

アニサキス成虫と幼虫抗原の比較

谷 口 正 明

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(昭和45年5月4日 受領)

著者(1966)はさきにアニサキス幼虫をアジヤサバの腹腔から採取し、その虫体成分によつてウサギを免疫し、ブタ回虫およびイヌ回虫体成分との抗原性の異同をしらべた。そして沈降反応による交叉試験で共通抗原の存在を指摘した。鈴木(1968)は Freund's complete adjuvant を加えたアニサキス幼虫抗原によるウサギの免疫血清で免疫電気泳動を行ないアニサキス抗血清→アニサキス抗原のときは24本、ブタ回虫抗血清→ブタ回虫抗原のときは26本の沈降線があらわれるが、アニサキス抗血清→ブタ回虫抗原およびブタ回虫抗血清→アニサキス抗原のときはそれぞれ16本の沈降線のみられることを報告した。著者はアニサキス I 型幼虫とマイルカの第3胃からえられたアニサキス成虫からの抗原によつてそれぞれ、ウサギを免疫し免疫電気泳動法によつてその抗原性の異同を検討したのでここに報告する。

実験材料および方法

アニサキス I 型幼虫はアジの腹腔から採取した体長15~20mm のものを使用した。

アニサキス成虫 (*Anisakis* sp.) は和歌山県太地でとれたマイルカ *Delphinus delphis* の第3胃からえた30~40mm のもので微温生理食塩水に入れ生きたまま研究室にもち帰つて処置した。

虫体抽出液の製法は次のようである。幼虫および成虫は水で数回よく洗い、更に精製水で洗浄したのち、出来るだけ細切し、磨碎機でつぶしたのち、アセトン処理を数回行ない、アセトン乾燥末とした。この乾燥末1gに pH 7.2の生理食塩水10ml を加え、更に磨碎機で十分に磨碎した。この液を12,000rpm 20分遠心沈澱し、その上清部を12時間透析した。更にこの溶液をセロファンチューブに入れカーボワックス6,000で内容を約 1/4 に濃縮した。このものを免疫電気泳動法および Ouchterlony 法での抗原液とした。ウサギを免疫する際には虫体のアセトン乾燥末を用いた。

抗血清の作成法は次のようである。体重2,500~3,000

g のウサギ4羽を用いて各2羽づつを成虫および幼虫抗原用として免疫した。アセトン乾燥末60mg に2ml の生理食塩水を加えて十分混和し、これに等量の Freund's complete adjuvant を加え emulsion としウサギの後肢の足蹠の皮下の2カ所に2等分して分割接種した。さきへのべた鈴木の方法にならつて3週間経過後1週毎に3回同量の抗原を腋窩の筋肉内に追加免疫を行なつた。最後の注射後1週間して抗体価をしらべ十分上昇しているウサギから採血して血清を分離した。

抗体価の測定法は次のようである。まず試験管内での重層法によつて抗原および抗体稀釈で実施した。室温下で1時間後の値を抗血清の抗体価とした。

免疫電気泳動法については泳動条件を電源110~120 volt (5~30mA) とし、白金線電極を用い緩衝液は Veronal-Veronal Na pH 8.6 (0.05M) を用いた。電流は0.6mA/cm で通電時間は50分であつた。支持体としてセルローズ、アセテート膜(Millipore)を用いた。幼虫および成虫抗原共上記のような泳動条件で泳動した後、支持体の中央溝に抗血清0.01μl を注入して、流動パラフィン中で24時間反応させた後、生理食塩水で十分に洗浄した。そしてニグロシン酸液(ニグロシン10ml; 酢酸2ml; 精製水100ml) で12時間染色し、さらに2~3%の酢酸液で洗つてその後乾燥させて観察した。

Ouchterlony 法は Feinberg (1957) の報告した方法に準じて行なつた。支持体としてセルローズ、アセテート膜を用い、緩衝液は Veronal-Veronal Na (pH 8.6) を使つて室温下で4日間反応させ、生理食塩水で十分に洗浄した後、ニグロシン酸液で12時間染色した。

別に抗原の総窒素量の測定はマイクロケルダール法によつた。

また抗アニサキス幼虫および成虫血清に対して対応する抗原で吸収試験を行なつた。0.5ml の抗血清に8mg の抗原を加えて37°C 2時間処理した後、4°C の氷室で12時間放置した。この間ときどき攪拌してその後3,000

Table 1. Antibody titers of rabbit sera immunized with *Anisakis* adult and larvae antigens in precipitation test

Week after sensitization		1W	2W	3W	4W	5W	6W	7W
Rabbit	No. 1	16	16	32	128	256	512	512
"	No. 2	4	16	32	128	512	1024	1024
"	No. 3	8	16	16	64	128	512	512
"	No. 4	32	64	64	128	128	256	256

