

## アニサキス症の組織診断における蛍光抗体法の応用

### 2. *Anisakis* 幼虫抗原成分の解析, 特に角皮抗原 の分離について

白 木 公 鈴木 俊 夫 大 鶴 正 満  
佐 藤 良 也 監 物 実

新潟大学医学部医動物学教室

浅 石 和 昭

札幌医科大学第1外科学教室

(昭和48年4月6日 受領)

#### はじめに

前報で述べた如く、凍結融解および超音波処理によつて得られた *Anisakis* 幼虫の難溶性成分は、蛍光抗体染色における幼虫切片との反応状況から角皮組織も含めた虫体のほとんど全ての組織成分を有することが知られた(白木ら1973)。

アニサキス症の陳旧性病巣においては角皮組織が最も長期間にわたり残存し、また虫体が他へ移行して病巣部には脱皮片だけを残す例もしばしば認められる(白木1969)。こうした陳旧性病巣における角皮の検出に役立つ目的で上記の難溶性成分を硫酸塩析および DEAE-cellulose のカラムクロマトグラフィーによりいくつかの分画に分け、各分画を用いて免疫したウサギの抗血清に蛍光色素を標識し、それぞれにより虫体切片を染色し、反応の局在を調べた。その結果、角皮に特異的とみられる成分を分離することができたので報告したい。

#### 材料・方法

擬体腔液(perienteric fluid)：スケトウダラの内臓寄生の *Anisakis* 幼虫 I 型を数ヶ所で切断し、乳鉢で軽く磨砕、少量の生理食塩水を加えて遠心沈澱を行ない得られた赤味を帯びた上清である。

難溶性抗原(somatic antigen)：前報で述べた如く、前記の擬体腔液を採つた後の沈澱に2倍量の生理食塩水を加えて磨砕後遠心沈澱し、上清を棄てる。これを2回繰り返して易溶性成分を除いた。得られた白色の沈澱に凍結融解を5回繰り返した後、生理食塩水を加え、

10KC 超音波振動を 200W で 60 分間加え、20,000 rpm 30分遠心して上清を集めた。

硫酸塩析：擬体腔液および難溶性抗原を硫酸塩析法によつていくつかの分画に分けた。すなわち、水酸化アンモニウムで中性にした 4°C 飽和硫酸を試料に滴下し、初めは40%飽和とし、4°C のものとので30分攪拌した後遠心沈澱により上清と沈澱に分けた。上清および 0.005 M 磷酸緩衝液(PB) PH 7.4 で溶解した沈澱はセロファンチューブに入れ、大量の同緩衝液で4°C、48時間透析し、硫酸を除いた。次いで上清分画は60%飽和で塩析し、沈澱と上清に分けた後同様に透析した。上清分画はさらに80%飽和で塩析を行ない沈澱と上清に分け最後に100%飽和で塩析した。100%飽和とする場合は硫酸結晶を試料に加えて行なつた。

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー：硫酸塩析で分けた各分画について、さらに DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによる分離を試みた。すなわち 0.005モル PB, PH 7.4で平衡化した DEAE-cellulose カラムに前記試料をのせ、NaCl を0.05, 0.1および0.3 M濃度に加えた緩衝液によつて溶出し、それぞれの濃度で溶出してくる成分を集めた。

抗血清およびその蛍光標識：得られた各分画は磷酸緩衝生理食塩水(PBS)で透析した後、アジュバンドを加えてウサギの足蹠皮下に接種、2週間隔で3回追加免疫を行ない、最後の免疫より1週後に頸動脈から全採血した。得られた抗血清に対して前報と同様に硫酸塩析と DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーを行ない IgG を精製し、これを fluorescein isothiocyanate で

