

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

鈴木俊夫 白木公大 鶴正満

新潟大学医学部医動物学教室

(1969年4月2日 受領)

はじめに

ときに、著者らはアニサキス幼虫より抽出した水溶性蛋白質を電気泳動法を用いて分析し、それによつて分離された分画の抗原性について調べたところ、アニサキス幼虫にかなり特有と思われる抗原性成分があることが分り、これに対して N_6 分画(澱粉ゲル電気泳動で原点より数えて6番目の分画)と仮称した(鈴木, 1968)。

本報では、この成分を分離、精製し、その性状ならびに虫体内の分布状況などについて追求してみたので、その成績について述べる。

実験方法

1. 虫体蛋白質の抽出

前報記載の方法に同じで、幼虫の凍結乾燥粉末に0.02 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) を加え、4°C の低温下で48時間攪拌抽出し、25,000rpm, 45分遠心して上清を採取した。

2. 電気泳動法

a) 澱粉ゲル電気泳動法

前報記載の方法に同じく、Smithies の原法を菅野が改良した方法(1967)に従った。

b) ディスク電気泳動法

Ornstein & Davis の泳動条件に従い pH 9.4 用ゲルを用いた。

c) 調製用ディスク電気泳動法

Jovin *et al.* (1964) の考案した装置(ミツミ科学産業製)を用いた。ゲルは Ornstein & Davis の pH 9.4 用ゲルの6%濃度のものを用い、ゲルの高さ 35 mm で、75mA の定電流で泳動した。

3. DEAE-cellulose カラム・クロマトグラフィー

本研究は文部省総合科学研究費の補助により行なわれた。記して謝す。

DEAE-cellulose (Brown 社製) を 1 N NaOH → 1 N HCl → 1 N NaOH → 純水の順に洗滌し、0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) に平衡となるまで洗つて、カラムに詰めて用いた。試料は同緩衝液に1晩透析して平衡とし、NaCl の continuous gradient および stepwise で溶出した。

4. Sephadex G-200 を用いたゲル濾過

Sephadex G-200 を純水で2昼夜にわたり膨潤させたあと、0.05M Tris-HCl (pH 7.6) + 0.05M NaCl に飽和し、同緩衝液に1晩透析した試料を流した。

5. ヘモグロビンの精製

Smith & Morrison(1963), Wittenberg *et al.* (1965) の記載した方法に従つて精製した。すなわち、アニサキス幼虫を磨砕し、20,000 rpm, 30分遠心して体液を分離した。これを1晩純水に透析して生じた沈澱を遠心除去したあと、70%飽和硫酸溶液 (pH 7.0) に1晩透析し、生じた白色の沈澱を除去した。上清を更に75%飽和硫酸に1晩透析するとピンクに着色した沈澱を生ずるので遠心して上清を捨て、沈澱に少量の水を加えて溶解し、純水に透析して完全に脱塩したあと Sephadex G-200 および DEAE-cellulose カラムにかけて不純物を取り除いた。酸化ヘモグロビン、還元ヘモグロビン、ビリジンヘモクロームの作製法ならびに吸収帯の測定法については別報に述べる。

6. 螢光抗体染色法

前記の精製抗原に Freund's complete adjuvant を加えて免疫したカトの血清を取り、硫酸塩析法ならびに DEAE-cellulose カラム・クロマトグラフィーによつて抗体を精製し、これに FITC を標識したのを用いた。

実験成績

1. DEAE-cellulose カラム・クロマトグラフィーによる抗原の分離

アニサキス幼虫より抽出した粗抗原を DEAE-cellu-

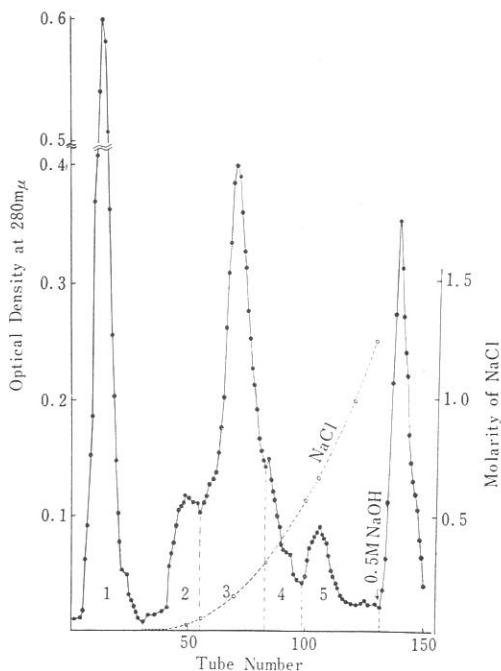


Fig. 1 Effluent diagram of DEAE-cellulose column chromatography (with gradient elution).

