

## アニサキス抗原による Homocytotropic Antibody

谷 口 正 明

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(1970年3月18日 受領)

オランダの Van Thier *et al.* (1960) によつて海産魚に由来する幼線虫によるヒトの局所性腸炎の報告が行なわれて以来、その主な病原虫であるアニサキスの研究が相次いで発表されるようになった。アニサキス症の診断のための免疫反応の応用についても、いろいろな研究がなされている。森下ら (1965) がアニサキス症患者の皮内反応を行なつたのに続いて、著者 (1966) の報告があり、小林ら (1968) は虫体および ES 抗原によるヒトでの皮内反応を検討している。Ogilvie (1964) が寄生蠕虫感染のネズミについて passive cutaneous anaphylaxis (PCA) の方法を用いて、homologous PCA の概念を導入して以来、Bloch *et al.* (1968) に至つて寄生蠕虫罹患のネズミの homocytotropic antibody はヒトのアトピーをおこさせる  $\gamma$ E グロブリンに analogous な特異な免疫グロブリンであることを証明している。

著者はアニサキス I 型幼虫を感染させたウサギや、幼虫抽出液や *Anisakis* sp. 成虫抗原によつて感作されたウサギに homocytotropic antibody の成立を証明し、それが  $\gamma$ G に由来するとも考えられる heterocytotropic antibody と異なることを知つたのでここに報告する。

### 実験材料および方法

1) 抗原作製の方法 アニサキス幼虫はアジの腹腔から採取した *Anisakis* I 型幼虫で、体長1.5~2.0mm のものを使用した。アニサキス成虫は和歌山県太地でとれたマイルカ *Delphinus delphis* の第3胃からとつた *Anisakis* sp. で生かしたまま温生理的食塩水に入れて岐阜に持ち帰つて処理した。以上の幼虫体も成虫体ともに滅菌生理的食塩水で数回洗つてきれいにした後、出来るだけ無菌的に細切した。磨砕機で細砕してからアセトン処理を数回行ないアセトン乾燥末として保存した。

2) 感染方法 活発に動いている幼虫をウサギに60隻宛経口投与した。この量を1回だけ投与のものと、2

日間隔で3回投与のものについて実験を行なつた。採血後の血清は-20°C のフリーザーの中に保存した。

3) 感作方法 幼虫および成虫体のアセトン乾燥末をそれぞれ30mg 用いて、pH 7.2のリン酸緩衝生理食水 1 ml に溶解し、等量の Freund's complete adjuvant を加えて乳剤とし、その1 ml をウサギの足蹠に1回だけ注入した。採血は注射後5日間隔で6回継続した。また別の群のウサギに1週間の間隔で連続3回感作を行なつた。この際毎回同量の adjuvant を加えた抗原を追加注入した。

4) Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) の方法 ウサギは2.5~3.0kg の健康なものを用い、モルモットは250~300g の健康な白系を用いた。

1%エバンスブルー色素液はエバンスブルー (第一化学) 1g を滅菌生理的食塩水100ml に溶解して用いた。

リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.2) は精製水 1 l 中に  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を1.483g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  を0.433g と NaCl を6.8g 溶解して作つた。

5) PCA 反応の術式 Heterocytotropic antigen の検出にはウサギ→モルモットによつた。モルモットの背部を電気バリカンで皮膚を傷つけないように剃毛し、ウサギ抗血清を皮内に0.1ml ずつ注射した。4~6時間後に1%エバンスブルー液とアニサキス抗原を等量同時にモルモットの下大腿静脈に注入して、30分後の青色斑の測定をした。

Homocytotropic 抗体の検出はウサギ→ウサギによつた。ウサギの背部を剃毛してウサギ抗血清0.1ml を皮内注射し、72時間後に耳静脈から1%エバンスブルー液 1.5ml と同量のアニサキス抗原1%抽出液を注入した。惹起抗原は幼虫および成虫のものを用いた。その濃度はアセトン乾燥末の1%リン酸緩衝生理食塩水抽出液で、このものの蛋白窒素をマイクロエルダール法で測定し幼虫の場合は0.910mg PN/ml で成虫の場合は1.42 mg PN/ml であつた。homocytotropic 抗体の力価の測定は抗血清の倍数稀釈法によつて PCA 反応陽性限界を

