

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特許公報 (B 1)

(11)特許番号

特許第3016021号

(P 3 0 1 6 0 2 1)

(45)発行日 平成12年 3 月 6 日(2000.3.6)

(24)登録日 平成11年12月24日(1999.12.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	
G01N 33/569		G01N 33/569	A
C12Q 1/04		C12Q 1/04	
G01N 33/531		G01N 33/531	B
33/543	501	33/543	M
	545		M

請求項の数 1 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平10 - 317776	(73)特許権者	591111248 農林水産省家畜衛生試験場長 茨城県つくば市観音台 3 - 1 - 1
(22)出願日	平成10年11月 9 日(1998.11.9)	(72)発明者	清水 眞也 茨城県つくば市並木 3 丁目621 - 1
審査請求日	平成10年11月 9 日(1998.11.9)	(72)発明者	山根 逸郎 茨城県つくば市観音台 1 - 34 - 31
		(72)発明者	國保 健浩 千葉県我孫子市布佐平和平台 5 - 20 - 11
		(72)発明者	衛藤 真理子 神奈川県横浜市港南区日野 6 - 11 - 18 - 310
		(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外 2 名)
		審査官	亀田 宏之

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ネオスポーラ感染判別方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の工程 (a) ~ (e) を含むことを特徴とするネオスポーラ感染判別方法。

(a) ネオスポーラ抗原を固相に固定化した後、余剰のネオスポーラ抗原を除去する工程

(b) 前記固相にホニユウ類以外の生物由来の抗体を加えた後、余剰の抗体を除去する工程

(c) 前記固相に対象動物の血清を加えた後、抗原抗体複合体以外の物質を除去する工程

(d) 前記抗原抗体複合体を標識プロテイン A G を利用して検出する工程

(e) 前記抗原抗体複合体の存在の有無により、対象動物の血清中のネオスポーラ抗原に対する抗体の有無を判別し、これによって対象動物のネオスポーラ感染の有無を判別する工程

2

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明はネオスポーラ感染判別方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】ネオスポーラ (Neospora cunicum) は1988年に確認された新種の原虫であり、多種の哺乳動物 (牛、犬、山羊、羊、馬、鹿等) へ感染することが報告されている (Dubey J.P. and Lindsay D.S., Vet. Parasit., 1996, 67, pp1-59) 。哺乳動物にネオスポーラが感染すると、犬では感染すると成犬、幼犬ともに神経症状を呈する。成牛では通常感染しても症状は認められない。しかし、母牛では死産、流産が発生し、また、虚弱児あるいは神経症状を伴った新生児の出産が発生する。ネオスポーラによる牛における死産、流産は妊娠中期に

起こるため搾乳牛においては、出産後の牛乳の生産は不可能となる。また、幼牛の死流産は、肉牛および乳牛の生産計画を大きく狂わし、畜産経営に大きな被害を与える。死流産の原因としては、ウイルスが大きく関与していると考えられているが、ネオスポーラに起因する例も相当数存在すると考えられている。従って、ネオスポーラ感染の有無を判別することは、畜産業等において非常に重要である。

【0003】ネオスポーラの感染経路としては、胎盤感染が報告されているが (Anderson et al., 1991, J. Am. Vet. Med. Assoc. 198, pp214-244, Thurmond et al., 1995, J. Para., 81, pp364-367)、胎盤感染以外の感染経路は現在のところ不明である。従って、現時点では、ネオスポーラに感染した母動物の摘発が、ネオスポーラ感染を予防する有効な手段であると考えられている。対象動物がネオスポーラに感染しているか否かは、一般的に、対象動物の血清中にネオスポーラに対する抗体が存在しているか否かにより判別され、その判別手法として間接蛍光抗体法、ELISA法等が用いられている。ELISA法を用いた判別方法は、一般的に以下の方法により行われている。

