

アニサキス I 型幼虫に特異的な抗原群のモノクローナル抗体 による解析とその応用に関する研究

高橋 秀史

札幌医科大学外科学第1講座 (主任 早坂 滉 教授)

佐藤 昇志

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

Analysis of Anisakis Larvae Specific Antigens Using Monoclonal Antibodies and Their Application

Shuji TAKAHASHI

*Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. H. Hayasaka)*

Noriyuki SATO

*Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. K. Kikuchi)*

Seven novel monoclonal antibodies reacting specifically against Anisakis larvae (type I, L3) were generated by fusing mouse myeloma NS-1 and spleen cells from Balb/c mice immunized with solubilized antigen of Anisakis larvae. All of these monoclonal antibodies (An1-An7) failed to show any reactivity against *Ascaris suum*, *Dirofilaria immitis*, *Toxocara cati*, *Trichinella spiralis*, *Echinococcus multilocularis*, and human tissues, except for a weak reactivity of An6 against intestine of *Ascaris suum*. These were reactive not only to solubilized antigens on ELISA but also to frozen sections of the larvae; An1 reacted with muscle (M) and the Renette cells (R); An2 M, R and intestine (I) and pseudocoel (P) weakly; An3 M, P and R weakly; An4 M, R, P and I weakly; An5 M and P; An6 M, I and R weakly and An7 R and I. These monoclonal antibodies indicated a high specificity of reaction to Anisakis larvae because they did not react to *Terranova* larvae (type A) which is a worm of anisakid species. An1, An2 and An6 revealed a distinct reactivity against excretory-secretory antigen (ES antigen) using ELISA method. An2 and An6 recognized the antigen of 90kd and 68kd of molecular weight, respectively, as determined in ELISA with the antigens fractionated by gel filtration. An1, An2, and An4 immunoprecipitated with the antigens of 32-36kd, 40 and 42-46kd, and 130kd of molecular weight, respectively, in Western blotting analysis. All of the antigens were apparently different from the hemoglobin of Anisakis larvae; this can be said because of the different reactivities in immunostaining and immunochemical studies. When An2 was applied for seroimmunodiagnosis of patients with anisakiasis, it was shown that this monoclonal antibody may be useful because of the improved specificity using ELISA analysis. Collectively, these monoclonal antibodies have potentially important values in investigating the taxonomical, pathological, and serodiagnostic features of Anisakis larvae. (Received January 9, 1987 and accepted January 26, 1987)

Key words: Monoclonal antibodies, Anisakis larvae, Specific antigens, Immunodiagnosis

1 結 言

アニサキス症は、魚介類を生食する習慣をもつ我国において、北海道から九州、沖縄まで普遍的に発生している。近年、欧米でも報告例がふえている^{1,2)}。van Thielら³⁾により初めて報告されたオランダは、その後、全ての魚介類が冷凍される事が法制化されて以来、その発症は激減したが、このような事は、新鮮さを求める我国においては、非現実的であり、今後も多くの発症が予想される。一方、普遍的な疾患でありながら、現在尚、その発症機序、診断方法に関し、未解明の部分を残している。数多いアニサキス属線虫類のなかで、Anisakis larvae (type I), (type II), Terranova larvae (type A)が、現在まで、幼虫移行症としての人に対する病原性が確かめられており、アニサキス症とよばれているが、他の種類での病原性はまだ確定していない。また、それらの種類は、形態学的に分類されるが、その基準は未だ統一されていない⁴⁾。そのため、形態学的鑑別のみならず、抗原分析や⁵⁾、免疫染色などによる同定も試みられてきている⁶⁾。一方、アニサキス症では、好酸球浸潤、高度の浮腫、肉芽腫形成等の特徴的な病理学的所見が認められており、それらの原因として、再感染によるアレルギー反応や、好酸球遊走因子の関与等が考えられている。そのためアニサキス虫体や、その分泌排出抗原 (Excretory-Secretory Antigen, ES 抗原) の抗原的解析、とりわけ特異抗原の解析は、病因論的に重要な意味をもつと考えられる。さらに、アニサキス症がよく知られた疾患となり、内視鏡が発達した現代においても、診断に難渋する例があり、特異性の高い免疫学的診断法が期待される。このように、アニサキス幼虫の特異抗原の解析は、その病理学的研究、臨床診断学的応用の可能性を探るうえで、極めて重要であると思われる。

著者らは、アニサキス幼虫に対するモノクローナル抗体 (MoAb) を作製し、アニサキス幼虫に極めて特異的な抗原について、解剖学的局在、生化学的性状を解析し、さらに、免疫学的診断への応用を試み、新知見を得たので報告する。

2 実験方法

2.1 アニサキス幼虫とその他の寄生虫

2.1.1 アニサキス幼虫とブタ回虫の可溶性抗原

アニサキス幼虫 (type I, L3) は、北海道近海のスケトウダラの肝臓被膜下より摘出し、十分に被膜を取り除いたあと、細切し、リン酸緩衝液 (PBS) 中にてホ

モジェナイズし、3,000 rpm, 10 分間遠心後、上清を、さらに冷却超遠心機にて、100,000×G, 1 時間遠心し、その上清を、アニサキス幼虫可溶性抗原 (AN 抗原) として、動物の免疫と酵素抗体法に使用した。一部の虫体は、凍結切片とし、免疫染色に使用した。ES 抗原は、25 隻のアニサキス幼虫を三角フラスコ内で、3 ml PBS 中にて、37°C で incubate し、3 日間にわたり、24 時間毎に、全上清を交換、回収し、上記処理をすることにより得た。

ブタ回虫 (*Ascaris suum*) は、食肉試験場より供与された。同様の方法にて、ブタ回虫可溶性抗原 (AS 抗原) を得て、酵素抗体法の対照抗原とした。一部は、凍結切片とし、免疫染色に使用した。これらの可溶性抗原溶液中の蛋白量は、Lowry 法⁷⁾にて測定した。

2.1.2 その他の線虫類など

Terranova larvae (type A) は、アニサキス幼虫と同様に、スケトウダラより摘出し、小山ら⁸⁾による形態学的分類に従って同定した。フィラリア (*Dirofilaria immitis*)、ネコ回虫 (*Toxocara cati*) は、札幌医科大学動物実験施設より供与された。旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) は、北海道大学獣医学部大林正士教授より、エキノкокクス (*Echinococcus multilocularis*) 抗原は、北海道立衛生研究所所長熊谷満博士より、それぞれ供与された。これらは、凍結切片や、酵素抗体法の対照抗原として使用した。

2.2 モノクローナル抗体の作製

Balb/c マウス腹腔内に、アニサキス可溶性抗原 (200 μ g) を毎週 1 回、計 5 回免疫し、最終免疫の 4 日後に、免疫マウス脾細胞 1×10^8 個と、Balb/c マウス由来骨髓腫細胞株 NS-1 2×10^7 個を、Köhler and Milstein⁹⁾の方法に準じて、polyethylene glycol #4000 (半井化学) を用いて細胞融合させた。融合細胞を 10% FCS 加 HAT-medium (1×10^{-4} M hypoxanthine, 4×10^{-7} M aminopterin, 1.6×10^{-5} M thymidine in RPMI-1640) に浮遊し、24 穴プレート (Costar, #3234) に 1 ml ずつ分注し、5% CO₂, 37°C にて 10 日間培養した。融合細胞を選択した後、10% FCS 加 HT-medium (1×10^{-4} M hypoxanthine, 1.6×10^{-5} M thymidine in RPMI-1640) にて培養を続けた。融合細胞が増殖してきたウェルの培養上清を、下記の Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) にてスクリーニングした。さらに、限界希釈法にて、これらの細胞をクローニングし、MoAb 産生株として継代培養を続けた。クローニング後、MoAb 産生株を、Balb/c マウス腹腔内にて腹水化し、硫酸塩析にて精製し、後の検索に用い

