

アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究

6. Radioimmunoassay による皮内反応ならびに 間接赤血球凝集反応の再検討

鈴木俊夫 石田和人

秋田大学医学部寄生虫学教室

浅石和昭 西野千郷

札幌医科大学第1外科学教室

(昭和50年11月27日 受領)

アニサキス症急性期の症状発現には、*Anisakis* 幼虫の侵襲を受けた消化管局所でのアレルギー反応が主要な役割をはたしていると考えられるから、症状を示してきた例では発症の直接の起因となつた幼虫の侵襲に先行して、既往にも同様の侵襲を受けていて幼虫に対するある種の過敏状態が作られていたと考えられる。

著者(鈴木ら, 1970, 1975)らは、そうした過敏状態を現在各種の感染症の診断に利用されているような免疫反応によつて検出されるか否かを知る目的で検討を続けており、本研究の第3報ならびに第5報では、*Anisakis* 幼虫より分離、精製したヘモグロビンを抗原として用いた皮内反応ならびに間接赤血球凝集反応をそうした目的に利用することができるということを明らかにし、反応の実施条件ならびに判定基準などについて報告した。

つづいて著者らは、これらの反応を用いたアニサキス症の疫学調査を計画し、1974年1月より10月までの間に本症の多発地帯である北海道の各地において、主として一般住民を対象に抗体保有率の調査を行つた。その成績の詳細については別報(浅石ら, 1974; 西野ら, 1974, 1975)にゆずるが、その中で皮内反応が陰性であるのに間接赤血球凝集反応が陽性という例が10.3%にも認められたということから、その解釈をめぐつての検討が必要であると思われたのである。

そこで今回は、 ^{125}I を用いた radioimmunoassay によつて検討してみたところ、免疫反応自体の持つある程度の非特異性にもよるが、反応の判定基準との関連がより強いと思われる結果が得られた。

検査対象ならびに方法

I. 検査対象

北海道の9地区18市町、すなわち利礼地区(利尻島、礼文島)、東天北地区(浜頓別町、枝幸町)、西天北地区(豊富町、幌延町、天塩町)、網走地区(常呂町、美幌町、津別町、清里町、小清水町)、別海地区(別海町)、道央地区(上富良野町)、日高地区(門別町)、道南地区(松前町、木古内町)、札幌市在住の一般住民2,347名を対象として *Anisakis* 幼虫ヘモグロビンを用いた皮内反応を行ない陽性率を調べると共に、その中の1,471名を無作為に選んで採血し、上記抗原を用いての間接赤血球凝集反応によつて抗体保有率を調べた。更に、それらの血清中より136例を選んで radioimmunosorbent test (RIST) によつて血清中の IgE 量を測定すると共に、radioallergosorbent (RAST) によつて *Anisakis* 幼虫ヘモグロビンに反応する specific IgE および IgG 抗体をも測定した。

II. 検査方法

1. 皮内反応: 既報(鈴木ら, 1969)のごとく *Anisakis* 幼虫 I 型 (Berland, 1961) より抽出精製したヘモグロビン溶液(蛋白窒素量 $20\mu\text{g/ml}$) の 0.02ml を前腕屈側の皮内に注射し、15分後の膨疹ならびに発赤の最大、最小径を測定して、先の判定規準(鈴木, 1970)に従い膨疹径の平均値が 9mm 以上のものを陽性とした。更にまた、石崎(1963)の判定規準を参考として膨疹径の平均値が 9mm 以下の群を発赤径の平均値 20mm 以上と以下とに分けて検討した。

2. 間接赤血球凝集反応: 既報(佐藤ら, 1974)の如く、上述の幼虫ヘモグロビンで感作した3%ヒツジ赤血球浮遊液 $50\mu\text{l}$ を16倍より256倍まで希釈した血清 0.5ml に加えて反応を調べた。

3. 血清 Total IgE の測定: Wide and Porath (1966) によつて開発された radioimmunosorbent test (RIST) をキットとした Phadebas IgE Test Kit (Pharmacia) を用いて測定した。これは一定量の Sephadex に結合した anti-IgE 抗体に対して検体中の IgE と同時に加えた一定量の ^{125}I 標識 IgE とを競合させ、Sephadex-anti-IgE 抗体に結合した標識 IgE の放射活性を測定して検体中に含まれる IgE 量を算出するものである。なお、測定は同キットに添付されている説明書に従つて行なつた。