【0004】ネオスポーラを捕捉用免疫反応体として固相に固定化した後、これに対象動物の血清を加え、ネオスポーラとネオスポーラに対する抗体とを反応させて抗原抗体複合体を形成させる。抗原抗体複合体以外の物質を洗い流した後、抗原抗体複合体中のネオスポーラに対する抗体に結合し得る酵素標識 2 次抗体を加え、抗原抗体複合体と酵素標識 2 次抗体とを結合させる。未反応の酵素標識 2 次抗体を洗い流した後、酵素の基質を加え、酵素と基質とを反応させる。反応による吸光度の変化によって抗原抗体複合体の存在の有無を確認する。その結果、抗原抗体複合体が存在する場合には、対象動物の血清中にネオスポーラに対する抗体が存在していること、すなわち、対象動物がネオスポーラに感染していることが明らかとなり、一方、抗原抗体複合体が存在しない場合には、対象動物の血清中にネオスポーラに対する抗体が存在しないこと、すなわち、対象動物がネオスポーラに感染していないことが明らかとなる。

【0005】しかし、上記ELISA法においては、被検血清或いは酵素標識 2 次抗体が非特異的の反応を起こし、ネオスポーラ未感染の対象動物の血清 (陰性血清) が擬陽性を示すことが多く、対象動物のネオスポーラ感染を明確に判別することが困難であった。なお、このような被検血清或いは酵素標識 2 次抗体の非特異的の反応の原因は、現在のところ特定されていない。

【0006】このような状況の下、CI ELISA法 (競合法によるエライサ法) (Baszler TV et al., J.Clin.Microbiol., 1996, 34(6), 1423-1428)、全原虫体を抗原として用いたELISA法 (Williams DJ et al., Vet.Rec., 1997, 29, 140(13), 328-331)、組換え抗原を利用し

たELISA法 (Louie K et al., Clin.Diagn. Lab. Immunol., 1997, 4(6), 692-699)、ISCOM ELISA法 (Bjorkman C et al., Vet. Parasitol., 1997, 68(3), 251-260)、カイネティックELISA法 (Pare J et al., J.Vet.Diagn. Invest., 1995, 7(3), 273-275) 等の、反応特異性を高めた種々のELISA法が報告されている。

【0007】しかし、これらの方法によっても十分な特異反応が得られない場合が多く、また、十分な特異反応が得られる場合であっても、ELISA法の特徴である簡便性、高感度等の利点が失われ、実用性に乏しいものとなっている。従って、現時点においては、非特異的の反応が起こるため判別に熟練を要し、さらに判別に主観が入るため結果の統一性がない等の問題があるものの、間接蛍光抗体法がネオスポーラ感染の血清判別方法の標準的手法となっている。そこで、対象動物のネオスポーラ感染の有無を精度よく判別でき、かつ操作も簡便であるネオスポーラ感染判別方法の開発が切望されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、対象動物のネオスポーラ感染の有無を精度よく判別でき、かつ操作も簡便であるネオスポーラ感染判別方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ネオスポーラの血清反応における非特異的の反応の原因の可能性の一つとして、ネオスポーラ抗原そのものがイムノグロブリンを非特異的に吸着する可能性があると考えに至った。そこで従来のエライサ法を用いたネオスポーラ感染判別方法において、ネオスポーラ抗原そのものがイムノグロブリンを非特異的に吸着する部位をプロテインAGとは反応しないニワトリ血清中のニワトリイムノグロブリンによりブロッキングし、さらに酵素標識 2 次抗体を用いるかわりに酵素標識プロテインAGを用いることにより、酵素標識 2 次抗体を用いた場合に生じるような非特異的の反応を除去することができることを見出した。プロテインAGを使用することによりネオスポーラ感染を判別できる対象動物の範囲が広範なものとなることを見出した。さらに、プロテインAGを用いたELISA法は、他のネオスポーラに類似した寄生虫に感染した動物の血清とは交差反応を起こさず、ネオスポーラ感染を特異的に判別できることを見出した。