た。MoAb の Ig isotype は, rabbit anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA にて, ELISA 法 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, U. S. A.) にて行なった。

2.3 microELISA 法によるスクリーニング

AN 抗原 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) $50 \mu\text{l}$ と, AS 抗原 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) $100 \mu\text{l}$ を, microELISA plate (Immulon 2, Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, U. S. A.) に, 37°C , 1 時間吸着させた後, 10% スキムミルク (雪印) (SM-PBS) にて, 各ウェルを満らし, 蛋白吸着部位をブロックした。0.05% Tween (PBS) にて, 洗浄した後, 融合細胞上清 $50 \mu\text{l}$ を加え, 37°C , 1 時間反応させた。洗浄後, 1,000 倍希釈の peroxidase conjugated goat anti-mouse Ig (Kirkegaard & Perry Labo., Gaithersburg, U. S. A.) $50 \mu\text{l}$ を加え, 37°C , 1 時間反応させた。十分な洗浄後, 発色液として, 基質は 2,2'-azinobis (3-ethylbenz-thiazolinesulfonic acid) Diammonium salt (Sigma, St. Louis, U. S. A.) (ABTS) を用い, 基質用 buffer (0.05 M citric acid, NaOH を加え pH 4.0 に調整) にて $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し (ABTS citrate buffer), $100 \mu\text{l}$ ずつ加え, 0.01% H_2O_2 の存在下で発色させた。 37°C , 30 分間暗所にて反応させ自動 ELISA reader (Dynatech MR600, Dynatech) を用い, 410 nm の波長にて, 吸光度を測定した。

3 日間に産生された ES 抗原と, MoAb の反応性も, 抗原を ES 抗原に置き換えて, 同様の micro-ELISA にて行なった。

2.4 蛍光抗体法

既述の各虫体を, 液体窒素にて凍結後, 薄切切片 ($4 \mu\text{m}$) とし, 冷アセトン 5 分間固定後, 各 MoAb との反応性を検索した。二次抗体として fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated goat anti-mouse Ig を用い, 間接蛍光抗体法にて, Leiz Ortholux microscope (vertical U. V.) にて判定した。

2.5 抗原分子の検索

2.5.1 Gel filtration

AN 抗原 $10 \text{ mg}/2 \text{ ml}$ を 0.01% sodium azide 加 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 にて平衡化し, Sephadex G200 にてゲル濾過分画し, 各分画と MoAb の反応性を microELISA にて検索した。

各分画を蛋白量 $70 \mu\text{g}/\text{ml}$ にそろえ, $50 \mu\text{g}/\text{well}$ にて microELISA Plate に 37°C , 1 時間吸着させた。0.05% TritonX 加 PBS にて洗浄後, 10% SM-PBS にて, 37°C , 1 時間 incubate した。MoAb $50 \mu\text{l}$ を各

well に加え, 37°C , 1 時間 incubate した。洗浄後, 1,000 倍希釈 peroxidase conjugated goat anti-mouse Ig (Kirkegaard & Perry Labo.) $50 \mu\text{l}$ を加え, 37°C , 1 時間 incubate した。ABTS citrate buffer にて発色し, 410 nm にて吸光度を測定した。

分子量は, Blue dextran 200, Ferritin (440kd), Aldolase (158kd), Ovalbumine (43kd), Ribonuclease A (13.7 kd) を標準分子として溶出し, 下に示した公式で, 各基準蛋白の K_{av} と分子量 (対数) との関係から得られた検量曲線を用いて分子量を推定した。

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_t : total bed volume

V_o : void volume

V_e : sample elution volume

2.5.2 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 及び Western blotting method

AN 抗原 (1 mg) を, 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS を含んだ 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 (Sample buffer) $100 \mu\text{l}$ と室温にて 1 時間 incubate し, これを SDS-PAGE 用の試料とした。SDS-PAGE は, Laemmli¹⁰⁾ の方法に準じて, 10% polyacrylamide, 0.1% SDS の条件で, スラブゲル電気泳動槽 (Bio-rad, California, U. S. A.) を用いておこなった。ゲルのマーカ部分の固定・染色を 0.025% Coomassie brilliant blue R-250, 45.5% methanol, 9% acetic acid 混合液で室温にて 2 時間行ない, 脱色をエタノール氷酢酸混合液で室温にて 12 時間おこなった。分子量マーカーは, phosphorylase b (93 kd), bovine serum albumin (67 kd), ovalbumin (43 kd), carbonic anhydrase (30 kd), trypsin inhibitor (20 kd), α -lactalbumin (14kd) の 6 種の混合液を用いた。

さらに, 抗原を展開したゲルは, 電気泳動式トランスブロットング装置 (Bio-rad) にて, Zeta-probe membrane (Bio-rad) 上に blotting した。スキムミルク緩衝液 (5% SM-buffer) (0.05 M Tris-HCl, 0.14 M NaCl, pH 8.0, 0.1% NP40) にて処理した後, MoAb を加え, 室温にて, 1 時間反応させ, 5% SM-buffer にて洗浄後, biotinylated goat anti-mouse Ig を 1 時間反応させた。洗浄後, 1,500 倍希釈 Horseradish peroxidase avidin D (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, U. S. A.) を 30 分間反応させた。洗浄後, 5 mg O-Dianisidine を基質として, 0.01 M Tris-HCl, 0.14 M NaCl, 0.02% H_2O_2

の基質溶液中にて発色させた。

2.6 モノクローナル抗体を応用した microELISA によるアニサキス抗体の検出

microELISA Plate (MS-3596F/H, 住友ベークライト) に精製した MoAb An2 (10 $\mu\text{g/ml}$, 100 μl) を各 well に加え, 37°C, 1 時間吸着させた。洗浄後, 10% SM-PBS にて, 各 well を充満し, 37°C, 1 時間 incubate した。次に, AN 抗原 (100 $\mu\text{g/ml}$, 50 μl) を加え, 37°C, 1 時間 incubate した。十分に洗浄した後, 10 倍希釈の検体血清を 50 μl ずつ duplicate で加えた。洗浄後, 1,000 倍希釈 peroxidase conjugated goat anti-human Ig (GAM) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) 100 μl ずつ加え, 37°C, 1 時間反応させた。洗浄後, ABTS citrate buffer 100 μl 加え, 37°C, 30 分後, 410 nm にて吸光度を測定した (MR600 microplate reader)。

3 結果

3.1 microELISA による Hybridoma screening の結果

Fig. 1 に, screening 時における, hybridoma 上清の microELISA での反応性を示した。アニサキス幼虫でのマウス免疫血清は, AN 抗原と共に, AS 抗原にも, 強く反応を示している (mean O. D. of ANAg/ASAg; 0.347/0.314)。AN 抗原と反応した多くの hybridoma は 14B5 の様に, AS 抗原と交差反応を示している (0.119/0.111)。An2 は, AN 抗原とのみ, 強く反応し, AS 抗原とは全く交差反応を示していない (0.234/0.003)。この様に, microELISA にて, AN 抗原と反応し, AS 抗原と交差反応を示さない hybridoma を cloning し, An1~An7 の 7 種の MoAb 産生株を得た。