求めた。稀釈液はリン酸緩衝生理食塩水 pH 7.2を用いた。結果は静注後30分の青色斑の大きさによつた。20 mm 以上を卍, 15~19mm を卍, 10~14mm を卍, 5~9 mm を+とし, 4 mm 以下を±, 青色斑のないものを-とした。

6) Homocytotropic 抗体の耐熱性およびメルカプトエタノール感受性 試料抗血清0.5ml をセロファンチューブに入れ, 0.1M 2-mercaptoethanol に対し3時間室温で透析し, つぎにこれを0.02M iodacetamide 500 ml 中で24時間室温で透析した。この再処理した血清を更に pH 7.2のリン酸緩衝生理的食塩水を数回とりかえながら4°C 下で, 18~24時間透析した。

耐熱性をしらべるには56°C 下で2時間および6時間処理した。

実験成績

1) Heterocytotropic antibody

ウサギ→モルモットによる heterocytotropic antibody の産生の状態は次のようである。アニサキス幼虫および

Table 1 Showing the appearance of heterocytotropic and precipitating antibodies in the sera of rabbits by sensitization

Rabbit No.	Antigen	Days after sensitization						
		3	6	10	15	20	25	30
1	larvae	卍 32	卍 64	卍 128	卍 256	卍 64	卍 32	卍 32
2	"	-	0	0	0	0	0	0
3	adults	-	0	0	0	0	0	0
4	"	-	0	0	+	卍 16	卍 32	卍 64
5	"	卍 16	卍 64	卍 64	卍 128	卍 256	卍 256	卍 128

\* -~卍 size of blue spot of PCA  
0~256 (number), dilution titer of precipitating antibody.

Table 2 Heterocytotropic and precipitating antibodies by sensitization (3 times at one week interval)

Rabbit No.	Antigen	Weeks after sensitization												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
6	adults	-	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
		16	16	32	64	256	512	256	128	128	64	64	32	
		↑	↑	↑										

\* ↑. injection of adult antigen

Table 3 Heterocytotropic and precipitating antibodies by infection

Rabbit No.	Days after infection						
	3	6	10	15	20	25	30
7	-	-	-	-	-	-	-
	0	0	4	8	4	0	0
8	-	-	-	-	-	-	-
	0	0	0	0	0	0	0
9	-	-	-	-	-	-	-
	0	0	0	0	0	0	0

\* Rabbit No 7, 8, 60 larvae, No 9, 60 larvae+complete adjuvant

\* (-) size of blue spot of PCA ; 0~8(number), dilution titer of precipitating antibody.

成虫抗原の1回だけの感作による場合は第1表に示すようである。ウサギ No. 1 および 2 は幼虫抗原で, No. 3, 4 および 5 は成虫抗原での感作である。No. 1 では3日後に抗体産生がみられこの状態は30日後までつづいてみられた。しかし No. 2 では3~30日の間に一度も抗体を証明出来なかつた。No. 3 も抗体を証明出来なかつたが No. 4 では3~10日までは抗体産生がなく15日後に至つて証明され, 30日後でも証明出来た。No. 5 では No. 1 同様に3~30日に亘つて抗体が証明された。No. 1, 2 と 3, 4 について3日後から30日後に至る間の沈降反応を試みた成績が第1表に同時に示されている。heterologous PCA と沈降抗体の力価とは平行していることがわかり, heterologous PCA 陰性のウサギでは沈降反応陰性である。このことから両者は不可分の関係にあることがわかる。

次に成虫抗原を同量の adjuvant と共に1週間の間隔で3回連続ウサギの足蹠に注射して感作した場合を第2表に示してある。この場合は第2週から陽性となり12週後でも陽性を持続した。沈降体価の方も大体平行して陽性を持続した。