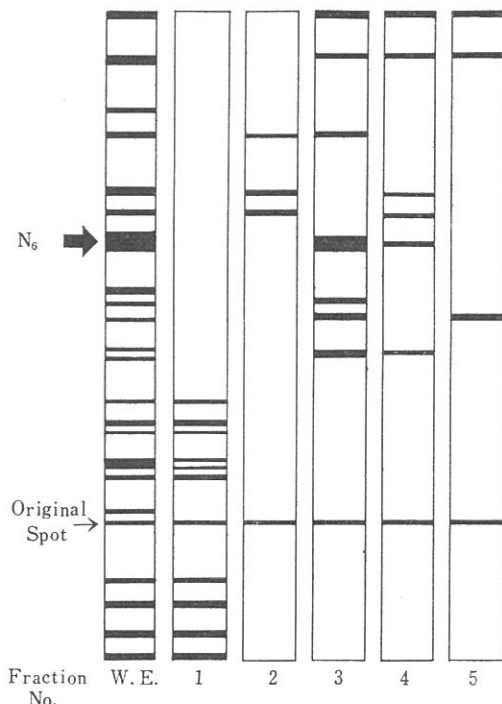


Fig. 2 Comparative starch-gel electrophoretic patterns of whole extract and isolated fractions.

W. E.: whole extract

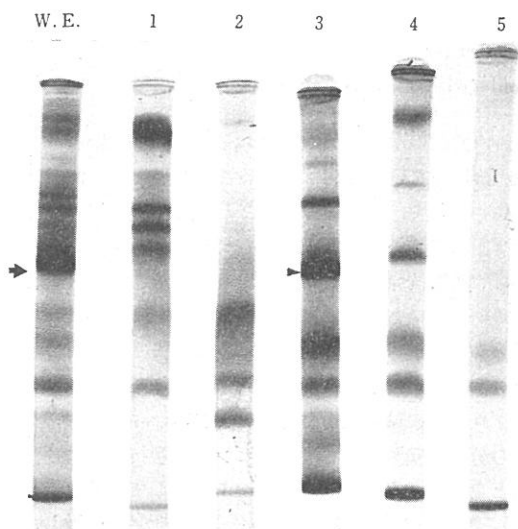


Fig. 3 Comparative disc electrophoresis of whole extract and isolated 5 fractions.
W. E.: whole extract

lose カラムにかけて NaCl の continuous gradient で溶出したのが Fig. 1 である。5つの分画に分けて澱粉ゲ

ルおよびディスク電気泳動でみたのが Fig. 2 ならびに Fig. 3 である。N₆ 成分は第3および第4分画に見られる。ディスクでは矢印で示した部位がそれに相当する。溶出パターンからも明らかなように NaCl の濃度が 0.1 M のあたりから出てくるのが見られる。そのことは stepwise に溶出した際のパターン (Fig. 4) とその電気泳動所見 (Fig. 5) から明らかである。実際に大量の試料から目的の成分を分離するために試料および DEAE-cellulose は 0.01M 燐酸緩衝液に 0.05M NaCl を加えたものに平衡として、同緩衝液で吸着されずに溶出する成分を充分流し出したあと、NaCl の濃度を 0.1M にした緩衝液を流して溶出する分画を集めた。しかし、この分画は電気泳動パターンからも明らかなようになお多くの minor component を含むのでこれを除くため以下の操作を行なった。

2. Sephadex G-200 によるゲル濾過

DEAE-cellulose によつて分離した前記の分画を Sephadex G-200 を用いてゲル濾過を行なった際の溶出パターンを Fig. 6 に示した。第1の山および第2の山以

