

犬糸状虫抗原検出キットの評価と虫体摘出後の血中抗原価 の変化

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
巻/号	457
掲載ページ	p. 492-495
発行年月	1992年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



犬糸状虫抗原検出キットの評価と虫体摘出後の血中抗原価の変化

古井裕二¹⁾ 茶谷公一¹⁾ 水村芳弘²⁾

北川 均¹⁾ 佐々木栄英¹⁾

1) 岐阜大学農学部 (岐阜市柳戸 1-1 〒501-11)

2) ゲン・コーポレーション (岐阜市折立 296-1 〒501-11)

(平成 3 年 11 月 27 日受付・平成 4 年 4 月 17 日受理)

Evaluation of a Heartworm Antigen Test Kit and Changes in Circulating Antigen Levels
after Surgical Heartworm Removal in Dogs

YUJI FURUI¹⁾, KOUICHI CHAYA¹⁾, YOSHIRO MIZUMURA²⁾, HITOSHI KITAGAWA¹⁾,
YOSHIHIDE SASAKI¹⁾

1) Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu-shi, Gifu-ken 501-11

2) Ghen Corporation, Oritate, Gifu-shi, Gifu-ken 501-11

SUMMARY

The sensitivity and specificity of a commercial heartworm (*Dirofilaria immitis*) antigen test kit were evaluated in 100 dogs with and without heartworm infections. All 25 microfilaremic heartworm-infected dogs, in which the number of heartworms ranged from 3 to 91, were identified correctly as positive (sensitivity: 100%). The test detected occult infection in 18 of 25 (72.0%) dogs. All heartworm-free dogs with (25 dogs) and without (25 dogs) roundworm (*Toxocara canis*) infection were indentified as negative (specificity: 100%). The accuracy in all 100 dogs tested was 93%. Changes in the circulating antigen levels after surgical heartworm removal were examined in 10 dogs using this kit. By surgical treatment, all heartworms were removed in 6 dogs, and removal efficiency ranged from 65.5 to 86.7% in the 4 other dogs. After heartworm removal, the circulating antigen levels declined in all dogs. The mean antigen level in 10 dogs was $\times 730 \pm 1238$ before removal, $\times 84 \pm 98$ at 4 weeks after removal, $\times 36 \pm 39$ at 8 weeks after, and $\times 14 \pm 8$ at 12 weeks after. There were no dogs in which the circulating antigen disappeared.

—Key Words : heartworm antigen, dog, heartworm removal, serodiagnosis test kit.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 45, 492~495 (1992)

要 約

犬糸状虫抗原検出による寄生診断キット (ペットチェック・ハートワーム) の信頼性と犬糸状虫摘出後の抗原価の変化を検討した。犬糸状虫寄生犬のうち末梢血マイクロフィラリア (mf) 陽性群 25 例では、判定は全例で陽性であった (信頼度 100%)。mf 陰性群 25 例では 18 例が陽性、7 例が陰性であった (信頼度 72%)。犬糸状虫非寄生犬で犬回虫寄生群 25 頭と非寄生群 25 頭は全例で陰性であった (信頼度 100%)。全試験犬 100 頭の信頼度は 93% であった。犬糸状虫摘出率は 6 例で 100%、4 例で 65.5~86.7% であったが、血中抗原価は摘出の完全、不完全を問わず摘出後全例で低下した。10 例における平均抗原価は摘出前 730 ± 1238 倍に対し 4 週後 84 ± 98 倍、8 週後 36 ± 39 倍、12 週後 14 ± 8 倍となった。しかし、血中抗原が完全に消失した例はなかった。

—キーワード : 犬糸状虫抗原, 犬, 犬糸状虫摘出, 寄生診断用キット。

-----日獣会誌 45, 492~495 (1992)

犬糸状虫 (*Dirofilaria immitis*) 寄生の診断は末梢血中のマイクロフィラリア (mf) を検出する方法が広く用いられている。しかし、この方法では犬糸状虫寄生犬の 10~60% のみみられる^{10, 11)}末梢血中に mf が検出されない、いわゆる“オカルト感染症”の診断は不可能である。オカルト感染は以前から診断上問題となっているが、最近