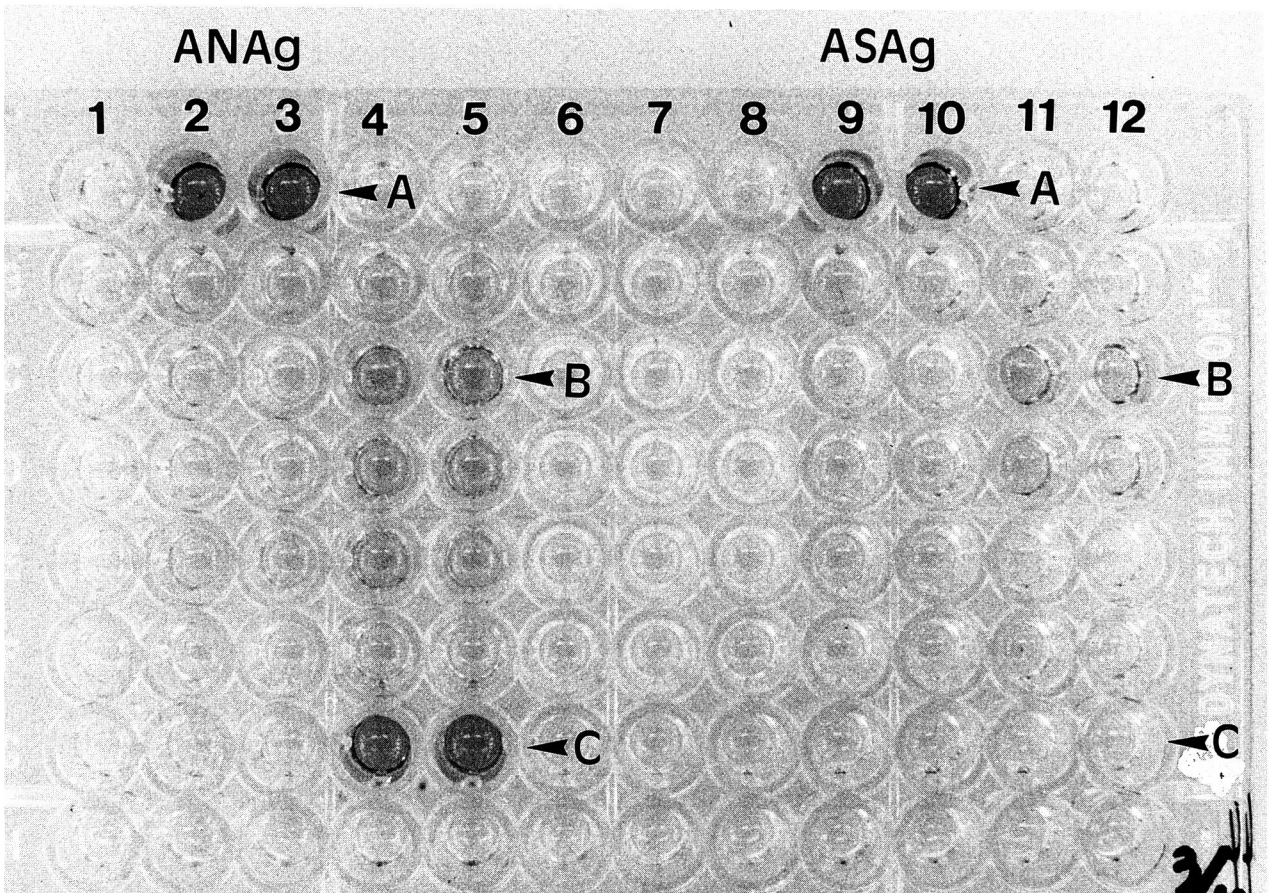


Fig. 1 The reactivity of hybridoma supernatants against ANAg and ASAg on microELISA plate. Immunized mice serum (A), hybridoma 14B5 (B), and An2 (C). ANAg (lane 2~5) and ASAg (lane 8~11) were Anisakis larvae antigen and Ascaris suum antigen, respectively.

Table 1 The reactivity of monoclonal antibodies against various parasites and human tissues.

Par. / MoAb	An1	An2	An3	An4	An5	An6	An7	5A5	13C6	14B2
Anis.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asc.	-	-	-	-	-	±	-	+	+	+
Ter.	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
T. C.	-	-	-	-	-	-	-	nd*	nd	nd
T. S.	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
E. M.	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
D. I.	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
Hum.	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
Ig	IgG1	IgG1	IgM	IgG1	IgG1	IgM	IgG1	IgM	IgA	IgG1

Par.: Parasites and human tissues, Anis.: Anisakis larvae, Asc.: Ascaris suum, Ter.: *Terranova* larvae (type A), T. C.: *Toxocara cati*, T. S.: *Trichinella spiralis*, E. M.: *Echinococcus multilocularis*, D. I.: *Dirofilaria immitis*, Hum.: Human tissues. *: not determined. Ig: isotype of monoclonal antibodies

3・2 モノクローナル抗体の特異性

Table 1 に得られた MoAb の、蛍光抗体法あるいは ELISA 法による、各寄生虫、及びヒト組織にたいする反応性をまとめた。表中の 5A5, 13C6, 14B2 のように、多くの hybridoma は予想された通りに、近縁線虫類の *Terranova* larvae (type A), *Ascaris suum* への交差反応性を示した。しかし、An6 は、蛍光抗体法にて、*Ascaris suum* の中腸部分に若干の交差反応を認め、± と判断した以外、An1~An7 は、*Terranova* larvae (type A), *Ascaris suum*, *Dirofilaria immitis*, *Toxocara cati*, *Trichinella spiralis*, *Echinococcus multilocularis* 及びヒト組織において全く交差反応性を示さなかった。アニサキス幼虫に対する極めて高い特異性を示したこれらの MoAb, An1~An7 についてさらに検索した。

Immunoglobulin の subclass は、多くは IgG1, IgM であったが、交差反応を示す MoAb の中で、13C6 の様に IgA を示すものもあり、寄生虫抗原の特殊な免疫原性を思わせた。

3・3 蛍光抗体法によるモノクローナル抗体認識抗原のアニサキス幼虫における局在

それぞれのアニサキス幼虫体の輪切り凍結切片における反応局在は、Fig. 2 の如くであり、その結果は Table 2 にまとめた。An1~An6 は、何れも筋層と強く反応し、さらに、これらのうち、An5 が強く、An2~An4 が弱く擬体腔と反応した。擬体腔のみと反応する MoAb は得られなかった。以下、それぞれの MoAb について詳述する。