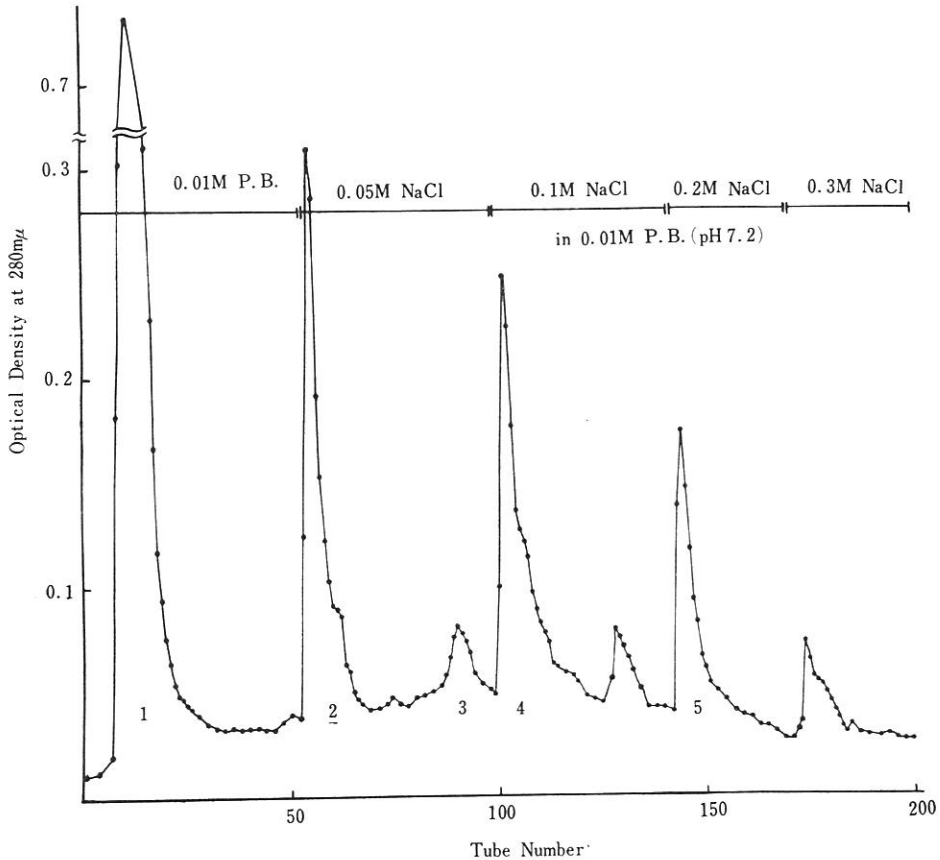


Fig. 4 Column chromatographic profil (with stepwise elution).

下をそれぞれ集めてディスク電気泳動によつて調べたのが Fig. 7 で、分子量の大きな蛋白質は acrylamide ゲルの分子篩効果のために泳動速度が遅く、分子内に入ることのできた小さな蛋白質は速く泳動されることが分つた。目的の成分 (No. 6 分画) は遅く泳動される成分、すなわち Sephadex G-200 で早く溶出されてくる成分であることが分つた。

3. 調製用ディスク電気泳動法による精製

DEAE-cellulose および Sephadex G-200 で分離した分画を調製用ディスク電気泳動を用いて精製した。Fig. 8 は DEAE-cellulose によつて分離した分画について行なつたパターンをあげた。斜線に示した部分を集めてディスク電気泳動を行なつたのが Fig. 9 で、目的の成分は Fig. 8 における 5 ないし 6 の形成する山であることが分る。使用ゲル濃度についての検討も行なつたが、7.5%ゲルを用いると溶出がきわめて遅く、4%ゲルでは溶出時がパターンが乱れるためいずれも適当でなく、5~

6%の濃度のゲルを用いた際に最も良い結果が得られた。溶出パターンで注目されることは、第1の山が異常に高いことで、こが山のほとんどが acrylamide ゲルより溶出してくる紫外線吸収物質であることが分つた。

4. 精製抗原の性状

濃縮した精製抗原は褐色の色調を呈する有色素蛋白質であることから、アニサキス幼虫のヘモグロビンではないかと考えた。そこで、ブタ回虫について報告されたヘモグロビンの精製法を参考としてアニサキス幼虫の体液から分離、精製したヘモグロビンと精製抗原および飼養液とをディスク電気泳動によつて比較してみると (Fig. 10)、精製抗原とヘモグロビンとは明らかに一致し、さらに飼養液 (いわゆる ES 抗原) の主な成分はヘモグロビンと同一の蛋白質であることが判明した。なお、比較のためブタ回虫の体腔液より分離したヘモグロビンを同時に泳動したがアニサキス幼虫ヘモグロビンとの類似性は見られなかつた。