ではミルベマイシン¹²⁾あるいはアイバメクチン¹³⁾など抗 mf 効果のある薬剤と関係するように考えられるオカルト例が本学附属家畜病院においても増える傾向にある。いっぽう、超音波断層装置による診断⁷⁾も可能であるが機器が高価なこと、技術的に習熟する必要があること、肺動脈深部に寄生する犬糸状虫の描出が困難なことなど

の問題がある。

近年、モノクローナル抗体酵素免疫検出法 (ELISA) により犬糸状虫成虫抗原を検出する寄生診断法が米国およびオーストラリアで実用化され、各種キットについて検討されている^{2-6,9,16)}。この研究では、抗原検出による犬糸状虫診断キットの1つであるペットチェック・ハートワームの信頼性を、犬糸状虫自然感染犬、非寄生犬および消化管線虫寄生犬について検討した。さらに、このキットを用いて犬糸状虫を外科的に摘出した後の血中抗原価の変化をも検討した。

材料および方法

キットの信頼性を検討する試験では生後1カ月から5歳の雑種犬100頭を使用した。試験犬は犬糸状虫非寄生犬50頭と寄生犬50頭に分け、寄生犬は末梢血mfの有無によりmf陽性群25頭とmf陰性群25頭に分類した。犬糸状虫非寄生犬は犬回虫寄生犬25頭(犬回虫寄生群)と犬回虫非寄生犬25頭(犬回虫非寄生群)に分類した。試験犬はすべて安楽死後剖検し、犬糸状虫および消化管寄生虫の寄生状況を検索した。各群における犬糸状虫、犬回虫、その他の消化管寄生虫の寄生状況を表1に示し

表1 各群の試験犬における犬糸状虫、犬回虫および他の消化管寄生虫の寄生状況

項目	犬糸状虫寄生犬		犬糸状虫非寄生犬	
	mf陽性 n=25	mf陰性 n=25	犬回虫寄生 n=25	犬回虫非寄生 n=25
犬糸状虫寄生数				
0	0	0	25	25
1~5	3	12	0	0
6~15	6	9	0	0
16以上	16	4	0	0
犬回虫寄生数				
0	25	25	0	25
1~5	0	0	10	0
6~15	0	0	10	0
16以上	0	0	5	0
他の消化管寄生虫				
犬鉤虫	0	0	2	0
犬鞭虫	7	3	0	1
犬条虫	4	3	0	3

数字は頭数を示す。

表2 各群における反応判定結果

判定	犬糸状虫寄生犬		犬糸状虫非寄生犬	
	mf陽性 n=25	mf陰性 n=25	犬回虫寄生 n=25	犬回虫非寄生 n=25
強陽性	11(44.0)	3(12.0)	0(0)	0(0)
弱陽性	14(56.0)	15(69.0)	0(0)	0(0)
陰性	0(0)	7(28.0)	25(100)	25(100)
信頼度 ^{a)} (%)	100	72.0	100	100

数字は例数を、() は%を示す。a) 正答数/検査数×100。

た。

末梢血mfは直接鏡検法あるいは血液1mlを用いたアセトン集中法¹⁰⁾により検査した。被検血清は採血後直ちに分離し、-30℃に凍結保存した後、検査直前に解凍して用いた。試験に用いたキットは商品名が日本ではペットチェック・ハートワーム(ゲン・コーポレーション)、米国ではCite Semi-Quant Canine Heartworm Antigen Test Kit (IDEXX Corp., Portland) と呼ばれている。抗原検出の操作は説明書に従って実施した。すなわち、血清をサンプル前処理用バイアルに加えて処置した後、あらかじめ処理したサイト・ディバイス(反応用カップ)に入れ、洗浄、試薬-1の添加、洗浄、試薬-2の添加、洗浄、反応停止液の添加を行った後、発色程度を肉眼で観察して、陰性、弱陽性、強陽性の3段階に判定した。

犬糸状虫摘出後の血中抗原価の変化を検討する試験では犬糸状虫寄生犬10頭を用い、検査は糸状虫摘出前、摘出後4週、8週、12週に行った。犬糸状虫の寄生は末梢血mf検査と超音波断層法(EUB-165, 日立メディコ, 東京)で診断し、犬糸状虫の摘出はフレキシブル・アリゲーター鉗子を用いて実施した⁹⁾。犬糸状虫抗原量の測定にはペットチェック・ハートワームを用い、血清をPBS(pH7.2)で2倍段階希釈し、陽性に発色した最終希釈倍率をその検体の抗原量とした。試験犬は試験終了後安楽死し、肺動脈に残っていた犬糸状虫数を確認した。