* Rabbit No. 1, 2; Adult antigen

Rabbit No. 3, 4; Larvae antigen

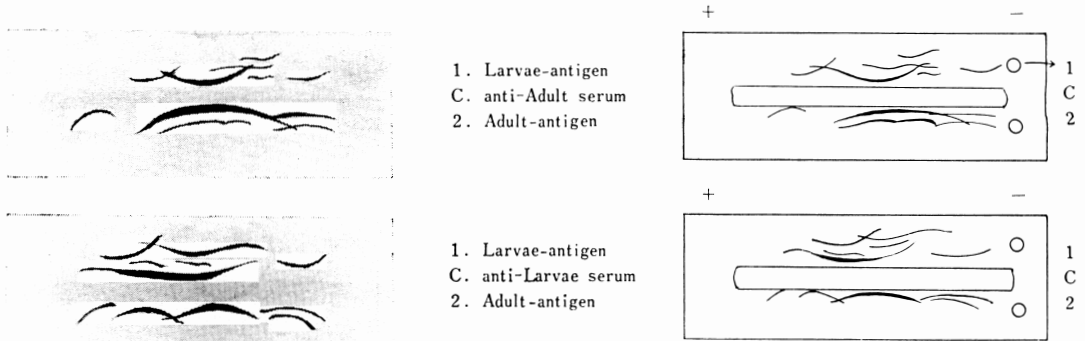


Fig 1. Diagrams of immunoelectrophoretic patterns.

rpm 10分間遠心沈澱してその上清部を吸収後の抗血清として使用した

実験成績

1) ウサギの抗体産生 試験管内の重層法による抗体の産生状況は第1表のようである。幼虫および成虫抗原で免疫された4羽のウサギで、1週間後には4~32倍と titre の低かつたものが、追加免疫をした時期から急に上昇し始め6週後には512~1,024倍稀釈迄沈降反応陽性を示すようになった。成虫抗原で免疫した場合の方が幼虫抗原で免疫した場合より抗体価がやや高いようである。

2) 免疫電気泳動法による成虫および幼虫抗原の性状 アニサキス幼虫および成虫抗原について ミクロキエルダール法による総窒素量の測定の結果は次のようである。幼虫抗原は0.179mgN/mlで成虫抗原は0.288mgN/mlであった。このことは成虫抗原の方が約1.6倍ほど窒素含有量の多いことを示している。両抗原の免疫電気泳動法による分析結果は第1図に示した。アニサキス幼虫抗原は幼虫抗血清との間に6本の沈降線が認められ、中でもアルブミンと思われる位置にはつきりした沈降線が1本見られた。一方アニサキス成虫抗原は幼虫抗血清との間に5本の沈降線が見られ、この場合もアルブミンと思われる位置にはつきりした沈降線が1本見られた。

アニサキス幼虫抗原と成虫抗血清との間には6本の沈降線がみられ、このときもアルブミンと思われる位置にはつきりした1本の沈降線がみられる。アニサキス成虫抗原と成虫抗血清との間には5本の沈降線がみられ、アルブミンの位置にはつきりした沈降線が1本存在する。

吸収試験の結果は成虫抗血清を成虫抗原で吸収すると成虫抗原にも幼虫抗原にも反応が認められない。逆に幼虫抗血清を幼虫抗原で吸収すると幼虫抗原にも成虫抗原にも反応が認められず、すべて吸収されてしまうようである。

3) Ouchterlony 法 幼虫抗原および成虫抗原と幼虫による抗血清および成虫抗血清の間の関係を第2図に示した。Center cup に幼虫抗血清をおいて4周に図のように幼虫抗原と成虫抗原をおいた場合、共に1本の強い沈降線が形成された。この沈降線は相互に末端がわん曲し連なりルーピング現象を示し共通した同一成分を想像させる。その外側に更に1本の弱い沈降線が何れの抗原にも認められた。Center cup に成虫抗血清を入れ同様に幼虫抗原と成虫抗原をおいた場合にも同じような結果をえた。ただし外側の沈降線が非常に弱かつた。