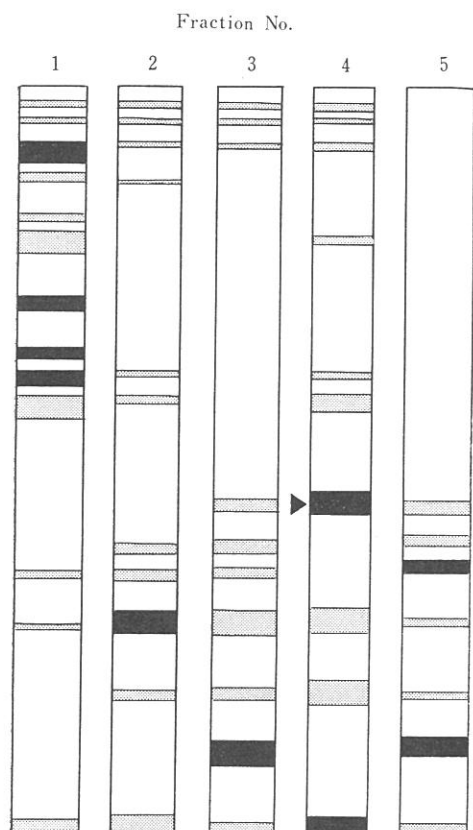


Fig. 5 Diagrammatic illustrations of fractions (with stepwise elution).

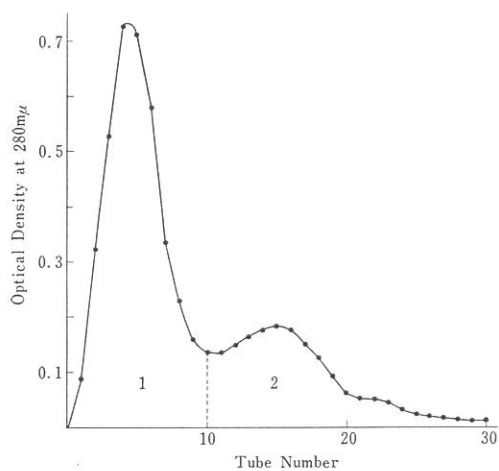


Fig. 6 Gel-filtration of Sephadex G-200 of fractions separated by DEAE-cellulose.

5. 精製抗原の虫体内分布

新鮮虫体の凍結切片に、精製抗原で免疫して得たカト

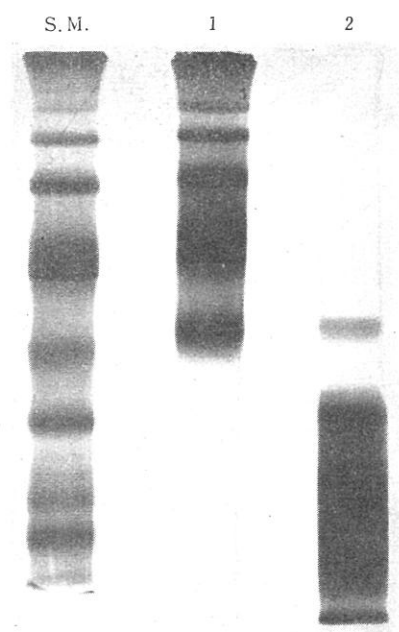


Fig. 7 Comparison of disc electrophoretic pattern between 2 fractions separated by gel-filtration on Sephadex G-200. S. M. : starting material.

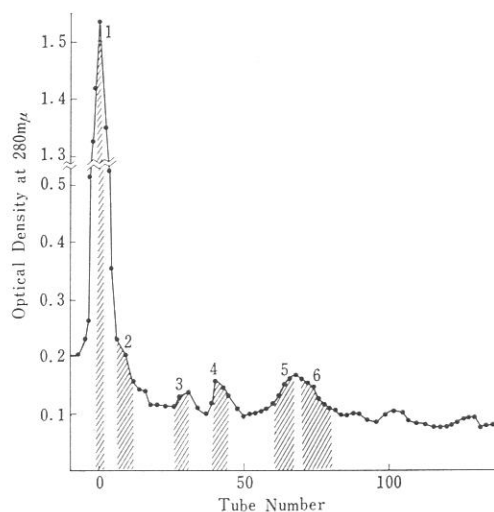


Fig. 8 Preparative disc electrophoretic patterns of fractions separated by DEAE-cellulose.