成績

診断の信頼性を検討した試験成績を表2に示した。犬糸状虫寄生犬のうちmf陽性群では25例中11例(44%)が強陽性、14例(56%)が弱陽性であり、信頼度は100%であった。mf陰性群では25例中3例(12%)が強陽性、15例(69%)が弱陽性であったが、7例(28%)が陰性で、信頼度は72%であった。犬糸状虫非寄生犬で犬回虫の寄生群と非寄生群はともに全例が陰性であった。また、これらの2群では2例に犬鉤虫が、1例に犬鞭虫が、3例に犬条虫が寄生していたが、判定はいずれも陰性であった。以上の犬糸状虫寄生犬と非寄生犬を合計した100例のうち93例は正しく判定され、信頼度は93%であった。

mf陰性群において犬糸状虫寄生状況と判定結果との関係について検討すると、成虫の両性寄生例では3例(21.4%)が強陽性、9例(64.3%)が弱陽性、2例(14.3%)が陰性で、信頼度は85.7%であった。成虫の単性寄生例では強陽性例はなく、弱陽性が5例(62.5%)、陰性が3例(37.5%)あり、信頼度は62.5%であった。弱陽性の5例はすべて雌成虫の単性寄生であった。未成熟虫のみの寄生例では弱陽性が1例(33.3%)、陰性が2例(66.7%)であり、信頼度は

表3 陰性と誤判定された7例の犬糸状虫寄生状況

寄生区分	試験犬 番号	犬糸状虫寄生数			
		雌	雄	未成熟虫	合計
両性寄生	2132	6	7	0	13
	2161	1	1	0	2
単性寄生	2042	1	0	0	1
	2169	1	0	0	1
	2000	0	2	0	2
未成熟虫 寄生	2100	0	0	8	8
	2106	0	0	2	2

表4 犬糸状虫摘出数, 残虫数および摘出率

試験犬 番号	摘出数				残虫数				摘出率 ^{a)} (%)
	雌	雄	未 ^{b)}	合計	雌	雄	未	合計	
2339	3	1	0	4	0	0	0	0	100
2386	7	4	0	11	0	0	0	0	100
2400	5	2	0	7	0	0	0	0	100
2402	32	23	0	55	0	0	0	0	100
2408	35	13	0	48	0	0	0	0	100
2419	8	9	0	17	0	0	0	0	100
2381	7	5	1	13	0	0	2	2	86.7
2390	8	15	0	23	0	0	4	4	85.2
2190	7	5	0	12	1	6	0	7	63.2
2307	8	5	0	13	1	6	0	7	65.5

a) 摘出数 / (摘出数 + 残虫数) × 100. b) 未成熟虫.

33.3%であった。mf陰性群における信頼度は両性寄生、単性寄生、未成熟虫寄生の順に低くなる傾向にあった。

犬糸状虫寄生数と反応判定結果との関係についてはmf陽性群では寄生数が16匹以上の16例中11例(68.8%)が強陽性を示し、5例(31.3%)が弱陽性であった。15匹以下の寄生例(10例)はすべて弱陽性であり、寄生数が5匹以下(最少は雄雌各1匹の計2匹)であっても陰性反応を示す例はなかった。mf陰性群では寄生数16匹以上の4例中3例(75.0%)が強陽性を示し、1例が弱陽性であった。寄生数15匹以下の例では強陽性を示した例はなく、6~15匹の寄生例(9例)では7例が弱陽性(77.8%)、2例(22.2%)が陰性、5匹以下の寄生例(12例)では7例(58.3%)が弱陽性、5例(41.7%)が陰性であった。犬糸状虫寄生があるのに陰性と誤判定されたmf陰性群の7例の寄生状況をみると(表3)、両性寄生の1例は寄生数13匹(雌6匹、雄7匹)で比較的多数の寄生を認めたが、他の1例は2匹(雌雄各1匹)の少数寄生であった。単性寄生の3例は2匹以下の寄生例であり、未成熟虫寄生の2例は8匹と2匹の寄生であった。