【0010】以上の知見により本発明は完成されるに至った。即ち、本発明は、以下の工程 (a) ~ (e) を含むことを特徴とするネオスポーラ感染判別方法である。

(a) ネオスポーラ抗原を固相に固定化した後、余剰のネオスポーラ抗原を除去する工程

(b) 前記固相にホニウウ類以外の生物由来の抗体を加えた後、余剰の抗体を除去する工程

(c) 前記固相に対象動物の血清を加えた後、抗原抗体

複合体以外の物質を除去する工程

(d) 前記抗原抗体複合体を標識プロテイン A G を利用して検出する工程

(e) 前記抗原抗体複合体の存在の有無により、対象動物の血清中のネオスポーラ抗原に対する抗体の有無を判別し、これによって対象動物のネオスポーラ感染の有無を判別する工程

【 0 0 1 1 】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のネオスポーラ感染判別方法は、以下の工程

(a) ~ (e) を含む。

(a) ネオスポーラ抗原を固相に固定化した後、余剰のネオスポーラ抗原を除去する工程

(b) 前記固相にホニュウ類以外の生物由来の抗体を加えた後、余剰の抗体を除去する工程

(c) 前記固相に対象動物の血清を加えた後、抗原抗体複合体以外の物質を除去する工程

(d) 前記抗原抗体複合体を標識プロテイン A G を利用して検出する工程

(e) 前記抗原抗体複合体の存在の有無により、対象動物の血清中のネオスポーラ抗原に対する抗体の有無を判別し、これによって対象動物のネオスポーラ感染の有無を判別する工程

【 0 0 1 2 】以下、各工程ごとに説明する。

(1) 工程 (a)

工程 (a) は、ネオスポーラ抗原を固相に固定化した後、余剰のネオスポーラ抗原を除去する工程である。ネオスポーラは、例えば、ネオスポーラ感染細胞の培養物から、常法に従ってネオスポーラを分離・精製することにより得ることができる。

【 0 0 1 3 】ネオスポーラを固定化する固相は、ネオスポーラを固定化し得る限り、いかなるものであってもよい。例えば、プラスチック (ポリスチレン、ポリビニール、ポリカーボネート等)、ニトロセルロース膜、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、ガラス等を固相として使用することができる。

【 0 0 1 4 】ネオスポーラの固相への固定化は、常法に従って行うことができる。例えば、物理的吸着、共有結合、架橋等によってネオスポーラを固相に固定化することができる。ネオスポーラを固相に固定化する際、例えば界面活性剤によりネオスポーラを可溶化しておくのが好ましい。固相化されなかった余剰の抗原は Tween 20 添加 (0.01%) P B S で洗い流す。

【 0 0 1 5 】 (2) 工程 (b)

工程 (b) は、前記固相にホニュウ類以外の生物由来の抗体を加えた後、余剰の抗体を除去する工程である。この工程により、ネオスポーラ抗原中のイムノグロブリンと非特異的に結合する部位がマスキングされ、非特異的な抗原抗体反応を抑制できる。ここで使用するホニュウ類以外の生物由来の抗体としては、プロテイン A G と結

合しないものであればどのようなものでもよいが、ニワトリ由来の抗体が好ましい。

【 0 0 1 6 】また、この工程においては、固相中のネオスポーラが固定化されていない部分を適当なブロッキング剤でブロッキングすることが好ましい。ブロッキング剤としては、ブロックエース (大日本製薬製) 等の市販のブロッキング剤を使用することができる。余剰のブロッキング剤及びホニュウ類以外の生物由来の抗体は洗浄により除去する。

10 【 0 0 1 7 】 (3) 工程 (c)

工程 (c) は、前記固相に対象動物の血清を加えた後、抗原抗体複合体以外の物質を除去する工程である。ここで、「対象動物」とは、ネオスポーラ感染の有無を判別しようとする動物を意味する。本発明の対象動物は、ネオスポーラに感染した場合に、プロテイン A G が結合し得るネオスポーラに対する抗体を産生する動物である限り特に限定されない。例えば、ウシ、サル、クマ、シカ、イノシシ、タヌキ、ヌートリア、ハクビシン、カモシカ、犬、猫、ネズミ等ほとんど全ての哺乳類を対象と

