用化に至った例はなく、将来的には世界的な需要が見込まれるため、今後の大規模事業化が期待される。