の抗体に FITC を標識したものを作用させ 蛍光顕微鏡で撮影したのが Fig. 11 である。体腔に強く、角皮下ならびに筋細胞、消化管細胞にも蛍光が見られるが、角皮には全く蛍光を発しないことが分った。

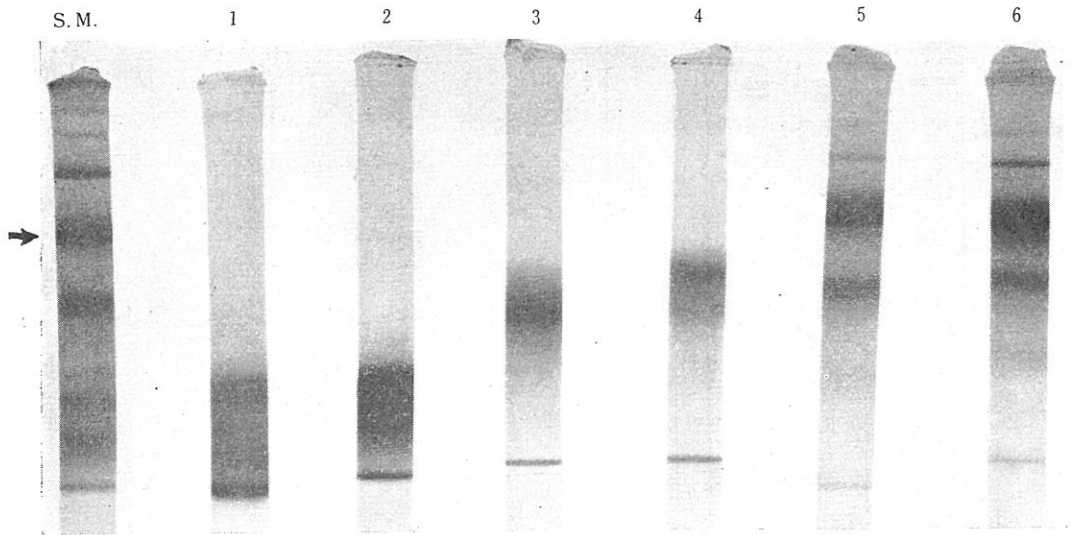


Fig. 9 Analytical disc electrophoretic patterns of fractions prepared by preparative disc electrophoresis.

S. M. : starting material

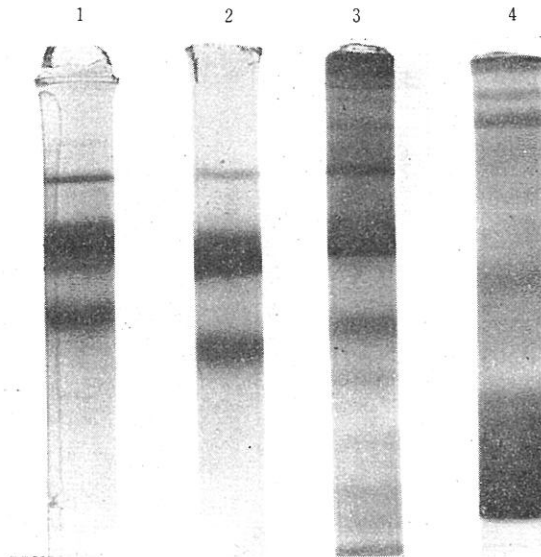


Fig. 10 Comparative disc electrophoretic patterns of purified antigen (1), hemoglobin (2) and ES antigen (3).

4 : Hemoglobin of *Ascaris* perientric fluid

考 按

前報では、澱粉ゲル電気泳動によつて分離した N_6 成分は粗抗原によつて免疫したカト血清と寒天二重拡散法を用いて調べてみると、1本の強い沈降線と数本の弱い沈降線を形成することからかなり minor component が