20

【 0 0 1 8 】対象動物の血清は、常法に従って調製することができる。例えば、採血後、血液が十分に凝固した後室温で 3000rpm、15分程度遠心し、その上清を分離し、血清とすることにより、対象動物の血清を調製することができる。対象動物がネオスポーラに感染している場合には、対象動物の血清中にネオスポーラに対する抗体が含まれている。従って、ネオスポーラ抗原が固定化された固相に対象動物の血清を加えることにより、対象動物がネオスポーラに感染している場合には、固相に固定化されたネオスポーラ抗原と対象動物の血清中に含まれているネオスポーラに対する抗体とが反応し、抗原抗体複合体が形成される。一方、対象動物がネオスポーラに感染していない場合には、このような抗原抗体複合体は形成されない。

30

【 0 0 1 9 】引き続き前記固相に固定化されたネオスポーラ及びそれに結合したネオスポーラに対する抗体からなる抗原抗体複合物以外の物質を除去する。抗原抗体複合体以外の物質を除去は、常法に従って行うことができる。例えば、Tween 20 添加 (0.01%) リン酸緩衝液 (P B S) で洗浄することにより抗原抗体複合体以外の物質を除去することができる。抗原抗体複合体以外の物質が残存している場合には、標識プロテイン A G が抗原抗体複合体に結合するほか、抗原抗体複合体以外の物質 (例えば、対象動物の血清中に含まれる他の抗体) にも結合してしまうため、以下の工程 (d) における標識プロテイン A G を利用した抗原抗体複合体の検出の精度が低下する。従って、本工程における抗原抗体複合体以外の物質の除去は、十分に行う必要がある。

40

【 0 0 2 0 】 (4) 工程 (d)

50 工程 (d) は、前記抗原抗体複合体を、標識プロテイン

A G を利用して検出する工程である。プロテイン A G は市販のものを使用することができる。標識プロテイン A G の標識は、抗原抗体複合体を検出し得る限り特に限定されない。このような標識としては、例えば、酵素、蛍光色素、アイソトープ等を使用することができる。酵素としては、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等が挙げられ、蛍光色素としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、トリマムロダミンイソチオシアネート (TRITC)、テキサスレッド、フィコエリスリン等が挙げられ、アイソトープとしては、例えば、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等が挙げられる。

【 0 0 2 1 】 標識プロテイン A G を利用した抗原抗体複合体の検出は、プロテイン A G の標識の種類に応じて、常法に従って行うことができる。例えば、標識として酵素を使用する場合には、酵素標識プロテイン A G を固相に加えて抗原抗体複合体と酵素標識プロテイン A G とを結合させた後、抗原抗体複合体と反応しなかった遊離の酵素標識プロテイン A G を洗浄除去し、該酵素の基質を加えて酵素と基質とを反応させ、反応産物による発色や反応前後の吸光度の変化に基づいて抗原抗体複合体を検出することができる。また、標識として蛍光色素を使用する場合には、蛍光標識プロテイン A G を固相に加えて抗原抗体複合体と蛍光標識プロテイン A G とを結合させ、未反応の蛍光標識プロテイン A G を十分に除去した後、蛍光顕微鏡等により蛍光を観察することによって抗原抗体複合体を検出することができる。また、標識としてアイソトープを使用する場合には、アイソトープ標識プロテイン A G を固相に加えて抗原抗体複合体とアイソトープ標識プロテイン A G とを結合させ、未反応のアイソトープ標識プロテイン A G を十分に除去した後、放射能を測定することによって抗原抗体複合体を検出することができる。

【 0 0 2 2 】 (5) 工程 (e)