4. Specific IgE および IgG の測定: Wide *et al.* (1967) によつて開発された radioallergosorbent (RAST) によつて測定した。Anisakis 幼虫ヘモグロビンを化学的に結合させた固形相に被検血清を加えると血清中の特異的な抗体のみがヘモグロビンと反応する。非特異的な抗体を含む反応にあづからぬ血清蛋白を充分洗浄除去したのち、 ^{125}I で標識した anti-IgE または anti-IgG 抗体を加えると、抗原-抗体-抗体に対する抗体 (標識) という複合物を生成するので、この放射活性を測定して IgE ないしは IgG 量を算定するものである。

IgE 測定には固形相として、宮本ら (1973) に従つて CNBr で活性化した直径 4 mm の東洋濾紙 No. 6 に抗原を結合した disc を用い、標識 anti-IgE 抗体としては第 1 ラジオアイソトープ研究所より供与を受けた Phadebas RAST Kit (Pharmacia) を使用した。測定は同キットに添付されている説明書に従つて行なつた。

IgG 測定の固形相としては尾上 (1975) に従つて CNBr で活性化した Chromagel A-2 に抗原を結合したものをを用いた。標識 anti-IgG 抗体としてはヒト IgG をウサギに免疫して作製した抗血清の IgG を精製して、Wide *et al.* (1967) に従つて ^{125}I を標識したものをを用いた。それ故、この標識抗体中にはヒト IgG とは反応しない不活性抗体も含まれている。

測定は次の順序で行なつた。すなわち、

1) Assay 用プラスチック試験管に反応用緩衝液 (0.15M NaCl, 0.005M 磷酸緩衝液 pH 7.4, 0.2% ウシ血清アルブミン, 0.05% NaN₃, 0.1% Tween 20) で 100 倍に希釈した被検血清 0.1ml を入れる。

2) 抗原を結合した Chromagel を上記緩衝液で 5% に懸濁して 0.1ml 加え、軽く振盪して混和した後、室温で 2 時間反応させた。なお被検血清を入れていない 5 本の試験管に同量の懸濁液を入れ、ゼロサンプルの対照とした。

3) 反応後、洗浄用緩衝液 (0.15M NaCl, 0.005M 磷酸緩衝液 pH 7.4, 0.1% Tween 20) を 3ml 加えて 2,000rpm 3 分間遠心して、沈澱物が浮き上がらないように管底から 5mm の高さに液を残して上清を吸除除去した。

4) 上記の洗浄を更に 3 回繰り返した。

5) 標識 anti-IgG 抗体は上記反応用緩衝液で 6×10^5 cpm/0.1ml になるように調整し、0.1ml を加えて室温で 6 時間反応させた。なお、その際 5 本の空の試験管にも同量取り全カウント測定用とした。

6) 反応終了後、洗浄用緩衝液を用いて上記同様に 4 回洗浄した。

7) ゲルに結合した放射能は Scintillation Gamma Counter (Aloka) を用いて 1 分間測定した。

RAST では結合した抗体、つまり血清中の特異抗体を絶対値で示すことは現在のところ困難であるため、下記の計算によつて求めた値を同様にして求めた対照地区住民の値の平均値と標準偏差の範囲を超えるか否かを比較することで相対的に表現した。

被検血清の計測値———(Cs)

対照ゼロサンプルの計測値

—— 5 本の平均値——(Co)

標識抗体 0.1ml の計測値

—— 5 本の平均値——(Ct)

とすると、

$$\frac{Cs - Co}{Ct} \times 100 = (\%)$$

によつて結合した特異抗体の量を示した。

なお、対照としては秋田市内在住の成人 20 名をあてた。

検査成績

I. 皮内反応および間接赤血球凝集反応成績からの分類

両反応の結果の組合せより 4 群に分け、更に皮内反応による膨疹径 9 mm 以下の III, IV 群では発赤径の平均値で 20mm 以上のものを a, それ以下のものを b として細分した (Table 1)。