混つていると考えられると述べた。

本報は主として目的の成分を単離する方法について検討したものである。

はじめ、澱粉ゲルによつて泳動を繰返し精製する方法でかなり純化した成分を得ることができた。しかし、この操作は煩雑であるうえ、収量も少なく、さらにゲルよ

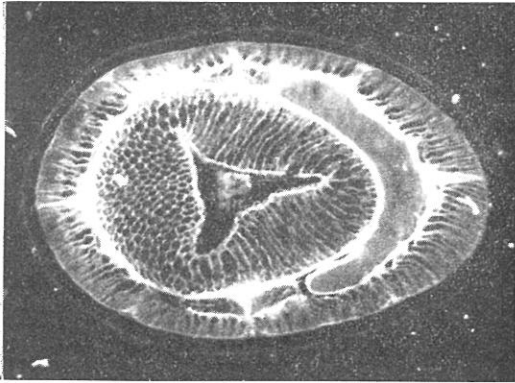


Fig. 11 Fluorescent antibody staining of transverse section of *Anisakis* larva. (antibody obtained from rabbit immunized by purified *Anisakis* antigen)

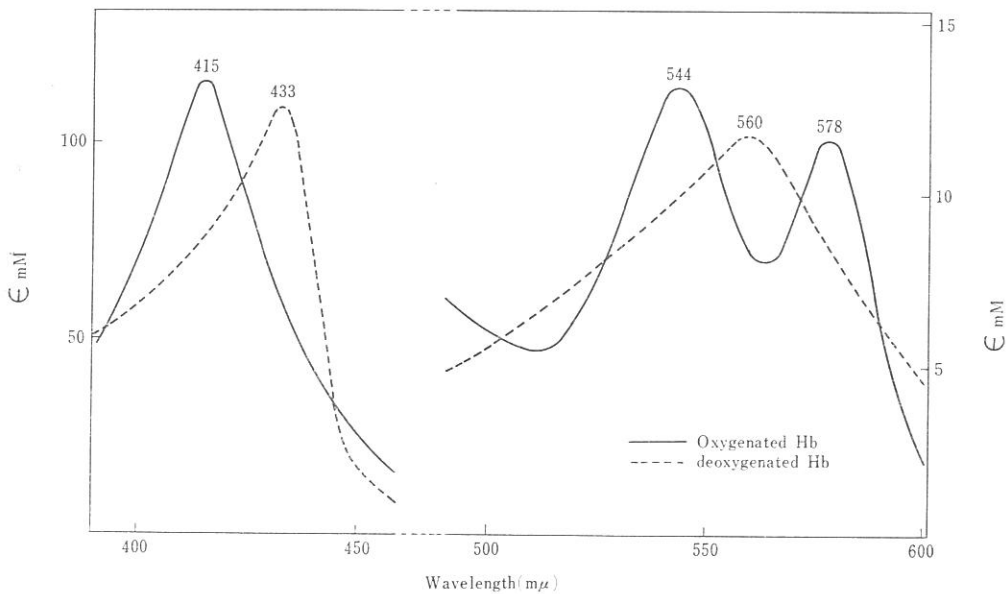


Fig. 12 Absorption spectra of *Anisakis* body fluid hemoglobin in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0).

り抽出した溶液中に澱粉の微細粒子が混り取り除くのが困難であるため適当な方法ではないことが分った。

Kent (1960) がブタ回虫からの抽出蛋白質を Sephadex および DEAE-cellulose を用いて分析した成績について報告してから、種々の寄生虫抗原の分離、精製の研究にとり入れられている。しかし、これらの担体を用いた分離法は蛋白質分子が大きさや形とか荷電状態の差異などの共通した属性によっていくつかの群に分けられるものであり、寄生虫体の抽出物のようなきわめて複雑な

蛋白質よりなるものでは一つの分画として分離されたものの中にもなお多くの成分が含まれており、このような方法のみで単離するのはむずかしい。

蛋白質が調製用電気泳動によって分離されるのもそのもつ荷電状態の差によるものであるが、用いる支持体によっては分離能がきわめてすぐれているものもある。支持体としては従来寒天ゲルまたは生澱粉などがしばしば用いられているが、今回著者らは acrylamide を用いる Jovin *et al.* 考案の調製用ディスク電気泳動装置を用いた。泳動条件については Lewis *et al.* (1968) が同様の装置を用いて行なつた脳下垂体ホルモンの精製に関する実験成績を参考として検討し、6%, 35mm, 75mA で泳動した場合が最も良い分離能を示した。溶出パターンを見ると第1の山がのせた蛋白質の量にかかわらず異常に

高い。Jovin *et al.* はヘモグロビンの分離に際して同様の山が見られたことから、これはヘモグロビンが崩壊産物の形成する山であると説明しているが、著者らはゲルのみで通電してもこの山が見られるところから acrylamide ゲルそのものより溶出してくる不明の吸収物質であると考えた。この吸収物質を試料をのせる前に溶出除去しておく前処置についても検討しているがまだ成功していない。