工程 (e) は、前記抗原抗体複合体の存在の有無により、対象動物の血清中のネオスポーラに対する抗体の有無を判別し、これによって対象動物のネオスポーラ感染の有無を判別する工程である。前記工程 (d) によって抗原抗体複合体が検出された場合には、対象動物の血清中にネオスポーラに対する抗体が存在していると判別できる。一方、抗原抗体複合体が検出されない場合には、対象動物の血清中にネオスポーラに対する抗体が存在していないと判別できる。対象動物の血清中にネオスポーラに対する抗体が存在している場合には、対象動物がネオスポーラに感染していると判別できる。一方、対象動物の血清中にネオスポーラに対する抗体が存在していない場合には、対象動物がネオスポーラに感染していないと判別できる。

【 0 0 2 3 】

【実施例】〔実施例 1〕ネオスポーラ抗原の調製

ネオスポーラ JPA1 株 (Yamane et al., Vet. Rec., 1996, 138, pp652、Yamane et al., Res. Vet. Sci. 1997, 63, pp77-80) を VERO 細胞に接種した後、37℃ で培養した。ネオスポーラが増殖した時点で VERO 細胞ごとにかき集め、リン酸緩衝液 (pH 7.2) (以下、「PBS」という) に浮遊させ、23G の注射針を通過させて細胞を破壊した。細胞破壊物に PBS を加え遠心洗浄した後、PBS に再浮遊させ、セファデックス 25GM カラム (ファルマシアバイオテック社製) を通過させてネオスポーラを精製した。10 精製したネオスポーラのタキゾイド以外の混入物が確認された場合には、パーコールによる比重遠心法でさらに精製した。精製後、タキゾイド以外の混入物がほとんど存在しないことを鏡検により確認した。この精製ネオスポーラを、以下「ネオスポーラ抗原」とよぶ。精製したネオスポーラのタキゾイドに PBS を加え遠心洗浄した後、PBS に再浮遊させ、少量ごと分注し、使用時まで - 80℃ で保存した。保存ネオスポーラ抗原のタンパク質濃度は 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【 0 0 2 4 】〔実施例 2〕プロテイン A G を用いた ELISA 法によるネオスポーラ感染の判別

ネオスポーラ抗原と 0.04% Triton x-100 を含む PBS とを同量混合した後、数時間静置し、ネオスポーラ抗原を可溶化した。可溶化したネオスポーラ抗原を炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 40 倍に希釈し、この希釈液を 96 ウェル ELISA プレート (Maxsorp, Nunc) に 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注した。36℃ で 1 時間静置した後、0.01% Tween20 を含む PBS 400 $\mu\text{l}/\text{well}$ で 4 回洗浄し、余剰のネオスポーラ抗原を洗い流した。その後、5% ニワトリ血清及び 2% ブロックエース (大日本製薬社製) を含む PBS を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注し、36℃ で 1 時間静置しブロッキングした。ブロッキング後、0.01% Tween20 を含む PBS 400 $\mu\text{l}/\text{well}$ で 4 回洗浄した。

【 0 0 2 5 】ネオスポーラ感染が確認されたウシ血清 (以下、「ウシ陽性血清」という) (蛍光抗体価 3200 倍) 及びネオスポーラ未感染が確認されたウシ血清 (以下、「ウシ陰性血清」という) (蛍光抗体価 10 倍以下) を、0.01% Tween20 及び 2% ブロックエースを含む PBS で 100 倍に希釈し、各々、100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ずつ分注した。36℃ で 1 時間静置した後、0.01% Tween20 を含む PBS 400 $\mu\text{l}/\text{well}$ で 4 回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識プロテイン A G (Prozyme) 又はペルオキシダーゼ標識抗ウシイムノグロブリン (Cappel) を 0.01% Tween20 及び 2% ブロックエースを含む PBS で各々 1500 倍、2000 倍に希釈し、各々、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注した。36℃ で 1 時間静置した後、0.01% Tween20 を含む PBS 400 $\mu\text{l}/\text{well}$ で 4 回洗浄した。

【 0 0 2 6 】次いで、発色液 (ABT : 2.2. Azino di (3-ethylbenzthioline sulfate (6)) を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注した。36℃ で 1 時間静置した後、反応停止液 (5% SDS 溶液) を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注し、吸光度を測定した。ネオスポーラ抗原を吸着させていないウェルに上記と同様