この成績より明らかなように、北海道に在住する成人の 62.7% 以上が皮内反応または間接赤血球凝集反応の一方ないしは両方が陽性である。また、皮内反応による膨疹径 9 mm 以下の群の中でも発赤径 20mm 以上の例が 700 例中 335 例 (47.9%) にも認められた。

II. Total IgE 値

上記の各群から任意に選んだ血清について RIST に

Table 1 Number of persons in 4 groups classified by the results of intradermal and indirect hemagglutination tests

Group	ID test		IHA test	No. of persons (%)	
	Wheal	Erythema			
I	+*	+**	+	371	(25.2)
II	+	+	-	400	(27.2)
III	a	+	+	83 (5.6)	152 (10.3)
	b	-	+	69 (4.7)	
IV	a	+	-	252 (17.1)	548 (37.3)
	b	-	-	296 (20.1)	

* $\geq 9\text{mm}$
 ** $\geq 20\text{mm}$ (in mean diameters)

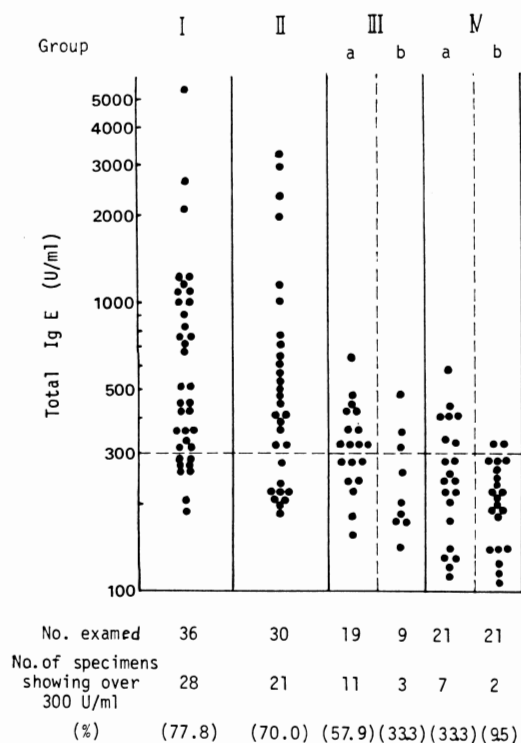
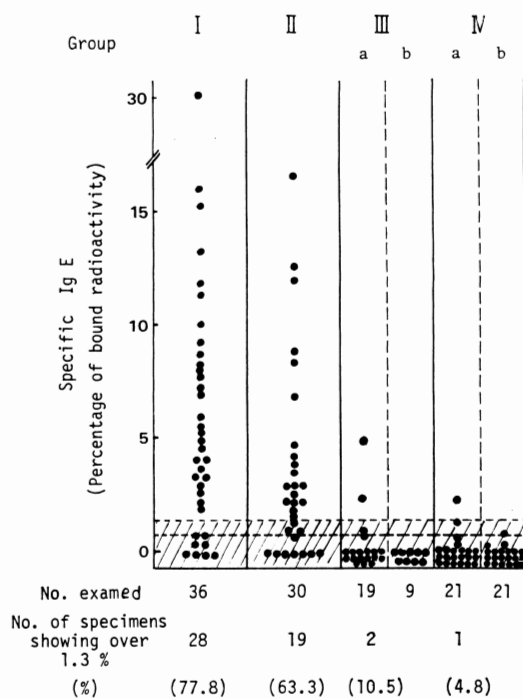


Fig. 1 Distribution of total IgE values in each group

よつて total IgE を測定した成績を Fig. 2 に示した。皮内反応陽性 I, II 群での IgE は陰性の III, IV 群のそれに比べて明らかに高値を示す例が多いことが分る。各群における比較を容易にするため 300 U/ml を仮に正常人における平均値として、それを超える値を示す例の割合をみると I → II → III → IV 群と低下することが知られ

Fig. 2 Distribution of specific IgE values in each group. Shaded area indicates the 68% confidence interval (mean \pm SD) of control group

た。また III, IV 群では a, b について比較してみると a では高値を示すものが b より明らかに多い。

III. Specific IgE 値

幼虫ヘモグロビンと反応する specific IgE 値の分布を群別に示したのが Fig. 3 である。図中斜線で示した部分は秋田市内在住の成人 18 名 (20 名中著しい高値を示