アニサキス幼虫を60匹ずつ3羽のウサギに経口投与して, 同時に Freund's complete adjuvant を足蹠に1 ml 注入したものでは, 3~30日に亘つて heterologous PCA を実施したが, 3羽とも陰性であつた。そして沈降抗体をしらべたが No. 1 のウサギにだけ10~20日に亘つてごく弱い力価で証明された。このことは第3表に示されている。

2) Homocytotropic antibody

ウサギ→ウサギによる homocytotropic antibody の産生状況はつぎのようである。まず1回だけの感作の場合には No. 10~24までの15羽のウサギ中 No. 12, 17お

よび23のウサギだけ homocytotropic antibody の産生をみた。その産生は6日後に陽転したもの2, 10日後に陽転したもの1で, 前者は15日後までと20日後まで持続し, 後者では25日後まで持続した。幼虫経口投与1回だけの No. 25と26のウサギにはこの抗体は証明されなかった。2日間隔で更に2回計3回各60匹ずつ幼虫を投与した No. 27, 28と29では No. 27と29のウサギに10日後に抗体の産生をみ15日までと20日まで抗体が経続して証明された。しかも No. 25, 26と27~29は第一回目投与の際 Freund's complete adjuvant を足跡に1ml 注入しておいたもので, No. 27~29は第2回以後経口投与のときは adjuvant を注入せず, No. 25と26は1度も adjuvant 注射をしていない, adjuvant の注入が homocytotropic antibody の産生に特別に寄与しないよう

Table 4 Showing the appearance of homocytotropic and precipitating antibodies in the sera of rabbits by sensitization

Rabbit No.	Days after sensitization	antigen						
		3	6	10	15	20	25	30
10	adults	—	—	—	—	—	—	—
11	"	—	4	8	16	32	16	8
12	"	—	—	—	—	—	—	—
13	"	0	2	4	2	2	0	0
14	"	—	卍	卍	卍	卍	±	—
15	"	0	4	16	32	64	128	64
16	"	—	—	—	—	—	—	—
17	"	0	8	16	32	8	4	4
18	"	—	—	—	—	—	—	—
19	"	0	0	4	8	16	32	16
20	larvae	—	—	—	—	—	—	—
21	"	0	2	8	16	8	4	4
22	"	—	卍	卍	卍	±	—	—
23	"	0	0	0	0	0	0	0
24	"	0	2	8	16	8	4	4
25	"	—	—	—	—	—	—	—
26	"	0	0	2	8	4	0	0
27	"	—	—	—	—	—	—	—
28	"	0	0	0	0	0	0	0
29	"	—	—	—	—	—	—	—
30	"	0	8	16	32	64	128	32

\* —~卍, size of blue spot of PCA ; 0~128 (number), dilution titer of precipitating antibody.

Table 5 Homocytotropic and precipitating antibodies by infection

Rabbit No.	Days after infection						
	3	6	10	15	20	25	30
25	—	—	—	—	—	—	—
26	0	0	0	0	0	0	0
27	—	—	—	—	—	—	—
28	0	0	0	0	0	0	0
29	—	—	—	—	—	—	—
	0	0	2	8	4	0	0
	—	—	—	—	—	—	—
	0	0	0	0	0	0	0
	—	—	—	—	—	—	—
	0	0	0	0	0	0	0
	—	—	—	—	—	—	—
	0	0	0	0	0	0	0

\* —~卍, size of blue spot of PCA ; 0~4, (number), dilution titer of precipitating antibody.