の操作を施し、吸光度を測定し、試料のバックグラウンドとした。また、プレートごとの揺らぎを補正するため、各プレートに標準陽性血清のウェルを設けて、得られた吸光度を次式により補正し、ELISA値とした。

【 0 0 2 7 】なお、標準陽性血清とは、血清反応におけるデータのばらつきを補正するために用いる血清のことをいい、本試験で用いているネオスポーラ標準陽性血清は、ネオスポーラ感染牛に由来し、ネオスポーラ間接蛍光抗体価3200倍、ネオスポーラのELISAによる吸光度はほぼ1.0で、ネオスポーラ類似寄生虫に対する抗体陰性の血清である。また、標準陽性血清を用いることにより、血清反応におけるデータのばらつきを補正するばかりでなく、各血清反応において予定された結果が得られたか否かにより、血清反応が正確に行われたかの判定も行える。

【 0 0 2 8 】

【数1】ELISA値 = (試料の吸光度 - 試料のバックグラウンド) / (標準陽性血清の吸光度 - 標準陽性血清のバックグラウンド)

ウシ陽性血清及びウシ陰性血清について、ペルオキシダーゼ標識プロテインAG及びペルオキシダーゼ標識抗ウシムノグロブリンを用いて測定した吸光度を図1に示す。図1中、縦軸は吸光度を示し、横軸の「PAG」はペルオキシダーゼ標識プロテインAGを、「IgG」はペルオキシダーゼ標識抗ウシムノグロブリンを意味する。また、「NS」はウシ陰性血清を、「PS」はウシ陽性血清を意味する。

【 0 0 2 9 】図1に示すように、ウシ陰性血清(17例)の吸光度は、ペルオキシダーゼ標識プロテインAGを使用した場合には 0.116 ± 0.078 であり、ペルオキシダーゼ標識抗ウシムノグロブリンを使用した場合には 0.219 ± 0.058 であった。一方、ウシ陽性血清(6例)の吸光度は、ペルオキシダーゼ標識プロテインAGを使用した場合には 0.793 ± 0.241 であり、ペルオキシダーゼ標識抗ウシムノグロブリンを使用した場合には 0.761 ± 0.173 であった。

【 0 0 3 0 】陰性17例の平均において、吸光度はペルオキシダーゼ標識抗ウシムノグロブリンを用いた場合0.219でペルオキシダーゼ標識プロテインAGを用いた場合0.116で明らかな吸光度の減少が認められた。一方、陽性6例の吸光度に大きな違いは認められなかった。この結果、陰性血清の吸光度と陽性血清の吸光度の差がペルオキシダーゼ標識プロテインAGを用いた方が大きくなることが判明した。

【 0 0 3 1 】以上の結果より、プロテインAGを使用することにより、抗ウシムノグロブリンを使用した場合に起こるような非特異的の反応を顕著に低減することができ、ネオスポーラ非感染ウシ血清とネオスポーラ感染ウシ血清とを明確に判別できることが判明した。

【 0 0 3 2 】〔実施例3〕プロテインAGを用いたELISA

A法による判別と間接蛍光抗体法による判別との比較
ウシ陰性血清(57例)及びウシ陽性血清(30例)について、実施例2のELISA法によりELISA値を測定するとともに、間接蛍光抗体法により抗体価を測定し、得られたELISA値と抗体価とを比較した。間接蛍光抗体法は、以下のように実施した(Conrad et al., Parasit. 1993, 106, pp239-249, Yamane et al., Res. Vet. Sci. 1997, 63, pp77-80)。