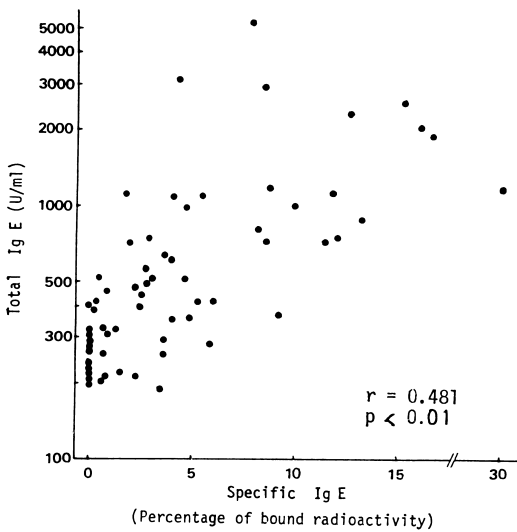


Fig. 3 Correlation between total and specific IgE values in the intradermal test positive groups

した2名は除外した) について測定した specific IgE の平均値と標準偏差 $0.7 \pm 0.6\%$ の範囲を表わしている。そこで1.3%までを正常値の上限とみなして、この範囲を超える値を示す例の割合をみると皮内反応陽性の I, II 群と陰性の III, IV 群との間には歴然たる差がみられたが、III, IV 群では高値を示す例が少なかったこともあり、a と b との間の差を比較することは不可能であった。

IV. Total IgE と Specific IgE との相関

皮内反応陽性の I, II 群66例について total および specific IgE 値をプロットしたのが Fig. 4 であり、1%以下の危険率で両者は有意の相関関係があることが知られた ($t=4.389 > t_{64}(0.01)=2.660$)。

しかしながら、本報にはデータを示していないが、皮内反応の膨疹径ないしは発赤径と total ないしは specific IgE 値との間にはいずれも明らかな相関を認めなかった。

V. Specific IgG 値

今回の実験に使用した標識抗ヒト IgG 抗体中には不活性の IgG も含まれているため、結合した抗体は加えた IgG 量に比べてかなり小さくなっている。

各群における specific IgG の測定値の分布を Fig. 5 に示した。図中斜線で示した部分は対照の秋田市内在住の20名の成人について測定した値の平均値と標準偏差 $10.4 \pm 3.8\%$ を表わしている。そこで15%を仮に正

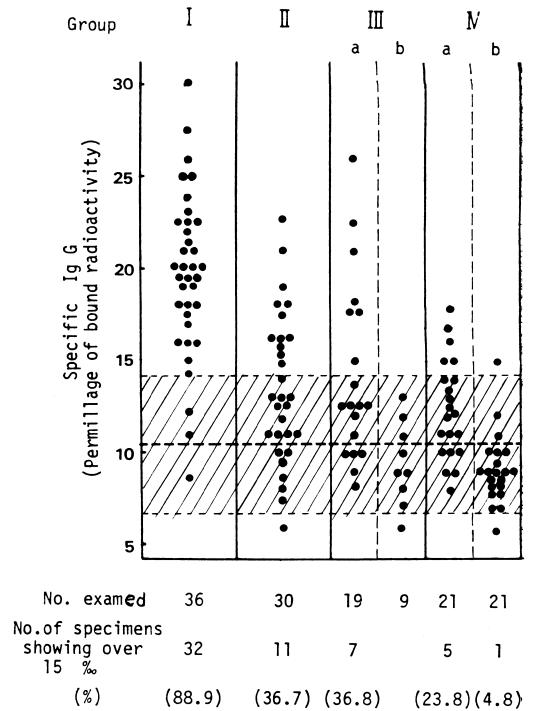


Fig. 4 Distribution of specific IgG values in each group. Shaded area indicates the 68% confidence interval (mean \pm SD) of control group

常値の上限とみなしてこれを超える例の割合をみてみると I \rightarrow II \rightarrow III \rightarrow IV の順序で低下していることが分る。更に興味あることは、皮内反応陰性の III, IV 群の a と b とを比較してみると、b ではほとんどの例が正常範囲にあるのに対して a ではそれを超える例がかなり多くなっていることである。特に間接赤血球凝集反応陽性の III 群ではその差が著しい。