An1: 主として、Renette cell (あるいは excretory

cell) と反応し、筋層内側と部分的に、また中腸周縁と弱く反応する。

An2: 筋層全体と Renette cell に反応し、擬体腔と弱く、さらに、膜状に中腸内部と反応する。

An3: 主として筋層と反応し、擬体腔、中腸周縁、Renette cell 周囲と弱く反応し、中腸とは、全く反応しない。

An4: 筋層全体と Renette cell に強く反応し、さらに擬体腔、中腸と弱く反応する。

An5: 筋層内側と強く、さらに擬体腔、中腸周縁にかけて反応し、中腸内部及び Renette cell 内部とは全く反応しない。

An6: 筋層内側と部分的に、中腸、側索の細胞内と強く反応し、Renette cell と弱く反応する。

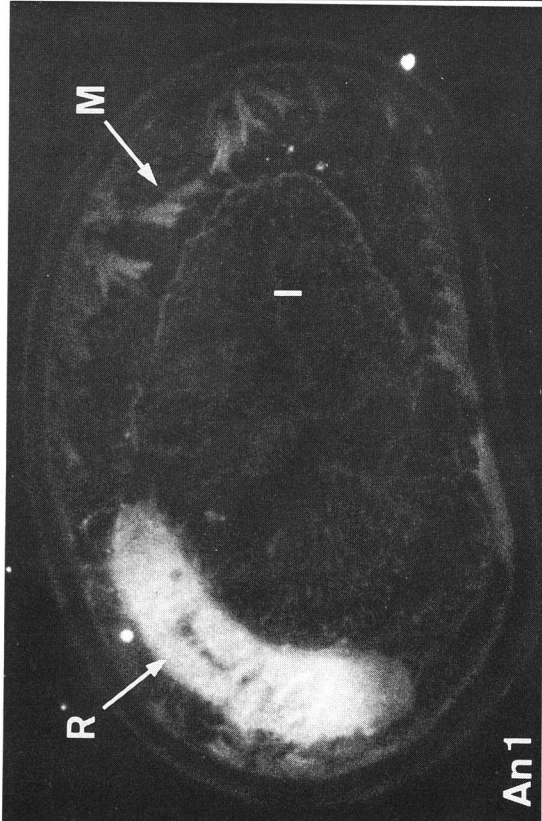
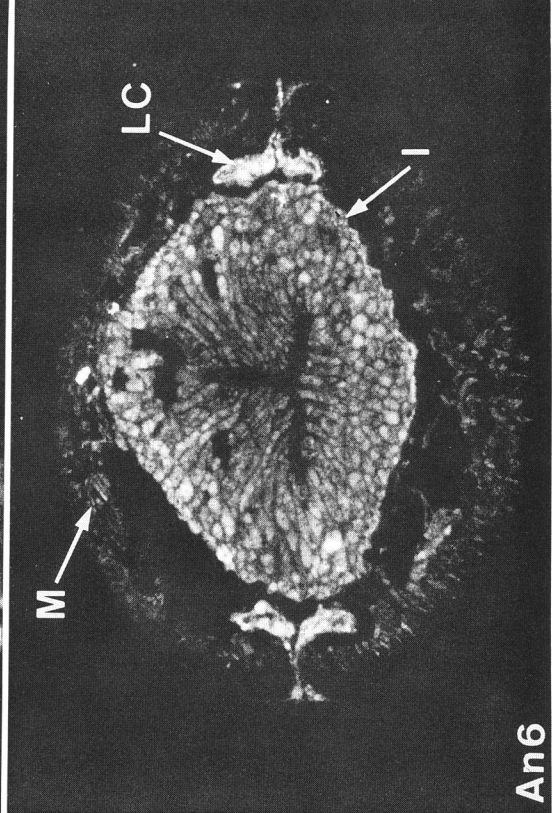
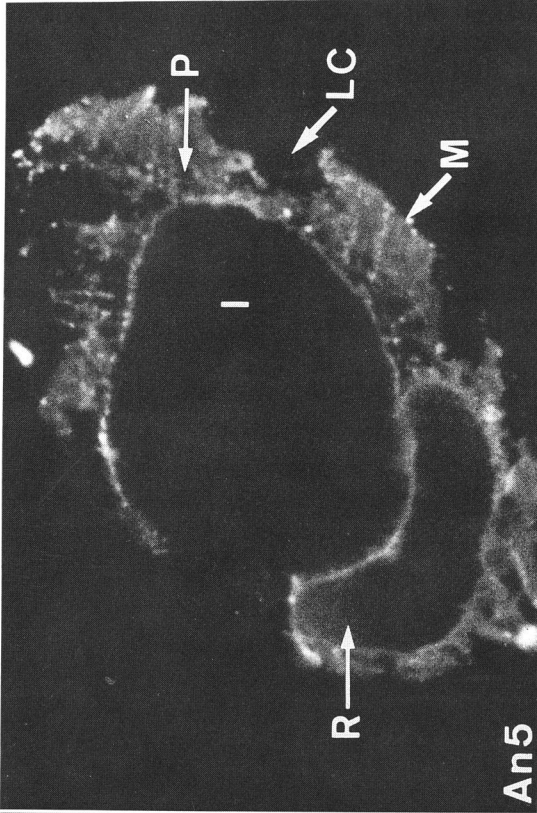
An7: Renette cell, 及び膜状に中腸内部と反応し、筋層とは、全く反応しない。

Table 2 Summary of the localization of antigens detected by monoclonal antibodies in frozen sections of *Anisakis* larvae.

MoAb	muscle	pseudocoel	R-cell	intestine	E-S antigen
An1	+	-	+	-	+
An2	+	±	+	+(m)	+
An3	+	±	±	-	-
An4	+	±	+	±	-
An5	+	+	-	-	-
An6	+	-	±	+(c)	+
An7	-	-	+	+(m)	-

+: positive, -: negative,

m: membrane, c: cytosole, R-cell: Renette cell.



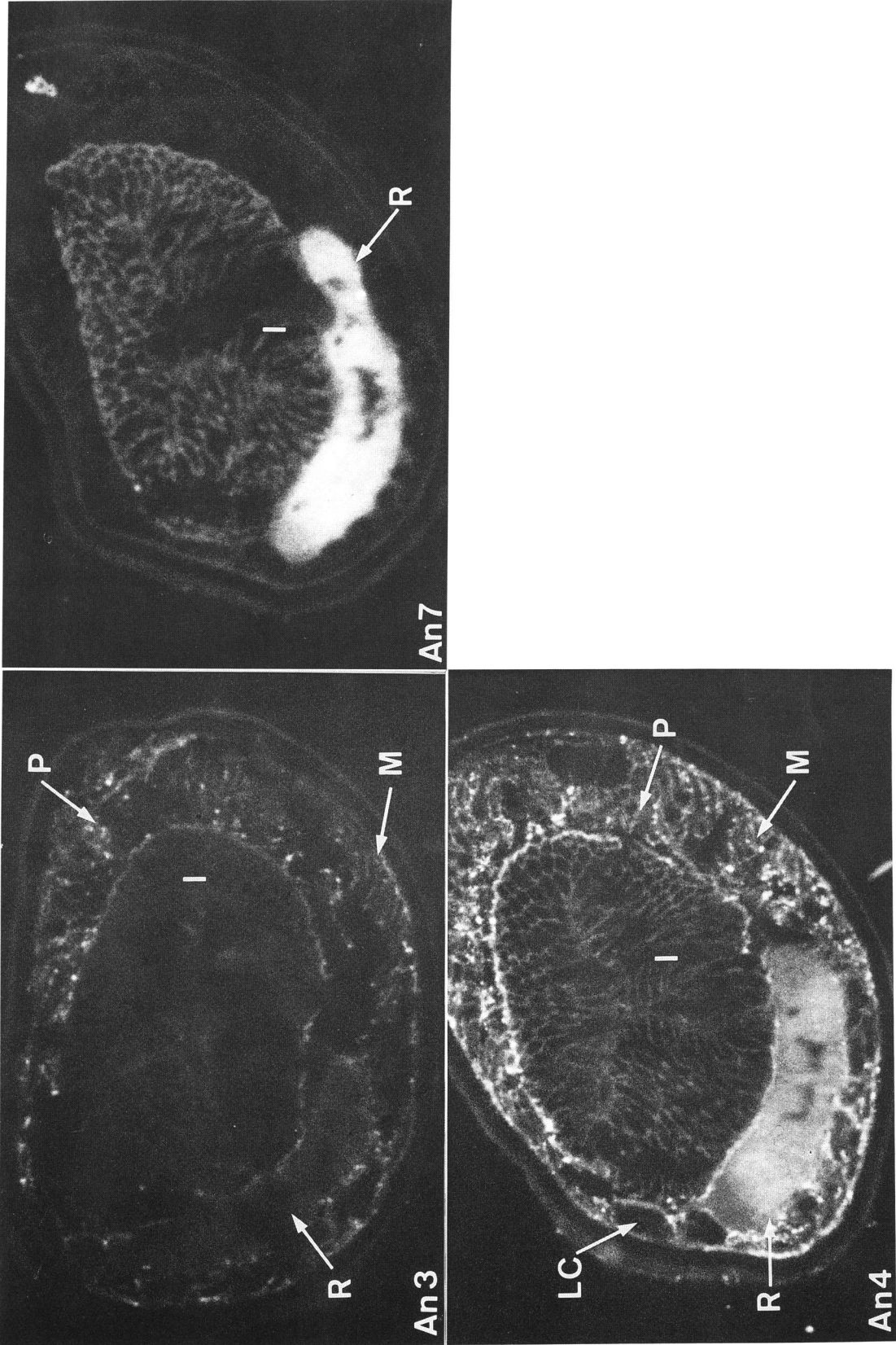


Fig. 2 Indirect immunofluorescent reactivity patterns of monoclonal antibodies, An1~An7, on frozen sections of Anisakis larvae. M: muscle, R: Renette cell, P: pseudocoel, LC: lateral cord, I: intestine. (x100)