【 0 0 3 3 】ネオスポーラのJPA1株をVERO細胞に接種培養し、ネオスポーラが増殖した時点で細胞ごとにかき集めリン酸緩衝液(PBS, pH7.2)に浮遊させ、23G注射針を通過させ細胞を破壊後、PBSで遠心洗浄し、PBSに再浮遊させセファデックス25GMカラムを通過させ、混入物を取り除き、精製したネオスポーラタキゾイトとする。このタキゾイトを4000-40000/mlの濃度にPBSで希釈し、ウェル付きスライドグラスに20-25 μ l/well分注後、風乾し、1%パラホルムアルデヒド(PBS)に5分浸析し、PBSですすぎ、風乾後-20にて保存する(このスライドグラスを抗原スライドと呼ぶ)。被検血清をPBSで200,400,800,1600倍に希釈する。抗原スライドをPBSに5分洗浄後、乾燥させ、希釈した被検血清を10 μ l/well毎分注する。湿箱に入れ、37 1時間反応させる。PBSで洗浄し、乾燥させ、500倍に希釈したFITC標識抗ウシIgG抗体10 μ l/wellを分注し、湿箱に入れ、37 1時間反応させる。PBSで洗浄し、2.5%グリセリンPBSを数滴垂らし、カバーグラスをかけ蛍光顕微鏡で観察する。蛍光顕微鏡を用い400倍の倍率で観察し、虫体全体に蛍光が認められるものを陽性とする。血清希釈200倍以上で陽性と判断されたものを陽性とする。

【 0 0 3 4 】ELISA値と抗体価との比較結果を図2に示す。図2に示すように、間接蛍光抗体法で200倍以下の抗体価を示すウシ陰性血清の約96.5%(57例中55例)が、0.3以下のELISA値を示し、間接蛍光抗体法で200倍以上の抗体価を示すウシ陽性血清の約96.7%(30例中29例)が、0.4以上のELISA値を示した。この結果より、ELISA値が0~0.3である血清を陰性と、0.3~0.4である血清を擬陽性と、また0.4以上である血清を陽性とする判定基準が得られた。

【 0 0 3 5 】〔実施例4〕交差反応の有無の確認
実施例2において使用したウシ陽性血清及びウシ陰性血清の代わりに、Sarcocystis cruzi、Hammondia hammondi、Toxoplasma gondii又はBesnoitia wallacei等の寄生虫に感染したウシ、ウサギ、ヤギ、ブタ、マウス又はネコの血清を使用し、実施例2と同様にして吸光度を測定・補正し、ELISA値を求めた。その結果を図3に示す。図3中、「b」はウシ血清、「r」はウサギ血清、「g」はヤギ血清、「p」はブタ血清、「m」はマウス血清、「c」はネコ血清を表す。

【 0 0 3 6 】図3に示すように、Sarcocystis cruzi、H

ammondia hammondi、Toxoplasma gondii又はBesnoitia wallaceiに感染したウシ、ウサギ、ヤギ、ブタ、マウス又はネコの血清のいずれにおいても、ELISA値は0.4以下であり、陽性とは判別されなかった。従って、実施例2のELISA法は、他の寄生虫に感染した動物の血清とは交差反応を起こさず、ネオスポーラ感染を特異的に判別できることが判明した。

【 0 0 3 7 】

【発明の効果】本発明により、ネオスポーラ感染の判別方法が提供される。本発明のネオスポーラ感染の判別方法によれば、対象動物のネオスポーラ感染の有無を精度よく判別することができる。また、本発明のネオスポーラ感染の判別方法は、操作も簡便であるとともに、広範な哺乳動物に適用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ペルオキシダーゼ標識プロテインAG及びペルオキシダーゼ標識抗ウシムノグロブリンを使用して得られたウシ陰性血清及びウシ陽性血清の吸光度を比較した図である。