Rabbit No. 25, 26, 60 larvae

No. 27~29, each 60 larvae

(3 times with 2 days interval)

ある。感作および感染させたウサギでの沈降抗体の産生状況をしらべたのが第4および5表である。No. 12および17のウサギには沈降抗体が証明されず No. 23のウサギの沈降抗体も力価が低い。そのようなウサギに homocytotropic antibody の産生されていることは興味がある。感染させた群でも沈降抗体の証明されないウサギに homocytotropic antibody が見られる。

### 3) Homocytotropic antibody の力価

第1図に示すように感作することによってえられる heterocytotropic antibody の力価と沈降抗体の力価とは平行するし, No. 6のウサギのように1週間の間隔で3回連続感作すると両者の平行の関係は一層はつきりする。これを第2図に示してある。これに反して homocytotropic antibody の力価は沈降抗体の力価と反比例する。PCA に用いる抗血清の稀釈度による陽性反応の

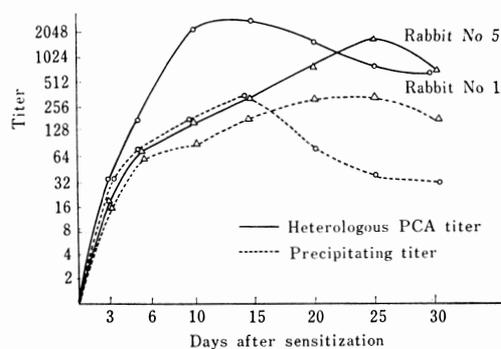


Fig 1 Titer of induced heterocytotropic antibody.

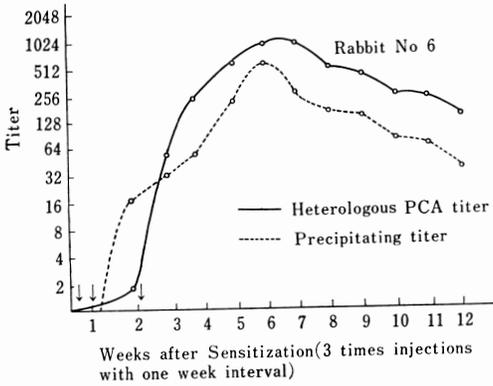


Fig. 2 Titer of induced heterocytotropic antibody.

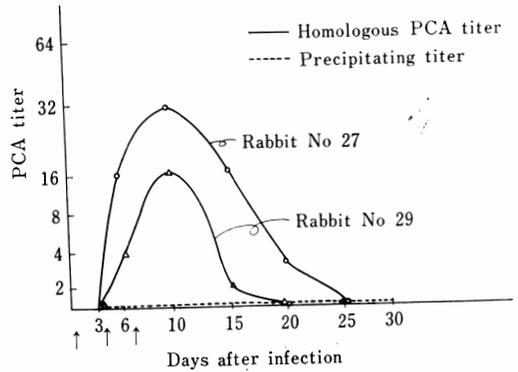


Fig. 4 Titer of induced homocytotropic antibody (three times infections with 2 days interval).

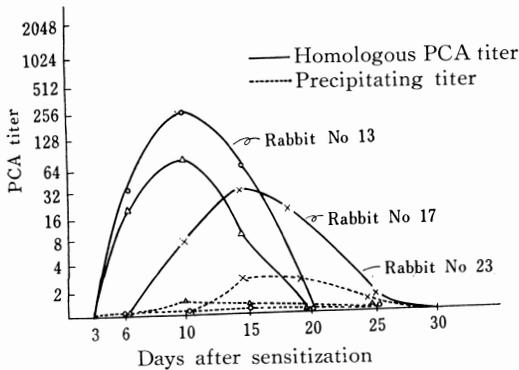


Fig. 3 Titer of induced homocytotropic antibody.

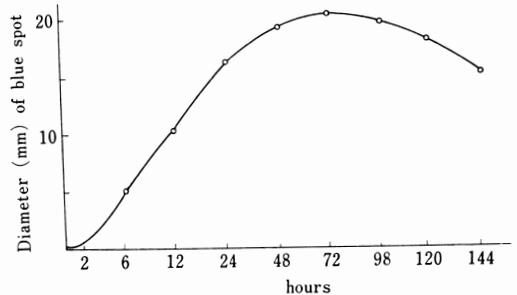


Fig 5 Latent period of homologous PCA.