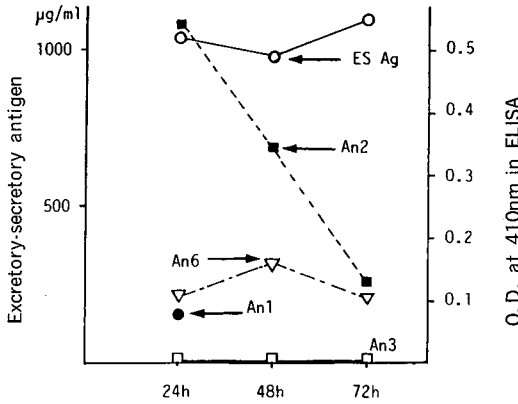


Fig. 3 The reactivities of monoclonal antibodies against ES antigen in microELISA. An1(●), An2(■), An3(□) and An6(▽). Protein content in E-S antigen was determined by the method of lowry et al (○).

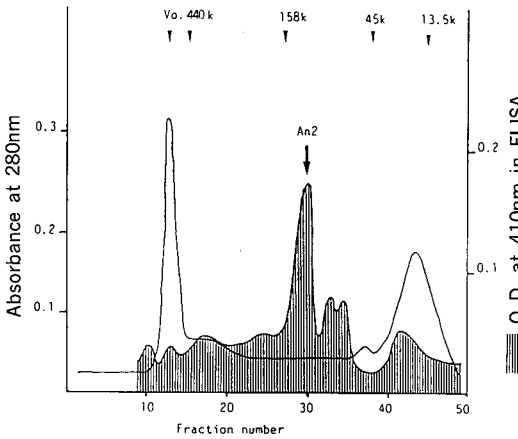


Fig. 4 Elution profile of ANAg on Sephadex G200 column and the reactivity of An2 against each fractions in ELISA.

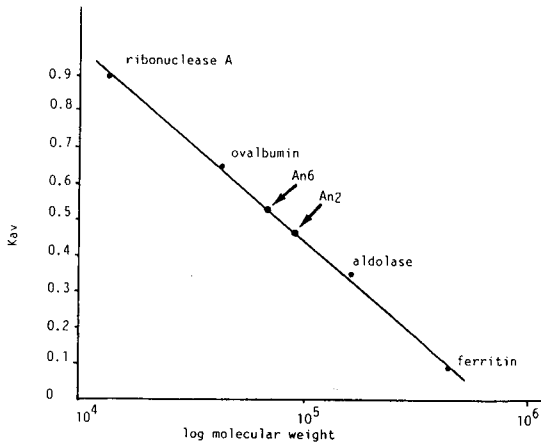


Fig. 5 Determination of molecular weight of antigens defined by monoclonal antibodies from the calibration curve on Sephadex G200 column.

3.4 Excretory-Secretory Antigen とモノクローナル抗体の反応性

3 日間に産生された ES 抗原と MoAb の反応性を ELISA にて検索したところ、An2 は 1 日目に産生された ES 抗原と強く反応し、2 日目、3 日目と漸減していった。An6 は、An2 に比しやや弱い が 3 日間を通して、constant な反応を認めた。An1 は、1 日目の抗原と弱い反応性を示した。An3 は、ES 抗原との反応性を全く認めなかった (Fig. 3)。An4, An5, An7 も An3 と同様に ES 抗原との反応性は認めなかった。クチクラ層に被包された筋層は、ES 抗原になり難いと考え、ES 抗原との反応性が明らかになった An1, An2、及び An6 は、消化管 (Intestine)、あるいは、それと関連する Renette cell と反応しており、これらの組織が ES 抗原の産生に関わる事を示すと思われる。一方、An7 は、Renette cell、中腸との反応性は認めるが、ES 抗原とは反応せず、分泌排出されない抗原を認識しているものと思われる。

3.5 Sephadex G200 による gel filtration の結果

アニサキス 幼虫 可溶性 抗原を Sephadex G200 column にてゲル濾過し、3 ml 毎に分画した。含まれる蛋白濃度を 280 nm の吸光度で測定し分画における、MoAb との反応性を ELISA にて検索した (Fig. 4)。

An2 は、分画 30 に抗原活性のピークが得られた。同様に Sephadex G200 column にて、ferritin, aldolase, ovalbumin, ribonuclease A、を溶出し、検量曲線を作製した (Fig. 5)。これにより、An2 の Kav は、0.47 であり、分子量 90 kd の抗原分子と推定された。同様の方法により、An6 は、Kav 0.53 にて、68Kd の抗原分子を認識していた。

3.6 SDS-PAGE と Western blotting による抗原解析の結果

アニサキス 幼虫 抗原を還元条件下で、SDS-PAGE にてより展開し、Western blotting にて、解析した結果、An1 は、32~36 kd の 1 本のバンドを示し、An2 は、40 kd と、42~46 kd の 2 本のバンドとして示された (Fig. 6)。An2 は、Sephadex G200 によるゲル濾過にて、90 kd の抗原を認識しており、この Western blotting の結果と合わせて、An2 は、disulfide bond を有する heterodimer の抗原を認識している可能性を示唆している。同様の方法にて、An4 は、130 kd の抗原蛋白を認識していた。

他の MoAb は、ELISA と、Western blotting のどちらにても、分子量を決定することができなかった。negative control に認められる 80~100 kd の non-

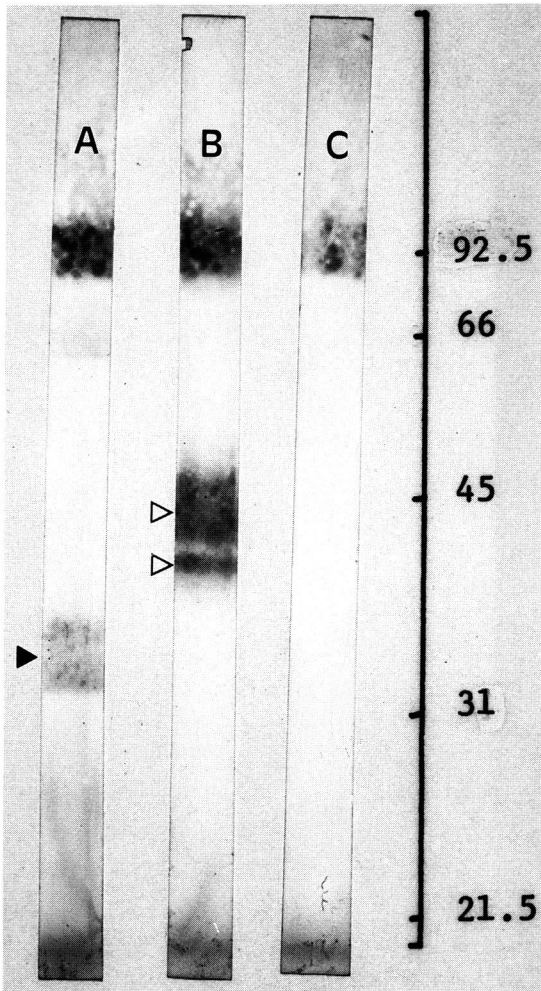


Fig. 6 Western blotting of antigen of anisakis larvae and the reactivity of monoclonal antibodies. An1 (lane A) precipitated a single component with a molecular weight of 32-36 kD (▶). An2 (lane B) precipitated two components with molecular weights of 40 and 42-46 kD (▷). Control mouse serum (lane C).

specific band は、常に検出され、Horseradish peroxidase avidin D のみにも出現し、アニサキス幼虫抗原単独では出現しないため、内因性の peroxidase とは考えにくく、アニサキス幼虫抗原には、Avidin D に親和性を有する蛋白が存在する可能性が示唆された。