精製した成分がアニサキス幼虫のヘモグロビンである

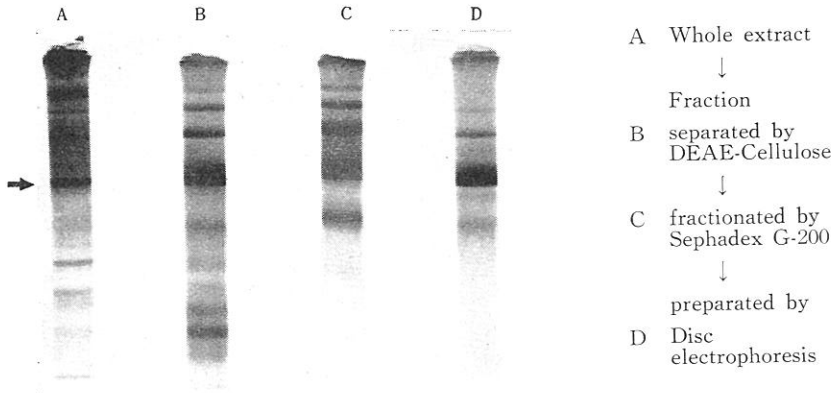


Fig. 13

とした根拠について述べたい。精製して濃縮した成分は褐色の色調を帯びた蛋白質であり、しかも新鮮な体液より分離されたヘモグロビンと電気泳動上全く同一のものであるところから、精製した蛋白質はアニサキス幼虫のヘモグロビンであり、処理中にメト化したものであると思われた。幼線虫にヘモグロビンを証明した報告は少なく von Brand (1937) が *Eustrongyloides ignotus* に、Goldberg (1957) が *Trichinella spiralis* に、Fernando (1968) が *Obeliscoides cuculi* にそれぞれ固有のヘモグロビンを検出している。

著者らがアニサキス幼虫の体液より精製したヘモグロビンについて測定した吸光曲線を Fig. 12 に示した。最大の吸収を示したのは、酸素ヘモグロビンでは 415, 455, 578m μ 、還元ヘモグロビンでは 433, 560m μ 、ビリジンヘモクロームでは 420, 530, 560m μ であり、しかも β が α 帯より大きいという脊椎動物とは性質を異にするヘモグロビンであつた。さらに、このヘモグロビンと酸素との親和性がきわめて強いということも分つた。詳細な分析結果は別報に述べたい。

精製抗原がアニサキス幼虫のヘモグロビンであるから、この抗原で免疫したカトはヘモグロビンに対する抗体を作つたことになり、この抗体に蛍光色素を標識したもので染色される部位は虫体内のヘモグロビンが局在を示してくるわけである。Smith & Lee (1962) はブタ回虫の輪切り切片に種々のヘモグロビン染色をほどこし調べた成績を報告しているが、これでは体腔と角皮下層に大量に認められたとしている。

著者らの蛍光抗体法による観察でもやはり体腔、角皮下層、筋組織ならびに消化管細胞に著明で、角皮は全く蛍光を発しないという結果を得た。なお、アニサキス幼

虫をカトに経口投与して穿入した虫体を中心に胃組織が凍結切片に蛍光抗体を作用させると、虫体は勿論であるが、穿入虫体の周辺組織に星雲状の浸潤が認められた。これは虫体壁ならびに口腔、排泄孔よりヘモグロビンに近いような抗原性物質を排泄または分泌していると思われる興味ある所見であつた。

総 括

著者らは、前報においてアニサキス幼虫にかなり特有と思われる蛋白質成分を認めたと報告したが、本報ではこの成分の分離、精製法について述べ、この蛋白質の性状ならびに虫体内分布状況などについても言及した。Fig. 13 はこの成分の分離、精製過程を示したものである。粗抗原 (A) を DEAE-cellulose を用いて 0.01 M 燐酸緩衝液+0.1M NaCl (pH 7.4) で溶出した分画 (B) を集め、これを Sephadex G-200 にかけて早く溶出した分画 (C) を取つた。これをさらに、調製用ディスク電気泳動によつて分離した成分 (D) はかなり精製されたものであつた。

次に、精製抗原は有色素蛋白質であることから、別の方法で精製したアニサキス幼虫体液中のヘモグロビンと電気泳動によつて比較したところ、両者は同一の蛋白質であることが分つた。したがつて精製抗原と免疫したカトの抗体に蛍光色素を標識したもので染色される部位は幼虫内のヘモグロビンの所在を示していると思われた。

稿を終えるにあたり、ご助言をいただいた生化学教室緒方規矩雄教授、理学部菅野浩教授に感謝いたします。また、アニサキス幼虫の提供をうけた石倉肇博士に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第38回日本寄生虫学会大会にて

発表した.