倍率を力価として35日に亘って観察すると感作の場合には256倍稀釈まで陽性であったものが最高で、他は32倍、64倍に止った。そして10日後と15日後が最高値を示し、20日と25日後にこの抗体は証明されなくなった。感染の場合には16倍、32倍と最高値が低く、10日後に最高値を示し20~25日後には抗体が証明されなくなった。これを第3図と4図が示している。

4) Homocytotropic antibody の組織固着性

抗体を正常なウサギに皮下注射後の惹起抗原を静注するまでの時間と PCA 反応の強さとの関係を検討した。即ち第5図に示すように72時間後が最高の力価を示すが144時間後でも12時間後のものより大きい青色斑が見られた。

PCA を実施する際 homocytotropic antibody の場合には特に passive transfer をされるウサギによつて抗体に対す態度を異にすることがある。要するに in vivo における反応の不安定性を示す。惹起抗原として

幼虫抗原を用いても、成虫抗原を用いても大体似た結果がえられた。即ち幼虫抗原で感作して成虫抗原を惹起抗原としても、その逆でも反応陽性となる。

5) Homocytotropic antibody に対する熱およびメルカプトエタノールの影響

抗体の熱に対する不安定性は第6図に示されている。56°C 2時間処理で活性は50%となり、56°C 6時間処理で20%に減ずる。一方 heterocytotropic antibody は熱に殆んど影響されない。56°C 6時間処理でも titre は減じていない。これを第6図に示してある。

メルカプトエタノール処理での影響については 2-mercaptoethanol 処理だけでは homo および heterocytotropic antibody 共変りがないが、2-mercaptoethanol 処理と iodacetamide 処理をして還元とアルキル化を行なうと homo の方の抗体だけが抗体活性を失う。しかし hetero の方の抗体は75%の残存活性を保持している。このことは第6表に示されている。

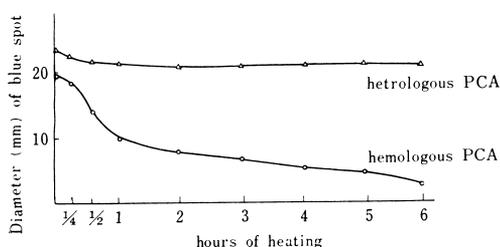


Fig. 6 Effect of heating on homo- and heterocytotropic antibodies.

Table 6 Influence of reduction and alkylation to hetero- and homocytotropic antibodies

Heterocytotropic antibody (rabbit→guinea pig)	Control	Sample
	Mercaptoethanol	20×20
Mercaptoethanol +Iodacetamide	20×20	16×15
Homocytotropic antibody (rabbit→rabbit)	Control	Sample
	Mercaptoethanol	18×20
Mercaptoethanol +Iodacetamide	18×20	0

#### 総括および考按

森下ら (1969) は寄生蠕虫症の皮内反応の特異性への疑問について記載した。ヒトでの寄生蠕虫症の皮内反応を行なう場合、PK 反応による passive transfer が可能なことからアトピーであると述べている学者がある。Ovary (1964) がウサギを免疫した場合その抗血清をモルモットに passive transfer する PCA 反応を紹介してから、この方法によるアレルギーの研究が急速に進歩した。そして Ogilvie (1964) によって寄生蠕虫症での homo と hetero の PCA の関係が報告された。しかし Ogilvie の考えた様に感染の場合にのみ homocytotropic な PCA が成立するのでないことが追々に判明して来た。Edwards *et al.* (1967) は Manson 住血吸虫を感染させたサルで罹患後 6 週で homocytotropic antibody が成立したことを他のサルに passive transfer して証明した。そしてこの組織結合性の強い homocytotropic antibody は passive transfer して 72 時間後の力価を 100 とすると 6 時間後のものは 16 で 7 日後のものは 58 であったという。著者がアニサキスで証明したのも 72 時間後が一番 titre が高く 6 時間後より 144 時間後のものの方がより力価は高かった。サルに住血吸虫を感染させた場合その homocytotropic antibody はヒトの reagin に