3.7 モノクローナル抗体を応用した患者アニサキス抗体の検出

ES 抗原と反応し、抗原分子の解析が容易であった An2 を用いて、アニサキス症患者の血清診断に応用した。

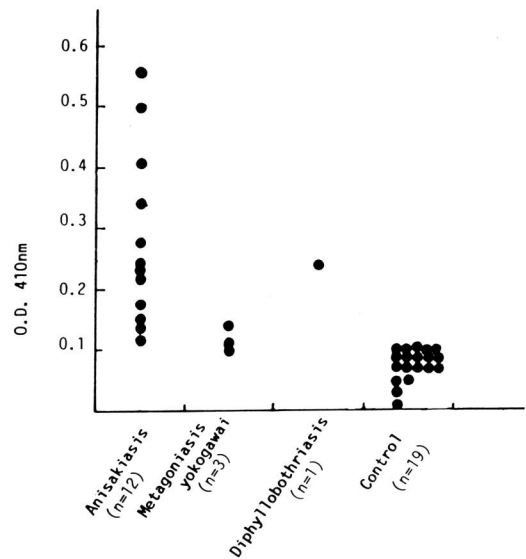


Fig. 7 The reactivity of the serum from patients with anisakiasis and other parasitic diseases against the antigens defined by monoclonal antibody An2 in ELISA.

An2 を microELISA plate に固定し、それに AN 抗原を反応させ、アニサキス症、広節裂頭条虫症、横川吸虫症、正常人の血清との反応を見た。10 倍希釈血清の Ig(GAM) について、抗体価を測定したところ、Fig. 7 に見られる如く、広節裂頭条虫症、横川吸虫症では、やや交差反応が認められたが、正常群では O.D. が 0.1 以下の極めて低い反応しか認めず、特異性の高い反応が見られた。

4 考 案

寄生虫学において、宿主と寄生虫の相互関係 (host-parasite relationship)、とりわけ宿主特異性 (host specificity) は、その根底をなす重要な現象である。しかし、近年、幼虫では、宿主特異性はかなり弾力的なもので、本来の固有宿主とは全く無関係に侵入する例があり、Beaver¹¹⁾ は、これを新しい疾患単位として臓器幼虫移行症 (visceral larva migrans) と名付けた。アニサキス症は、ヒトでの幼虫移行症の典型例とされ、本来、海獣類が固有宿主であるが、ヒトに摂取されると、消化管等に迷入し、いわゆる“アニサキス幼虫移行症”として発症するものである。

いかにして宿主の免疫を逃れるか¹²⁾、なぜ寄生虫感染は IgE や好酸球の増加をもたらすのか、どのようにして拒絶されるのか、等の寄生虫疾患の基本的問題を解明する上で、抗原の果す役割は重要と思われる¹³⁾。

Köhler and Milstein⁹⁾によって開発された MoAb は、既に、寄生虫学の分野に応用され、*Trichinella spiralis*¹⁴⁾、*Plasmodium falciparum*¹⁵⁾、*Leishmania tropica major*¹⁶⁾、*Trypanosoma congolense*¹⁷⁾等について作製され、特異抗原や、免疫病理学的解析に貢献している。特に、マラリア原虫では、その変態に伴う抗原性の変化が感染性に重要な役割を果していると考えられ、各 stage における MoAb が作製され、診断、治療への応用が考えられている¹⁸⁾。

アニサキス幼虫に関して、これまで、免疫電気泳動¹⁹⁾等の方法で特異抗原の検出が試みられてきたが、polyclonal な抗血清では吸収操作で反応性が消失する等の困難な面があった¹⁹⁾。

著者らは、アニサキス幼虫に対するモノクローナル抗体を作製することにより、アニサキス幼虫に特異的な抗原の検出を試み、7種類の抗体を得ることに成功した。

アニサキス症とは、『アニサキス属線虫により引き起こされる消化管障害』⁴⁾と定義されるが、現在尚、次の諸点につき十分に解明されていない。

- (1) アニサキス属線虫のいかなる種類が、発症しうるのか、また、その分類基準は何か。(分類学的検討)
- (2) アニサキス症発症機序に関わる抗原はどのようなものか。(発症機序と抗原に関する検討)
- (3) アニサキス症の免疫学的診断法は可能か。

主として以上の3点について、アニサキス幼虫特異的モノクローナル抗体樹立の意義と応用について検討を加える。

4・1 アニサキス幼虫の分類学的問題点とモノクローナル抗体

アニサキス線虫は、Nematoda (線虫綱)、*Ascaridata* (回虫亜目)に属し、この中には、*Ascaris suum* (ブタ回虫)、*Toxocara cati* (ネコ回虫)、*Toxocara canis* (イヌ回虫)等を含み、アニサキス属線虫には、*Anisakis*、*Terranova*、*Contraecaecum*、等が含まれる。しかし、アニサキス属の分類はいまだに未解決の点があり、この事が、既知の虫体や、新種虫体の同定を困難にする一因をなしている。日本近海におけるアニサキス属については、小山ら⁸⁾の詳細な分類があり、7種類のアニサキス属幼虫類が分類されている。このうち、アニサキス症の原因として明確に報告されているのは、*Anisakis larvae* (type I, type II) と、*Terranova larvae* (type A) である。

Chitwood ら²⁰⁾によって、*Phoconema larvae*による発症が報告されたが、これは、おそらく *Terranova*

larvae (type A) と同一種と考えられている⁴⁾。Deardorff ら²¹⁾は、rat の腸管を用いた実験で、*Terranova larvae* (Hawaii A) という新種の幼虫による発症の可能性を警告したが、Desowitz²²⁾は、種として分類学的に同定するための、幼虫期の形態学的基準の情報が少ない事を懸念している。この様に、アニサキス属線虫類の分類は、幼虫での限られた形態学的基準に拠るため、虫体全体の完全な保存が必要とされる。そのため、鈴木ら⁸⁾は、アニサキス幼虫免疫血清による酵素抗体法にて、組織内の変性した虫体の同定を試みた。その結果、形態的には同定が困難な例でも染色同定が可能であった。しかし、蠕虫間で交差反応性が強く、前処置として、十分な吸収操作が必要であると述べている。

一方、著者らが樹立した7種の MoAb は、An6 が、*Ascaris suum* と弱く交差反応性を示すが、他の6種は、いずれも、*Terranova larvae* (type A)、*Ascaris suum*、*Toxocara cati*、*Dirofilaria immitis*、*Trichinella spiralis*等の近縁線虫類 (nematoda) や、条虫類 (cestoidea) の *Echinococcus* に全く交差反応性を示さず、アニサキス幼虫 (I型) に極めて特異性が高かった。形態学的同定と異なり、虫体全体が完全に保存されていなくとも、これらの MoAb と免疫染色の応用によりアニサキス幼虫の同定が可能である。この様に、アニサキス幼虫に特異的な MoAb は、アニサキス属線虫の分類学的に重要であり、また、形態学的同定とは異なった同定方法として意義があると思われる。Agatsuma⁹⁾は、enzyme electrophoresis を応用し、phosphoglucosmutase の electrophoretic pattern の相違によりアニサキス幼虫 I型と II型の区別が可能であると報告している。今回、アニサキス幼虫 (II型) が入手できなかったため、それとの反応性を見る事は重要であるが、今後の問題として残された。今後、このように MoAb によるアニサキス幼虫間の解析がさらに進めば、アニサキス症を発症しうるものとししないものとの区別も可能になるとおもわれる。