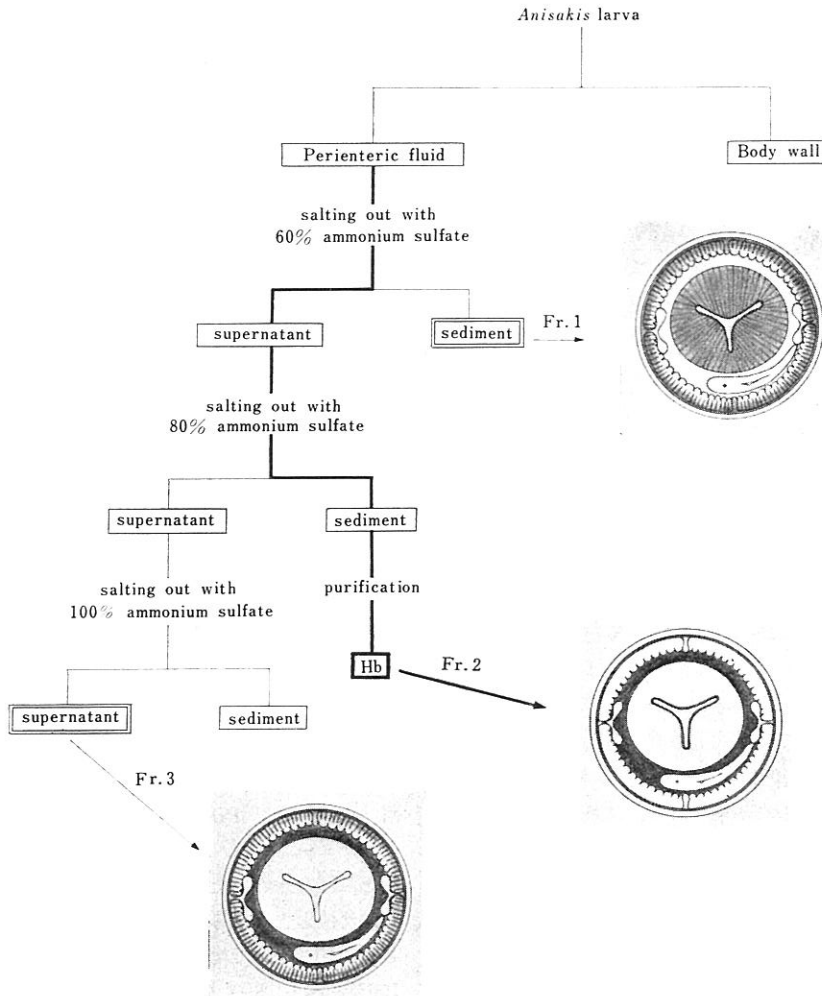


Fig. 1 Procedure of antigenic analysis and the localization of each component.  
 Black parts shows the reacted cite of fluorescent antibodies  
 (1) Perienteric fluid

標識した。

被検抗原：各分画に対応する蛍光抗体液と幼虫組織との反応の局在を調べるため *Anisakis* 幼虫 I 型の横断切片をクリオスタットにより作製し、前報と同様の方法で蛍光抗体染色を行ない、蛍光顕微鏡により観察した。なお対照として豚回虫成虫、*Contracaecum* 型幼虫、*Terranova* 幼虫などについても同様に切片をつくり染色、観察を行なった。

成 績

Fig. 1 (1) に示した如く、擬体腔液については硫酸の 60% 飽和で沈澱する分画 (Fraction 1) および 100% 飽

和で沈澱しない分画 (Fraction 3) について検討した。Fraction 2 は前報で述べた如く *Anisakis* 幼虫 Hb を含む分画である。各 Fraction に対応する蛍光抗体液の虫体切片との反応の局在を模式的に図示した。図で黒い部分が反応した組織である。

抗-Fraction 1 抗体は体腔液とは反応せず中腸、筋線維 (筋紡錘部)、角皮下層等と反応した。抗-Fraction 3 抗体は擬体腔、角皮下層、筋線維等と反応した (Table 1)。

難溶性抗原 (Fraction 4) については既に前報で述べたが、さらにこれを Fig. 1 (2) に示した如く、硫酸の 40% 飽和で沈澱する分画 (Fraction 5) および 40~80% 飽和で沈澱する分画 (Fraction 6) に分けた。Fraction