文 献

- 1) Fernando, M. A. (1968) : Hemoglobins of parasitic nematodes. I. Spectra of the perientric fluid hemoglobins of *Obeliscoides cuniculi* and the distribution of hematin compounds within its tissues. J. Parasit., 53, 863-868.
- 2) Goldberg, E. (1957) : Studies on the intermediary metabolism of *Trichinella spiralis*. Exp. Parasit., 6, 367-382.
- 3) Jovin, T., Chrambach, A. & Naughton, M. A. (1964) : An apparatus of preparative temperature-regulated polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., 9, 351-369.
- 4) Kent, N. H. (1960) : Isolation of specific antigens from *Ascaris lumbricoides* (var. suum). Exp. Parasit., 10, 313-323.
- 5) Kent, N. H. (1963) : Fractionation, isolation and definition of antigens from parasitic helminths. Am. J. Hyg. Monographic Series, 22, 30-45.
- 6) Lewis, U. J., Cheever, E. V. & Seavey, B. K. (1968) : Purification of bovine growth hormone and prolactin by preparative electrophoresis. Anal. Biochem., 24, 162-175.
- 7) 気井裕 (1966) : ディスク電気泳動法. 蛋白質核酸酵素, 11, 744-749.
- 8) Smith, M. H. & Lee, D. L. (1962) : Metabolism of hemoglobin and hematin compounds. Proc. Roy. Soc. (London) B 157, 234-257.
- 9) Smith, M. H. & Morrison, M. (1963) : Isolation of *Ascaris* hemoglobins. Biochim. Biophys. Acta, 71, 364-370.
- 10) 菅野浩 (1967) : 澱粉ゲル電気泳動法. 代謝, 2, 604-611.
- 11) 鈴木俊夫 (1968) : アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究. 1. 電気泳動による抗原の分析. 寄生虫誌, 17, 213-220.
- 12) 鈴木俊夫 (1969) : アニサキス症の免疫学的診断. 最新医学, 24, 375-377.
- 13) Wittenberg, B. A., Okazaki, T. & Wittenberg, J. B. (1965) : The hemoglobin of *Ascaris* perientric fluid. I. Purification and spectra. Biochim. Biophys. Acta, 111, 485-495.
- 14) von Brand, T. (1937) : Hemoglobin in a larval nematode. J. Parasit. 23, 225.
- 15) 山本隆一 (1967) : 寒天ゲルを用いた蛔虫の抗原性の研究. 2. 硫酸塩析及びカラムクロマトグラフィーによる虫体抽出液の画分. 長大風土病紀要, 8, 203-209.

AbstractSTUDIES ON THE IMMUNOLOGICAL DIAGNOSIS OF ANISAKIASIS
II. ISOLATION AND PURIFICATION OF *ANISAKIS* ANTIGEN

TOSHIO SUZUKI, TAKASHI SHIRAKI AND MASAMITSU OTSURU

(Department of Medical Zoology, School of Medicine, Niigata University, Niigata, Japan)

In the preceding paper, the authors reported the result of electrophoretic analysis of the extract from *Anisakis* larvae. In the present study, it was attempted to isolate and purify a specific antigen which was found in the extract of *Anisakis* larvae with the previous examination.

From lyophilized powder of *Anisakis* larvae, the purified antigen was isolated by the following procedures as shown in Fig. 11. The crude antigen (A) was obtained by extraction with phosphate buffer, fraction (B) was fractionated by column chromatography on DEAE-cellulose—a stepwise technique with NaCl concentration gradient—, and fraction (C) was separated by gel-filtration on Sephadex G-200. Finally, purified antigen (D) was isolated by preparative disc electrophoresis.

The authors suggested that the purified antigen—brownish coloured protein— might be identical with *Anisakis* hemoglobin which was isolated from the body fluid of *Anisakis* larvae by other method.