IV. Specific IgG と間接赤血球凝集反応との相関

間接赤血球凝集反応陽性の I および III 群の64例について両測定値の関係をプロットしたのが Fig. 6 である。図中黒丸で示したのが I 群および IIIa 群で、白丸が IIIb 群である。両測定値間の相関についてみると $r=0.243$ で、t 検定では危険率を5%としてもなお有意の相関があるとすることはできない ($t=1.971 < t_{62}(0.05)=2.000$)。ところが、抗体価16倍を示す22例を除いた42例について同様の検定を行なってみると、 $r=0.531$ で1%以下の危険率で有意の相関関係がみとめられた ($t=3.963 > t_{40}(0.01)=2.705$)。

VII. 各群における3種の測定値

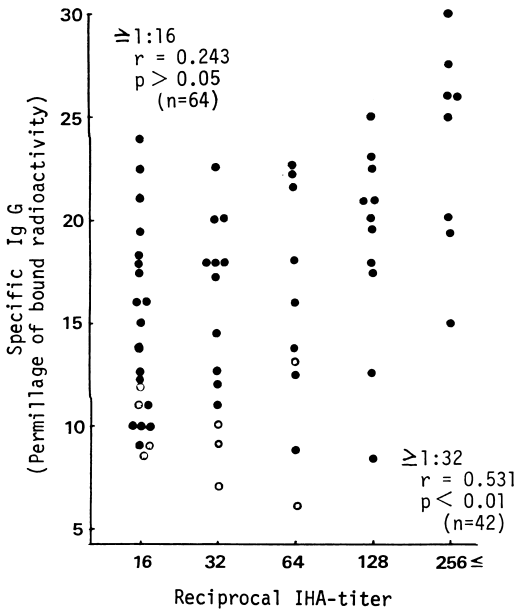


Fig. 5 Correlation between IHA titers and specific IgG values in the IHA positive groups. ●, ≥ 9 mm (wheal) or ≥ 20 mm (erythema); ○, < 9 mm (wheal) and < 20 mm (erythema) in intradermal test

皮内反応の膨疹径平均値 9 mm 以上の I, II 群の計 66 例中すべての測定値が正常範囲を超える値を示したのが 32 例 (48.5%) あり, 特に I 群では 365 例中 27 例 (75.0%) にもみられた。それに対して, 9 mm 以下の III, IV 群の合計 70 例では皆無であつた。他方, すべての測定値が正常範囲を示した例は I, II 群中に 5 例 (7.9%) あり, III, IV 群では 45 例 (64.3%) あつた。特に III, IV 群中発赤径 20 mm 以下であつた 30 例中 25 例 (83.3%) が低値を示していた。

考 察

アニサキス症のための皮内反応ならびに間接赤血球凝集反応の判定基準は, 他の蠕虫感染症に採用されている判定基準を参考として, アニサキス症の確定症例や数地区の住民を対象として行なつた検査成績などの限られた資料を基に決めたものであるから (鈴木, 1970, 浅石, 1974), 当然のことながらあらゆる場合に満足がゆくとは考えられないわけである。しかも, 免疫反応自体にもある程度の特異性が含まれ, また個人による反応性の差など不特定要素が加わるため, どの場合にもあてはま

るような普遍的な判定基準を設けるといふことは不可能と思われる。それ故, その基準に従つて判定した際に実情と合致しない偏りがどの程度にみられるかという点を調べて補正ないしは修正してゆくのがより実際的な解決法であると考えられる。先に行なつた検討では (鈴木ら, 1975), 免疫反応を既往に *Anisakis* 幼虫による感作があつたか否かを知る指標として用いる場合には前述の判定基準によつても充分目的が達せられると述べた。ところが最近実施した北海道での疫学調査成績をこの基準に従つて分類してみたところ, 皮内反応が陰性で間接赤血球凝集反応陽性という例が 10.3% にもみられたことで, 用いた判定基準がはたして適切なものであつたのか否かを再検討してみる必要を感じたのである。すなわち, 他の蠕虫感染症などで従来より知られている皮内反応と, 他の血清反応の抗体検出可能な期間や感度についての関係などからすると, この成績の説明はかなり困難である。それ故, 今回は著者らの判定基準には境界不明瞭なことが多いという理由から取り入れていない発赤径についても, 石崎 (1973) の記載に準じて 20 mm を境界値とし, 膨疹径 9 mm 以下の III, IV 群をそれぞれ a, b に二分して検討してみた。境界値を膨疹径 9 mm とした場合に total IgE ならびに specific IgE 値には明らかな差が認められたが, 9 mm 以上の群の中にも低値を示す例がかなり含まれており, また膨疹径といずれの IgE 値との間にも有意の相関関係は認められなかつた。このことは皮膚固着 IgE は皮膚中の肥満細胞の分布における個人差にも関係するため流血中の IgE とは必ずしも一致するものではないことを示していると理解された。更にまた, 膨疹径 9 mm 以下の群を発赤径 20 mm で分けた際の IgE 値の差は比較的少なく specific IgE 値でも有意差を認めなかつた。