よく似ていて  $\gamma E$  グロブリンに analogous であるといわれている。Zvaifler *et al.* (1966) は結晶中アルブミンでウサギを感作すると 47 羽中 22 羽に reagin が証明され、homologous PCA 陽性であったという。

Bloch (1967) はヒト、モルモット、ラットおよびウサギについて各々の homocytotropic 抗体の特性を比較検討し易熱性であり、還元とアルキル化によって不活化することは共通しているという。電気泳動ではヒトは  $\gamma 1$  の部にあり分子量は 7.7S であるとし、モルモットのものは  $\gamma 1$  で 6.5S であるという。ラットのものは  $\beta$  で 7S より少しく大であり、ウサギのものは  $\gamma G$  の山より早く移動し、分子量は 7S より少しく大であるとした。皮膚固着性はヒトでは 28 日以上、モルモットは 2~4 日、ラットは 30 日以上でウサギは 17 日以上であるといっている。Bloch *et al.* (1968) は *Nippostrongylus braziliense* を感染させたネズミで、その homocytotropic antibody は pH 8.6 で寒天中で電気泳動すると  $\gamma G$ ,  $\gamma A$  および  $\gamma M$  よりも早く移動し、分子量は 7S より大きく 19S より小さいという。 $\gamma A$  グロブリンの diethylaminoethyl セルローズクロマトグラフィー上で homocytotropic antibody の活性は、ラット抗血清に対するウサギ抗血清で吸収することによって、 $\gamma A$  は吸収され本抗体だけが残る。このことからネズミで生じた homocytotropic antibody はヒトの  $\gamma E$  グロブリンに analogous な特異なネズミの免疫グロブリンからなっていることが証明されたという。Malley *et al.* (1968) はブタ回虫の粗雑な抽出液や電気泳動で精製した抗原をサルの皮内に注射して感作し、アトピー型の抗体の出来ることを報告している。この活性は 40~90 日つづくが、Arthus 型や delayed hypersensitivity の反応はこの際にはみられないという。Strejan *et al.* (1968) はラットを百日咳菌ワクチンを adjuvant としてブタ回虫抗原で感作すると、8 匹のラット中 6 に 1:80 の titre の homocytotropic antibody ができるといふ。anamnestic response については 6 日後に adjuvant なしに 0.1mg 注入すると間もなく 1:160 の力価にあがるが、14 日後に注入したのでは homocytotropic antibody は成立しないと報告している。いずれにしても寄生蠕虫感染によってヒトの reagin に似た抗体ができることは確かなようである。著者のアニサキス成虫および幼虫体抗原によるウサギの感作実験でも早い時期に homocytotropic antibody がつくられることが証明できた。しかしこのとき heterocytotropic antibody は沈降抗体と平行してつ

くられ、このもののあるウサギには homocytotropic antibody は証明されにくいことが証明された。アニサキス幼虫感染によってもウサギに homocytotropic antibody がつくられる。以上の実験から homocytotropic antibody は動物に対してある種の異種の蛋白が注入されたとき、 $\gamma$ G 抗体の成立する以前に早い時期につくられるものであるらしい。著者はこの抗体は異種の蛋白に対して浅い接触の瞬間につくられ、やがてその動物が正式に身構えて防禦抗体をつくるようになると証明されにくくなるものと考えている。

### 結 語

ウサギに *Anisakis* spp. の成虫および幼虫抽出液で感作したり、幼虫を経口感染させると homocytotropic antibody が形成される。heterocytotropic antibody と precipitating antibody は平行して形成されるが、そのときは homocytotropic antibody は証明されない。

Homocytotropic antibody は成虫抽出液1回感作で10羽のウサギ中2羽に、幼虫抽出液1回感作で5羽中1羽に6日後証明され、幼虫60匹宛2日間隔で3回投与した場合10日後に3羽中2羽に証明された。本抗体の持続期間は感作の場合は14~20日で、感染の場合は10日位である。homologous PCA を行なうときの latent period は72時間後が一番 titre が高く144時間でも可能である。