表4に犬糸状虫摘出後の血中抗原価の変化を検討する試験に用いた試験犬10頭の犬糸状虫摘出数等を示した。6例では摘出率が100%であり、2例(No. 2381, 2390)では成虫はすべて摘出されていたが剖検時には未成熟虫がそれぞれ2匹と4匹寄生しており、摘出率は86.7%と

表5 犬糸状虫摘出後の循環抗原量の変化

試験犬 番号	抗原 価 (倍)			
	摘出前	4 週後	8 週後	12 週後
2339	1024(100)	256(25.0)	64(6.3)	16(1.6)
2386	256(100)	64(25.0)	8(3.1)	8(3.1)
2400	256(100)	32(12.5)	16(6.3)	8(3.1)
2402	1024(100)	128(12.5)	64(6.3)	8(0.8)
2408	4096(100)	256(6.3)	128(3.1)	32(0.8)
2419	128(100)	64(50.0)	32(25.0)	16(12.5)
2381	256(100)	8(3.1)	32(12.5)	13(6.3)
2390	64(100)	8(12.5)	8(12.5)	8(12.5)
2190	128(100)	16(12.5)	8(6.3)	ND ^{a)}
2307	64(100)	8(12.5)	2(3.1)	ND
平均	730(100)	84(17.2)	36(8.5)	14(5.1)
SD	1238(0)	98(13.4)	39(6.8)	8(4.9)

() は摘出前の抗原価に対する%を示す。a) 検査せず。

85.7%であった。他の2例(No. 2190, 2307)ではともに成虫が雌1匹、雄6匹認められ、摘出率はそれぞれ63.5%、65.5%であった。犬糸状虫摘出後の抗原価は(表5)完全、不完全摘出例を問わず全例が低下し、虫摘出の完全、不完全による差は認められなかった。犬糸状虫摘出前における10例の平均抗原価730±1238倍は虫摘出4週後には84±98倍(摘出前の17.2±13.4%)になり、8週後には36±39倍(8.5±6.8%)まで低下した。12週後には完全摘出例6例を含む8例では抗原価は8~32倍の範囲にあり平均値では14±8倍(5.1±4.9%)まで低下したが、抗原が完全に消失した例は1例もなかった。

考 察

犬糸状虫非寄生犬と寄生犬のmf陽性群では本キットは全例とも正しく反応し、信頼度は100%であった。特に非寄生犬では犬回虫、犬鉤虫、犬鞭虫、犬糸虫の寄生例でも陽性反応を示さず、犬糸状虫成虫に対して高い特異性を示した。しかし、臨床的に問題となるオカルト感染例(mf陰性群)では25例中7例が陰性と判定され、信頼度は72%であった。この7例のうち6例は2匹以下の少数寄生、単性寄生あるいは未成熟虫の寄生例であった。COURTNEYら³⁾はCITEを用いた実験で、オカルト感染例では信頼度が62%で、少数寄生、雄の単性寄生、未成熟虫寄生例では陽性率が低いと報告しており、今回の成績とはほぼ一致した。成虫抗原検出用のキットはキットによって検出する抗原の免疫学的特性が若干異なるようであるが、いずれも犬糸状虫成虫に対しては高い特異性と感度を有する。しかし、少数寄生例では循環抗原量が少ないため検出感度が落ち、未成熟虫寄生では抗原性が異なるため感受性が低くなる^{14,16)}。これらの問題は成虫抗原を免疫学的に検出する犬糸状虫寄生診断法の限界であると考えられている^{14,15)}。この試験でもmf陰

性犬では寄生数の少ない例で陰性反応を示す例の割合が増加していたが、mf陽性犬では2匹の寄生でも陽性であったので犬糸状虫の成熟度の影響が大きいように考えられた。しかし、誤って判定された7例のうち1例は両性寄生で寄生数も13匹と比較的多くの成虫が寄生しており、反応が陰性となった原因は明らかではなかった。本キットは感染150日以後に抗原を検出することができる¹⁶⁾とされ、それ以前の発育途中の未成熟虫を検出することは困難である。しかし、未成熟虫に対しては、飼育状況や検査時期を考慮して、繰り返し検査することにより正しく判定できるようになる可能性がある。