【図2】ネオスポーラ非感染ウシ血清及びネオスポーラ感染ウシ血清のELISA値及び蛍光抗体価を比較した図で

ある。

【図3】ネオスポーラ以外の寄生虫に感染した動物血清を使用した場合のELISA値を表す図である。

【要約】

【解決手段】以下の工程(a)~(e)を含むことを特徴とするネオスポーラ感染判別方法である。

(a)ネオスポーラ抗原を固相に固定化した後、余剰のネオスポーラ抗原を除去する工程

(b)前記固相にホニユウ類以外の生物由来の抗体を加えた後、余剰の抗体を除去する工程

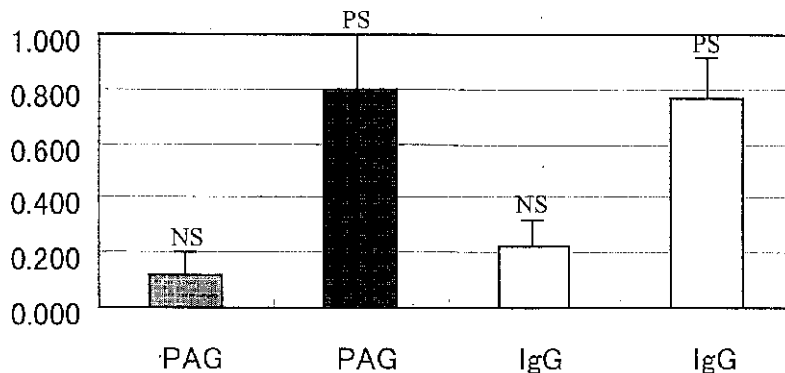
(c)前記固相に対象動物の血清を加えた後、抗原抗体複合体以外の物質を除去する工程

(d)前記抗原抗体複合体を標識プロテインAGを利用して検出する工程

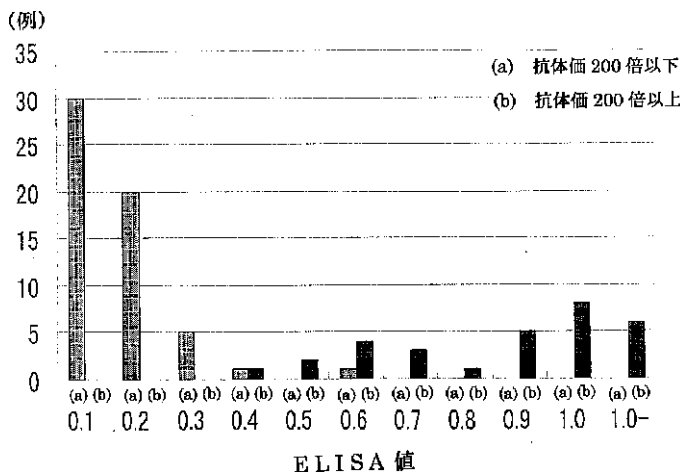
(e)前記抗原抗体複合体の存在の有無により、対象動物の血清中のネオスポーラ抗原に対する抗体の有無を判別し、これによって対象動物のネオスポーラ感染の有無を判別する工程

【効果】対象動物のネオスポーラ感染の有無を精度よく判別できる。

【図1】



【図2】



【 図 3 】

ELISA 値	
<i>Sarcocystis cruzi</i>	0.064(b) 0.221(r) 0.048(r)
<i>Hammondia hammondi</i>	0.018(r) 0.051(g) 0.307(p)
<i>Toxoplasma gondii</i>	0.051(m) 0.022(m) 0.018(m) 0.034(m) 0.025(m) 0.019(m) 0.028(m) 0.007(m) 0.010(m) 0.016(m) 0.209(c) 0.170(r) 0.368(r) 0.136(g) 0.358(p)
<i>Besnoitia wallacei</i>	0.010(c) 0.018(c) 0.034(c) 0.013(c) 0.019(c) 0.016(r) 0.000 (r) 0.010(r) 0.056(r) 0.010(r)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
/(C 1 2 Q 1/04 C 1 2 R 1:90)		
(72)発明者 志村 亀夫 茨城県つくば市並木 3 丁目 1 - 525 - 1	(72)発明者 猪島 康雄 茨城県つくば市吾妻 2 - 713 - 1001	
(72)発明者 播谷 亮 千葉県我孫子市並木 7 - 2 - 4	(58)調査した分野(Int.Cl. ⁷ , D B 名)	
(72)発明者 浜岡 隆文 茨城県つくば市松代 5 - 724 - 2	G01N 33/569 C12Q 1/04 G01N 33/531 G01N 33/543	