以上の如く膨疹径 9 mm 以下の例についても発赤径と血中 IgE 値とは予想したほどの関連が認められなかつたのに対し, 血中 specific IgG 値とはかなりの相関が成立するような一見矛盾した成績が得られた。その関係は III 群で特に明らかで, 発赤径 20 mm 以上の例 (IIIa) の 36.8% もが IgG 値で正常範囲を超えているのに, 20 mm 以下の例 (IIIb) のすべてが正常範囲内にあるという明瞭な差がみられたことである。このことは IIIa 群を構成するかなりの例で *Anisakis* 幼虫による感作を受けているとみられるが, IIIb 群の大部分の例では感作を受けておらず, この群での間接赤血球凝集反応の抗体価は Fig. 6 の白丸で示したように 16 倍ないしは 32 倍のもの

が多く、これは *Anisakis* 抗原に対する真の反応とはみられず、非特異的反応と理解された。

以上に述べた点を考慮しながら total IgE, specific IgE, specific IgG より皮内反応ならびに間接赤血球凝集反応の判定基準を検討すると、前述の如く、皮内反応で膨疹径平均 9 mm 以上の群ですべての測定値が正常範囲を超える値を示したものが48.5%あつたが、9 mm 以下の群では皆無であつた。他方すべての測定値が正常範囲にあつた例は皮内反応 9 mm 以上の群にも7.9%あり、これは非特異的な皮内反応である可能性が強いと思われた。それに対して 9 mm 以下の群では64.3%もが全測定値で低い値を示し、特にその群の中の発赤径20mm 以下の例の83.3%もが低い値を示していたという結果から判断して、皮内反応では膨疹径の平均値 9 mm を限界値としたことは若干の非特異反応が含まれるものの、充分目的に合致していると評価されると思われる。しかしながら膨疹径 9 mm 以下でも発赤径20mm 以上を陽性とする石崎 (1973) の基準に従うと、非特異反応が著明に増加するため、これを取り入れる意義は少ないと思われた。

間接赤血球凝集反応では抗体価16倍以上を陽性とする、I, III群を合せた64例の中の少なくとも9例 (14.7%) が非特異反応である可能性が濃いと思われた。それ故、抗体価32倍以上とするか、16倍でも皮内反応の膨疹径 9 mm 以上か少なくとも発赤径20mm 以上のものについて陽性と判定すれば、非特異反応の数もかなり少なくなつてくると考えられる。

結 語

Anisakis 幼虫より分離・精製したヘモグロビンを抗原とした皮内反応ならびに間接赤血球凝集反応によつて北海道各地の住民の抗体保有率を調査し、その成績を分析した結果、用いた反応の判定基準を再検討してみる必要があると思われた。そこで今回は、その調査の折採取して保存してあつた血清の中から、任意に抽出した標本について radioimmunoassay によつて total IgE, specific IgE, specific IgG を測定し、秋田市内在住の成人について測定した値を基準値とし、それと比較することで検討を行なつた。

皮内反応による膨疹径の平均値 9 mm を境界値として分けた際、radioimmunoassay による total および specific IgE 抗体測定値にも明瞭な差がみられたから、実用的には充分満足できるもので、発赤径を判定基準に加える意義は少ないと判断された。

間接赤血球凝集反応による抗体価16倍以上を陽性とする、かなりの非特異反応も含まれてくる可能性がある。そのため抗体価を32倍以上とするか、16倍以上とした場合でも皮内反応で膨疹径 9 mm 以上か、または少なくとも発赤径が20mm 以上のものについて陽性と判定すべきであると思われた。