考 按

寄生蠕虫の幼虫と成虫の抽出液について共通抗原性のあることは多くの学者によって確認されている。しかし

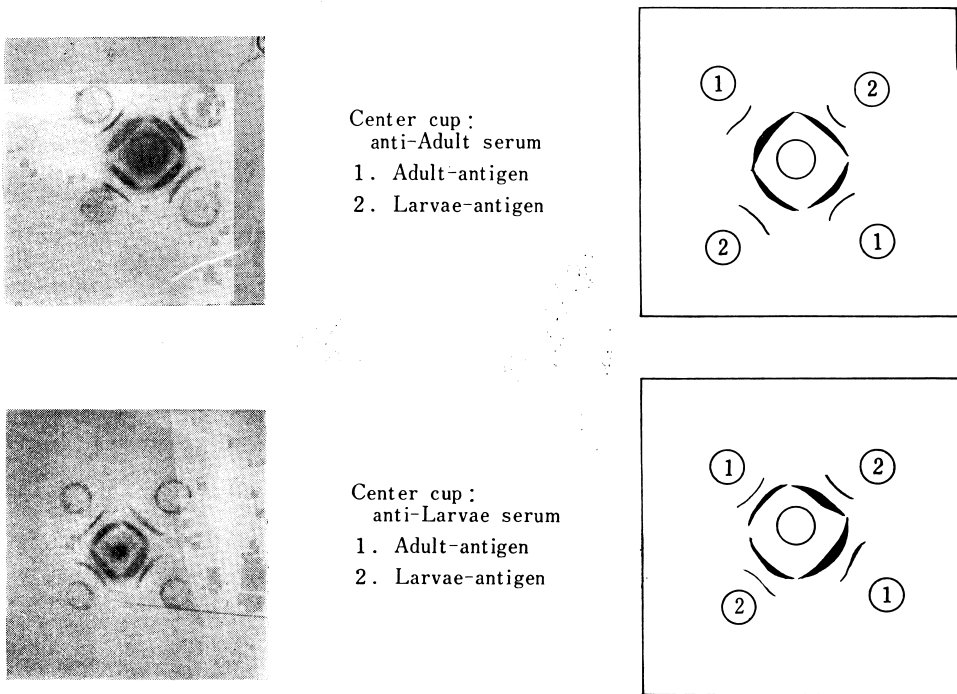


Fig 2. Cross double diffusion precipitin reactions of adult and larvae antigens-antibodies.

すべて同一成分であるか否かは別の問題である。抽出時の状態によってもこのことは左右されるし、生殖器官の成熟した状態ではある種のホルモンその他の合成もあるであろうし、幼虫には幼虫の独自の成分もあるであろう。著者の今回の実験で抽出状況を同一にしても抽出された総窒素の含有量にかなりの差が認められた。鈴木(1968)はアニサキス幼虫とブタ回虫成虫抽出粗抗原で感作したウサギ抗血清について免疫電気泳動を行ない非対応抗血清間ではいずれも16本の沈降線がみられたという。対応抗原、抗血清間ではアニサキスの場合24本の沈降線のみとめている。これは澱粉ゲル電気泳動法によつたもので著者の支持体としてセルローズ、アセテート膜を用いた簡便法では、はつきりみとめられた沈降線は6本にとどまつた。しかし成虫抗原 (*Anisakis* sp.) とアニサキス I 型幼虫抗原との間には大体において共通部分が多いようであつた。

結 語

アニサキス I 型幼虫およびマイルカの第3胃からえた *Anisakis* sp. をアセトン乾燥末とし、生理食塩水で抽出してえた抗原で、それぞれの総窒素量は0.179mgN/ml と0.288mgN/ml のものを用いて Freund's complete adjuvant と共に足蹠に初め皮下注入し、のちに腋窩筋

肉内に追加免疫した。支持体としてセルローズ・アセテート膜を用い免疫電気泳動を行ないアニサキス幼虫抗原は幼虫抗血清との間に6本の沈降線を生じ、成虫抗血清との間にも6本の沈降線を生じた。

アニサキス成虫抗原は成虫抗血清との間に5本の沈降線を生じ、幼虫抗血清との間にも5本の沈降線を生じた。

Ouchterlony 法で成虫と幼虫抗原に対する作用をみたが、成虫および幼虫抗血清との cross reaction で全く同じように沈降線を生じた。吸収試験では幼虫抗血清を幼虫又は成虫抗原で、逆に成虫抗血清を両抗原で同様吸収すると、何れの場合も吸収された抗血清は両抗原に全く反応しなくなった。

文 献

- 1) Feinberg, J. J. (1957) : Identification, discrimination and quantification in Ouchterlony gel plates. *Int. Arch. Allergy*, 11, 129.
- 2) 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. 電気泳動法による抗原の分析. *寄生虫誌*, 17, 213-220.
- 3) 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.
- 4) 谷口正明(1966) : *Anisakis* の研究 (1) 抗原性. *寄生虫誌*, 15, 502-506.

AbstractCOMPARATIVE STUDY ON *ANISAKIS* ADULT AND LARVA ANTIGENS

MASAAKI TANIGUCHI

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

Rabbits were immunized with saline extracts from *Anisakis* larva and adult worms.

Larval worms were obtained in the peritoneal cavity of horse-mackerels or mackerels and adults in the third stomach of *Delphinus delphis* in Japan. The results obtained are as follows;

- 1) Titers of precipitation were somewhat higher in the case of adult worm extract than larva one.
- 2) Immuno-electrophoresis of those antigens and antisera have shown that antigenic compounds contained more than 6 in larval antigen and more than 5 in adult one.
- 3) By the absorption test with larval or adult antigen, the number of precipitation bands mostly disappeared in all cross antigen-antibody operations.
- 4) In Ouchterlony's test no differences were recognized between larva and adult correspondences.