4・2 アニサキス幼虫特異的モノクローナル抗体認識抗原と発症機序に関する検討

アニサキス症の発症機序として、アレルギーの関与、つまり、前感作状態の者に発症するという説が有力であり、臨床的にも²³⁾、実験的にも²⁴⁾、裏付けられている。その前感作状態を把握するため、また、免疫学的診断法のため、特異抗原の検索が進められてきた。鈴木ら¹⁹⁾は、アニサキス幼虫抗原の免疫電気泳動法にて、回虫とは交差性の無い分画を得た。これは、アニサキス幼

虫ヘモグロビンと同定され²⁵⁾、主として擬体腔に局在し²⁶⁾、ES 抗原にも多量に含まれる事が判明した²⁵⁾。また、アニサキス幼虫ヘモグロビンは、Terranova larvae (type A) 以外に交差反応性が無く²⁶⁾、アニサキス症の疫学的研究等に貢献した^{27,28)}。

著者らは、アニサキス幼虫に対する特異的な MoAb の作製という全く異なる方法で、特異抗原の解析を試み、7種類の MoAb を得た。このうち、An6 が *Ascaris suum* と中腸において、弱い交差反応を示すが、Terranova の擬体腔とは反応しない。他の MoAb も Terranova larvae (type A) と全く交差反応を認めず、その虫体内局在も異なっている。従って、これらの MoAb は、アニサキス幼虫ヘモグロビンとは異なる、新たな抗原を認識していると考えられた。また、Sephadex G200 によるゲル濾過の結果から、アニサキス幼虫ヘモグロビンの分子量は、150 kd 以上と推定されるが^{19,26)}、今回得られた MoAb の認識抗原のうち、最大分子量のものは、An4 の 130 kd (Western blotting による) であり、この点でもアニサキス幼虫ヘモグロビンと異なる。著者らは、Sephadex G200 と、SDS-PAGE による抗原解析をアニサキス幼虫抗原に応用したが、会後も特異抗原の同定には、この様な方法で分子量を決めることが必要と思われる。

アニサキス幼虫 ES 抗原は、アニサキス幼虫が人体に侵入する際に、最初に接する抗原として重要である。その詳細は不明な部分が多いが、近年、徐々に明らかになりつつある。従来、ES 抗原はおそらく脱皮に際し放出されるアニサキス幼虫ヘモグロビンが、その主成分と推測されていた¹⁹⁾。最近、Matthew ら²⁹⁾ は、アニサキス幼虫が、消化管より、Trypsin 様 protease を分泌し、虫体の組織侵入に重要な役目を果たしている可能性を報告している。著者らの作製した MoAb の内、An1, An2, An6 は、ES 抗原と明らかな反応性を示した。これらは、何れも、中腸あるいは、Renette cell と反応性を示しており、これらの MoAb と protease 活性との関係が注目された。一方、アニサキス症の発症に、虫体が分泌する好酸球遊走因子が関与するという説があり、Tanaka and Torisu³⁰⁾ によると、これは ES 抗原中に分泌され、ゲル濾過にて 40 kd の易熱性の物質であった。ES 抗原と反応する MoAb に、近似する分子量を認識するものがなく、その物質の虫体内局在も明らかでないため、その異同を論じることはできなかった。

4.3 免疫学的診断の検討

内視鏡や胃透視技術の発達により、胃アニサキス症は、かなり診断されやすくなったが、慢性化して肉芽

腫形成しているような例では、粘膜下腫瘍と鑑別が困難である³¹⁾。また、小腸アニサキス症では、虫体の確認が困難なため、詳細な現病歴に頼らざるを得ない。さらに、肺アニサキス症の報告例もあり³²⁾。これらの症例では、免疫学的診断法が期待される。これまで、皮内反応²⁸⁾、RAST 法^{22,28,32,33)}、赤血球凝集反応^{27,28)} 等の免疫学的診断法が試みられたが、特異性と感度の点で十分な方法は確立されていない。

著者ら³⁴⁾ は、アニサキス幼虫可溶性抗原 (AN 抗原) による ELISA にて、Ig(GAM) と、IgE についてアニサキス症血清抗体の検出を試みたところ、慢性例や臨床経過の長い例では抗体価の上昇を認め、このような症例では補助的診断法として有用であったが、発症直後では必ずしも、いずれの抗体価の上昇も認めなかった。しかし、このような粗抗原を用いた ELISA では、感度は高いが特異性の面で十分ではなく、非特異的の反応を抑えるため、Ig(GAM) では 100 倍に、IgE では 10 倍に希釈した血清にて陽性血清と相対的に比較せざるを得なかった。

アニサキス症の発症機序として、既述の如く再感染説が有力であるが、藤野ら³⁵⁾ は 150 名の急性胃アニサキス症を報告し、これらの多くは初感染であろうと述べている。また、Tanaka and Torisu³⁰⁾ の報告したアニサキス幼虫自体に含まれる好酸球遊走因子が発症に関与するのであれば、初感染での発症も十分考えられる。

これらの説を考察する上でも、発症直後のアニサキス症患者の血清抗体価や、正常人での前感作状態を正確に把握することのできる、特異性の高い免疫学的診断法が望まれる。

今回得られた、アニサキス幼虫特異的 MoAb の内、An2 は ES 抗原と強く反応し、発症に関わる抗原を認識している可能性が示唆されたので、An2 を ELISA に応用し血清抗体価の測定を試みた。その結果、横川吸虫症、広節裂頭条虫症では偽陽性が認められたが、正常人では極めて低値に抑えられ、著者ら³⁴⁾ のアニサキス幼虫粗抗原を用いた ELISA に比べ特異性の向上が認められ、アニサキス幼虫特異的 MoAb の免疫学的診断における有用性が期待された。

最近、中田ら³⁶⁾ は、Immuno-blotting 法を用いて急性胃アニサキス症の血清 IgG と IgE によって認識される抗原を分析した。その結果、3 日以内に全例に IgG が出現し、半数に IgE の出現を認め、再感染であることを示唆していると述べている。また、この時 IgG は 200 kd 以上の 2 抗原、122 kd, 91 kd, 78 kd の各抗原を

主として認識しており、これらが Arthus 型アレルギーの対応抗原である可能性を示唆している。3 週間以内に、さらに 200 kd 以上、100 kd、66 kd、58 kd、42 kd の 5 抗原が検出されている。今回得られた MoAb の内、An2 が 40 kd と 42~46 kd、An6 が 68 kd、An4 が 130 kd の各抗原にそれぞれ対応しており、これらは上記の抗原に近似している。特に、An2、An6 は ES 抗原との反応が明らかにされており、発症に関わる抗原を認識していると思われ、免疫学的診断応用の可能性を示している。現在、これらの MoAb を用いた精製抗原による発症実験を計画中である。

5 結 論

アニサキス幼虫 (I 型, L3) に特異的な、7 種のモノクローナル抗体 (An1~An7) を作製した。

- 1) これらの抗体は、*Terranova larvae* (type A), *Ascaris suum*, *Dirofilaria immitis*, *Toxocara cati*, *Trichinella spiralis*, *Echinococcus multilocularis*、及び、ヒト組織と交差反応を示さず、アニサキス幼虫に極めて高い特異性を認めた。(An6 は、*Ascaris suum* の中腸部分と弱い交差反応性を示した。) An1~An7 の虫体内局在を免疫組織学的に明らかにした。
- 2) SDS-PAGE と Western blotting にて、An1 は 32~36 kd、An2 は 40 kd と 42~46 kd、An4 は 130 kd の蛋白抗原を認識し、ゲル濾過にて An2 は 90 kd、An6 は 68 kd の抗原を認識していた。An2 は、disulfide bond を有する heterodimer である可能性が示唆された。
- 3) これらのうち、An1、An2、An6 に反応する抗原は、ES 抗原に含まれることが ELISA 法にて示され、発症に関与する抗原を認識している可能性が示唆された。
- 4) これまで、このようにアニサキス幼虫 (I 型) に特異的な抗体は見出されておらず、アニサキス属線虫類の分類学上意義があり、これらのモノクローナル抗体による抗原解析は、アニサキス症の免疫生物学的研究に重要と思われる。
- 5) An2 を用いて、アニサキス症、広節裂頭条虫症、横川吸虫症、正常人におけるアニサキス抗体を ELISA にて測定したところ、粗抗原を用いた ELISA に比べ特異性の向上を認め、免疫学的診断法における有用性が期待された。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲をいただいた

札幌医科大学外科学第一講座の早坂 滉教授並びに病理学第一講座の菊地浩吉教授に深謝する。また研究に際し、エヒノコックス抗原を供与いただいた北海道立衛生研究所熊谷 満所長、旋毛虫、他の寄生虫を供与いただいた北海道大学獣医学部大林正士教授、札幌医科大学動物実験施設主任技師北村之利氏、石倉医院院長石倉肇博士、農業畜産試験場の皆様には謝意を表する。本論文の要旨の一部は第 54 回日本寄生虫学会、及び第 15 回日本免疫学会で発表した。

文 献

1. Pinkus, G. S. and Coolidge, C.: Intestinal Anisakiasis. First case report from north America. *Am. J. Med.* **59**, 114-120 (1975).
2. Kliks, M. M.: Anisakiasis in the United States: Four new case reports from California. *Am. J. Med. Hyg.* **32**, 526-532 (1983).
3. van Thiel, P. H., Kuipers, F. C. and Raskam, R. H.: A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop. Geogr. Med.* **2**, 97-113 (1960).
4. 鈴木俊夫: アニサキスおよびテラノーバ幼虫. 大鶴正満編集. 臨床寄生虫学 307-315, 南江堂, 東京 (1985).
5. Agastuma, T.: Electrophoretic studies on glucose-phosphate isomerase and phosphoglucomutase in two types of Anisakis larvae. *Int. J. Parasitol.* **12**, 35-39 (1981).
6. 鈴木俊夫, 赤尾信明, 山下隆夫: 非標識抗体法による組織内寄生虫同定の試み. 2. 蠕虫. *寄生虫誌* **30**, 517-526 (1981).
7. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
8. 小山 力, 小林昭夫, 熊田三由, 小宮義孝, 大島智夫, 影井 昇, 石井俊雄, 町田昌昭: 海産魚類およびスルメイカより見出される Anisakidae 幼線虫の形態学および分類学的検討. *寄生虫誌* **18**, 466-487 (1969).
9. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
10. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
11. Beaver, P. C.: Parasitological reviews, Larva migrans. *Exp. Parasitol.* **5**, 587-621 (1956).
12. 吉村堅太郎: 寄生蠕虫はいかにして宿主の免疫応答

- に逆らって生きるか. 日獣会誌 **33**, 517-524 (1980).
13. Maizels, R. M., Phillip, M., and Ogilvie, B. M.: Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.* **61**, 109-136 (1982).
 14. Ortega-Pierres, G., Mackenzie, C. D. and Parkhouse, R. M. E.: Protection against *Trichinella spiralis* induced by a monoclonal antibody that promote skilling of newborn larvae by granulocytes. *Parasitol. Immunol.* **6**, 275-284 (1984).
 15. Myler, A. S. P., Schofield, L. and Kidson, C.: A high molecular weight antigen in *Plasmodium falciparum* recognized by inhibitory monoclonal-antibodies. *Parasitol. Immunol.* **6**, 39-50 (1984).
 16. Ibarra, A. A. L., Howard, J. G. and Snary, D.: Monoclonal antibodies to *Leishmania tropica major*: specificities and antigen location. *Parasitology* **85**, 523-531 (1982).
 17. Gowe, J. S., Barry, J. D., Lupton, E. N. and Cross, G. A. M.: All metacyclic variable antigen types of *Trypanosoma congolense* identified using monoclonal antibodies. *Nature* **306**, 389-391 (1983).
 18. 鈴木 守: マラリア原虫研究におけるモノクローナル抗体の応用と遺伝子工学. 代謝 **21**, 165-171 (1984).
 19. 鈴木俊夫: アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究 1. 電気泳動法による抗原の分析. 寄生虫誌 **17**, 213-220 (1968).
 20. Chitwood, M. B.: *Phocanema*-type larval nematode coughed up by a boy in California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **24**, 710-711 (1975).
 21. Deardorff, T. L., Kliks, M. M. and Desowitz, R. S.: Histopathology induced by larval *Terranova* (type HA) (Nematoda: Anisakidae) in experimentally infected rats. *J. Parasitol.* **69**, 191-195 (1983).
 22. Desowitz, R. S.: Human and experimental anisakiasis in the United States. 北海道医誌 **61**, 358-371 (1986).
 23. 金光敬一郎, 高良政弘, 鳥越義継, 佐藤良也: 沖縄県地方におけるアニサキス症の 1 例. 最新医学 **39**, 138-141 (1984).
 24. 佐藤良也, 山下隆夫, 大鶴正満, 鈴木俊夫, 浅石和昭, 西野千郷: アニサキス症の発症機序の解析 1. 消化管のアナフラキシー反応. 寄生虫誌 **24**, 192-202 (1975).
 25. 鈴木俊夫, 白木 公, 大鶴正満: アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究 2. 抗原の分離, 精製. 寄生虫誌 **18**, 232-240 (1969).
 26. 浅石和昭: アニサキス幼虫体構成成分の分画と組織診断における蛍光抗体法の応用. 札幌医誌 **43**, 104-120 (1974).
 27. 鈴木俊夫, 石田和人, 石郷岡清基, 土井一彦, 大鶴正満, 佐藤良也, 浅石和昭, 西野千郷: アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究 5. 胃アニサキス症についての皮内反応, 間接赤血球凝集反応および生検粘膜の病理組織学的検査. 寄生虫誌 **24**, 184-191 (1975).
 28. 西野千郷: アニサキス症の疫学的研究. 札幌医誌 **46**, 73-88 (1977).
 29. Matthews, E. B.: The source, release and specificity of *Anisakis simplex* larvae. *J. Helminth.* **58**, 175-185 (1984).
 30. Tanaka, J. and Torisu, M.: *Anisakis* and eosinophil. Detection of soluble factor selectively chemotactic for eosinophils in the extract from *Anisakis* larvae. *J. Immunol.* **120**, 745-749 (1978).
 31. 唐沢洋一, 星 和夫, 小山 力: 消化管アニサキス. テラノーズ症について. 日本医事新報 **3079**, 30-34 (1983).
 32. Kobayasi, A., Tsuji, M. and Wilbur, D. L.: Probable pulmonary anisakiasis accompanying pleural effusion. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 310-313 (1985).
 33. 橋 真理, 山本泰朗: 急性胃アニサキス症における血中 IgE 抗体測定 of 診断的意義. 日消誌 **83**, 2132-3138 (1986).
 34. 高橋秀史, 佐藤昇志, 佐藤 卓, 高見 剛, 石倉肇, 向谷充宏, 八木橋厚仁, 四十九院正道, 早坂滉, 菊地浩吉: ELISA 法によるアニサキス症血清抗体の測定. 医学のあゆみ **136**, 691-692 (1986).
 35. 藤野隆博, 大岩俊夫, 石井洋一: 福岡県下における急性胃アニサキス症 150 例の臨床, 疫学ならびに摘出虫体の形態. 寄生虫誌 **33**, 73-92 (1984).
 36. 中田博文, 橋 真理, 坂本芳也, 森田雅範, 岡崎和一, 山本泰朗, 山本泰猛, 伊藤憲一: Immunoblotting 法による血中 IgG および IgE 型アニサキス抗体の対応抗原の検索. 日消誌 **83**, 2456 (1986).
- 別刷請求先:
 (〒060) 札幌市中央区南 1 条西 17 丁目
 札幌医科大学病理学第 1 講座 高橋秀史