謝 辞

Phadebas RAST-Isotope reagents を提供下さつた第一ラジオアイソトープ研究所に深謝します。

文 献

- 1) 浅石和昭・西野千郷・古家隆司・戸塚守夫・早坂滉・鈴木俊夫・土井一彦(1974)：アニサキス症の疫学。第1報 オホーツク海沿岸とくに網走地方における調査。北海道外科誌, 19, 77-82.
- 2) Berg, T. Bennich, H. and Johansson, S. G. O. (1971)：In vitro diagnosis of atopic allergy. I. A comparison between provocation test and the radioallergosorbent test. Int. Anch. Allergy, 40, 770-778.
- 3) Berland, B. (1961)：Nematodes from some Norwegian marine fishes. Sersia, 21-50.
- 4) 石崎 達(1973)：寄生虫皮内反応の本質とその応用。寄生虫誌, 22, 13-33.
- 5) 宮本昭正・真野健次・伊藤幸治・富谷百合子・堀内淑彦(1973)：Paper disc を用いての Radioallergosorbent test (RAST) に関する研究。アレルギー, 22, 584-593.
- 6) 西野千郷・浅石和昭・戸塚守夫・早坂 滉・鈴木俊夫(1974)：アニサキス症の疫学。第2報 北海道利尻島における調査。日本臨床外科誌, 35, 171-174.
- 7) 西野千郷・浅石和昭・山岡 博・戸塚守夫・早坂滉・佐藤良也・鈴木俊夫(1975)：アニサキス症の疫学。第3報 北海道北部・西天北地区・東天北地区における調査。日本臨床外科誌, 36, 295-299.
- 8) 尾上 薫(1975)：Immunoabsorbent による抗体の精製法。免疫実験操作法 A, 日本免疫学会編, 66-71.
- 9) 佐藤良也・鈴木俊夫・白木 公・山下隆夫・大鶴正満(1974)：アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究, 4. 幼虫ヘモグロビンの抗原特異性ならびに immunoabsorbent を用いた非特異成分の吸収除去について。寄生虫誌, 23, 356-365.
- 10) 鈴木俊夫・白木 公・大鶴正満(1969)：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.
- 11) 鈴木俊夫・白木 公・関野 敏・大鶴正満・石倉肇(1970)：アニサキス症の免疫学的診断法に

- 関する研究, 3. 精製抗原を用いての皮内反応.
寄生虫誌, 19, 1-9.
- 12) 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(1975):
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.
- 13) Wide, L., Bennich, H. and Jonansson, S. G.
O. (1967): Diagnosis of allergy by in vitro
test for allergen antibodies. *Lancet*, ii, 1105-
1107.
- 14) Wide, L. and Porath, J. (1966): Radioim-
munoassay of proteins with the use of Se-
phadex-coupled antibodies. *Biochim. Biophys.*
Acta., 130, 257-260.

Abstract

STUDIES ON THE IMMUNODIAGNOSIS OF ANISAKIASIS.

6. ANALYSIS OF CRITERIA ON INTRADERMAL AND INDIRECT HEMAGGLUTINATION TESTS BY MEANS OF RADIOIMMUNOASSAY

TOSHIO SUZUKI, KAZUTO ISHIDA

(*Department of Parasitology, Akita University*
School of Medicine, Akita, Japan)

KAZUAKI ASAISHI AND CHISATO NISHINO

(*1st Department of Surgery, Sapporo Medical*
College, Sapporo, Japan)

The present study was conducted to analyze the criteria of intradermal and indirect hemagglutination tests with *Anisakis* larval hemoglobin by means of radioimmunoassay.

When a wheal diameter of 9 mm was adopted as a boundary of positive and negative reactions in intradermal test, the significant differences in the total and specific IgE values were observed between the two groups. Therefore, it is thought that a previously determined criterion, by which a wheal diameter of 9 mm or more was determined as the positive reaction can be practically used without any inconvenience.

When a titer of 1:16 or more was determined as the positive reaction in hemagglutination test, it was estimated in connection with specific IgG values that a considerable number of non-specific reactions might be involved in the positives. Therefore, it is thought to be more reliable to adopt a titer of 1:32 as a boundary value of positive reaction.