Homocytotropic antibody は易熱性で、還元およびアルキル化によって不活化する。

### 文 献

- 1) Bloch, K. J. (1967): The anaphylactic antibodies of mammals including man. *Progr. Allergy*, 10, 84-150.
- 2) Bloch, K. J. and Wilson, R. J. M. (1968): Homocytotropic antibody response in the rat infected with the nematode, *Nippostrongylus braziliense*. III Characteristics of the antibody.

- J. Immunol., 100, 629-636.
- 3) Edwards, A. J., Jones, V. E., Smithers, S. R. and Terry, R. J. (1967): The occurrence and properties of reagins in rhesus monkeys infected with *Schistosoma mansoni*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 61(3), 280-293.
- 4) Freund, J., Thomson, K. J., Hough, H. B., Sommer, H. E. and Pisai, T. M. (1948): Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvant. *J. Immunol.*, 60, 393-398.
- 5) 小林昭夫・熊田三由・石崎達・勝呂毅・小糸賢太郎: アニサキス幼虫体抽出液ならびに同虫体の排泄物. 分泌物抗原による皮内反応 I, II, 寄生虫誌, 17, 407-413, 414-418.
- 6) Malley, A., Amkraut, A. A., Strejan, G. and Campbell, D. H. (1968): Hypersensitivity to *Ascaris* antigen. III Atopic-type hypersensitivity induced in rhesus monkeys. *J. Immunol.*, 101, 292-300.
- 7) 森下哲夫・小林瑞穂・坂田六郎・五藤基・山田稲好・榊原弘・三島誠也・古橋貞二郎・平岡義雄・山田正仁(1965): *Anisakis* 症の皮膚反応. 寄生虫誌, 14, 230-232.
- 8) Ogilvie, B. M. (1964): Reagin-like antibodies in animals immune to helminth parasites. *Nature*, 204, 91.
- 9) Strejan, G. and Campbell, D. H. Hypersensitivity to *Ascaris* antigens. IV Production of homocytotropic antibodies in the rat. *J. Immunol.*, 101, 628-637.
- 10) 谷口正明(1966): *Anisakis* の研究(1) 抗原性. 寄生虫誌, 15, 502-506.
- 11) Wilson, R. J. M. and Bloch, K. J. (1968): Homocytotropic antibody response in the rat infected with the nematode *Nippostrongylus braziliense*. II Characteristics of the immune response. *J. Immunol.*, 100, 622-628.
- 12) Zvaifler, J. N. and Becker, L. E. (1966): Rabbit anaphylactic antibody *J. Exp. Med.*, 123, 935-950.

**Abstract**HOMOCYTOTROPIC ANTIBODY OF THE RABBITS, SENSITIZED OR  
INFECTED WITH *ANISAKIS* (NEMATODA)

MASAAKI TANIGUCHI

*(Department of Parasitology, School of Medicine, Gifu University, Japan.)*

Phosphate-buffered saline extract of *Anisakis* spp. adults or larvae were injected into foot pads of rabbits with Freund's complete adjuvant. After 6 days, homocytotropic antibody were detectable in only 3 of 15 rabbits and this activity continued for about 14-20 days. When rabbits were infected three times orally with 60 larvae each at two days interval, homocytotropic antibody were detectable after 10 days in 2 of 3 rabbits and this activity continued for about ten days. Latent period of homologous PCA was 72 hours for maximum titre and it continued till 144 hours or over. The homocytotropic activity was heat-labile and turned inactive by reduction and alkylation. By sensitization or infection with *Anisakis*, heterocytotropic antibody (rabbit→guinea-pig) was detectable parallel to precipitating antibody, but could not be detectable in the rabbits which had homocytotropic antibody. Heterocytotropic activity was stable to heat and not sensitive to reduction and alkylation.