これまでに成虫抗原価と犬糸状虫成虫寄生数の相関性が報告されている^{1, 4, 15)}。この試験においても寄生数が16匹以上では強陽性を示す例が多く、寄生数の減少につれて弱陽性または陰性例が増加した。これらの所見は、本キットが検出する抗原量が犬糸状虫成虫寄生数とある程度相関することを示唆する。しかし、本キットは臨床的な簡便性を考慮して、強陽性、弱陽性、陰性の3段階にしか判定が設定されていないので、寄生数を定量的に推定するのは困難であるように考えられた。

犬糸状虫摘出後の抗原価は8週後に平均8.5%まで減少し、犬糸状虫がある程度摘出され、残留虫体数が少なければ抗原価は著しく低下し、その程度は犬糸状虫が完全に摘出された場合とあまり差がないことを示した。WEIL¹⁵⁾は、ヒ素剤により犬糸状虫を完全に駆除した場合には抗原価は8週後に駆除前の7%まで低下し、12週後には消失したことを報告した。またATWELLら¹⁾は、ヒ素剤による成虫駆除60日後には抗原吸光度が駆除前の約15%まで減少すると報告している。死虫が肺動脈に残るとヒ素剤による犬糸状虫成虫の殺滅と、虫体そのものを体外に除去した今回の成績は単純に比較できないが、両者とも処置後に抗原価が減少する点では一致していた。しかし、前者では12週後に抗原が消失するのに対しこの試験では成虫を完全に摘出した例でも抗原が消失しなかった。この点についてはキットが検出する抗原やキットの犬糸状虫抗原に対する感受性に差があるように考えられ、本キットを犬糸状虫摘出効果の判定に使用するためにはさらに検討を加える必要がある。

本キットを用いた犬糸状虫寄生診断法は分析機器を必要とせず、簡便かつ短時間で実施することができるので

臨床的に有用である。さらに、被検犬の飼育環境、検査時期を考慮して反復検査を行うとともにX線検査、超音波断層検査等を併用すれば臨床的有効性を高めることができると考えられる。

引用文献

- 1) ATWELL R B, VANKAN D M, COTTIS L E et al.: Proceedings of Heartworm Symposium '86, Otto G F ed., 71~76, American Heartworm Society, Washington (1987)
- 2) BUNDESEN P G, MARTIN S A, DIXON G H et al.: Aust Vet J, 20, 144~149 (1990)
- 3) BRUNNER C J, HENDRIX C M, BLAGBURN B L et al.: J Am Vet Med Assoc, 192, 1423~1327 (1988)
- 4) COURTNEY C H, ZENG Q-Y: J Am Anim Hosp Assoc, 23, 387~390 (1987)
- 5) COURTNEY C H, ZENG Q-Y, TONELLI Q: J Am Anim Hosp Assoc, 26, 623~628 (1990)
- 6) ELY M L, COURTNEY C H: J Am Anim Hosp Assoc, 23, 367~371 (1987)
- 7) 萩尾光美, 大塚宏光, 小川博之ほか: 日獣会誌, 37, 497~501 (1984)
- 8) ISHIHARA K, SASAKI Y, KITAGAWA H: Jpn J Vet Sci, 48, 989~991 (1986)
- 9) LEVINE J F, FOX D F, SNOWDEN K F et al.: J Am Anim Hosp Assoc, 23, 327~331 (1987)
- 10) 大石 勇: 犬糸状虫症, 大石 勇編, 初版, 1~201, 文永堂出版, 東京 (1990)
- 11) OTTO G F: Proceedings of Heartworm Symposium '77, Otto G F ed., 22~30, Veterinary Medicine Publishing, Bonner Springs (1978)
- 12) SASAKI Y, KITAGAWA H, OKACHI H et al.: Jpn J Vet Sci, 48: 579~588 (1986)
- 13) SCHLOTTHAUER J C, STROMBERG B E, PAUL A J et al.: Proceedings of Heartworm Symposium '86, Otto G F ed., 29~32, American Heartworm Society, Washington (1987)
- 14) TONELLI Q J: Proceedings of Heartworm Symposium '89, Otto G F ed., 161~165, American Heartworm Society, Washington (1990)
- 15) WEIL G J: Proceedings of Heartworm Symposium '86, Otto G F ed., 95~98, American Heartworm Society, Washington (1987)
- 16) WONG M M, THOMFORD J W: J Am Anim Hosp Assoc, 27, 33~38 (1991)