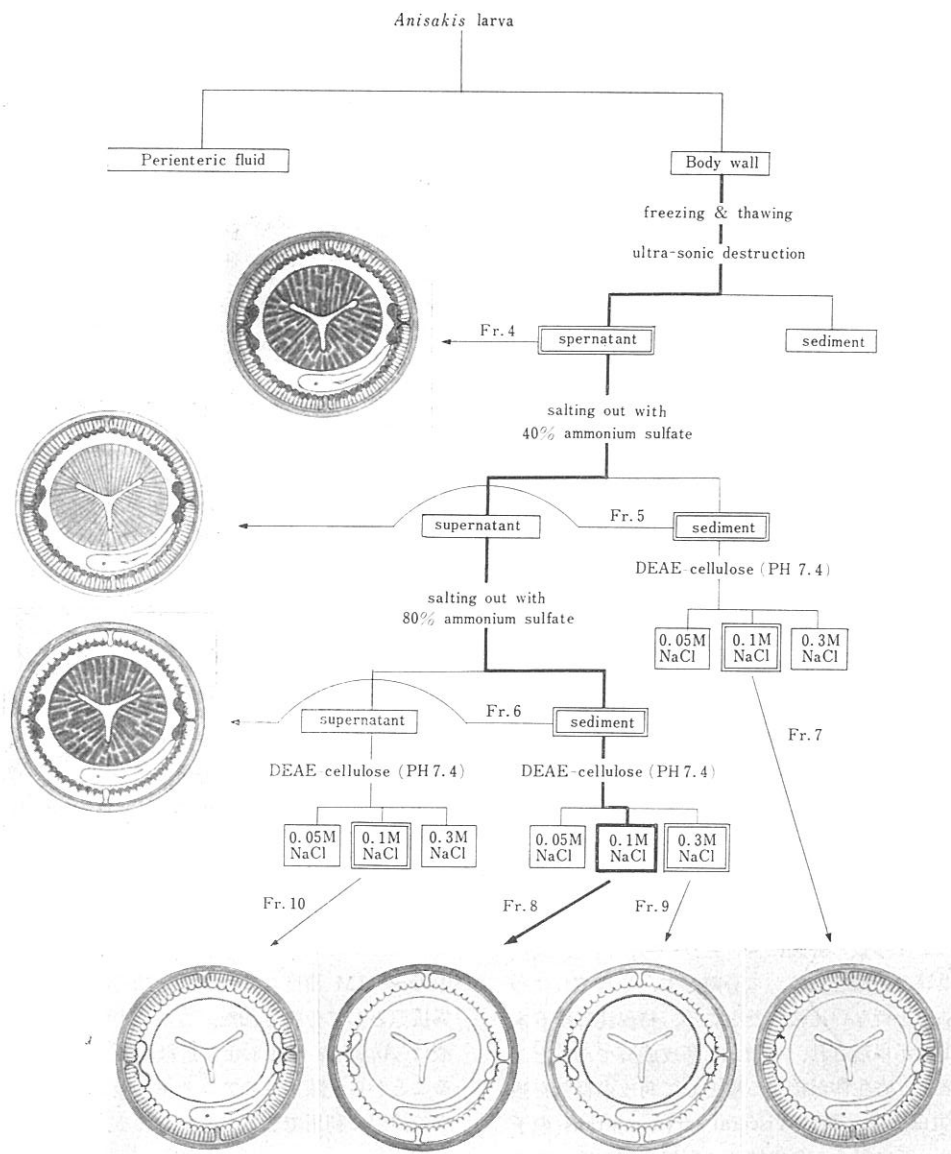


Fig. 1 (2) Body wall

5, 6 および80%飽和で沈澱しない成分についてはDE-AE-cellulose カラムクロマトグラフィーにより, それぞれ3つの分画に分けた (Fraction 7~10). Fraction 5と6を比較すると, 反応の局在は両者でかなりの相違がみられた. すなわち抗-Fraction 5抗体は幼虫の側線, 筋細胞 (髓胞部) と強く反応し, 角皮下層, 中腸, 筋線維, 角皮等との反応は弱かった. 一方, 抗-Fraction 6抗体は中腸, 側線, 筋細胞, 角皮等と強く反応した. 角皮成分は Fraction 6により多く含まれる

ことが知られた.

Fraction 6 から分離した0.05~0.1M 濃度 NaCl で溶出される分画 (Fraction 8) に対応する蛍光抗体液は *Anisakis* 幼虫切片の角皮層とのみ反応することから, この Fraction 8は角皮に特異的な成分で, 他の組織成分はほとんど含まないことがわかった. Fraction 7および10は筋組織の成分を含み, Fraction 9は中腸外壁および側線の辺縁部とも反応がみられた (Table 1). 異種抗原である豚回虫, *Contracaecum* 型幼虫, *Terranova*

Table 1 Cite of the reaction of FITC-labeled anisakis antibodies at the sections of *Anisakis* larva

FITC-labeled anti- <i>Anisakis</i> IgG	Cuticle	Sub-cuticle	Lateral cord	Muscle fiber	Muscle cell	Perienteric cavity	Excretory cell	Midgut
crude	—	+	+	+	++	++	+	++
Fr. 1	—	+	—	+	—	—	+	+++
" 2( <i>Anisakis</i> Hb)	—	++	—	—	—	+++	—	—
" 3	—	+	—	+	—	+++	—	—
" 4(Somatic antigen)	++	++	+++	+	++	+	+	+++
" 5	+	+	++	++	+	+	—	+
" 6	++	+	+++	—	+++	+	+	+
" 7	+	+	—	+	—	—	—	—
" 8	++	—	—	—	—	—	—	—
" 9	+	—	—	—	—	—	—	—
" 10	+	—	—	+	—	—	—	—

幼虫の切片について、この抗-Fraction 8抗体で染色した結果は *Anisakis* 幼虫と同様やはり、角皮層とのみ反応した。

#### 考 按

角皮抗原の分離に関する研究としては Jeska (1967 a, b, 1969) の一連の報告がみられる。彼は主として Ochterlony 法および免疫電気泳動法によりイヌ回虫と豚回虫の抗原解析および相互比較を行なった。その結果、イヌ回虫の属特異抗原として免疫電気泳動で6本の沈降線を認めたとし、さらに抽出抗原を硫酸塩析、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー、Sephadex ゲル濾過等により多数の分画に分けた。一方、角皮、角皮下層、卵巣等の組織を虫体から分離して、それぞれについて抗原抽出を行ない比較したところ、特異沈降線6本のうちの1本が単離され、それは角皮成分であるとした。彼は宿主と寄生体が接する場として角皮の役割を強調し、寄生虫疾患、特に visceral larva migrans の予防あるいは診断に対する角皮抗原の利用の可能性を示唆している。

著者らはこれとは別の観点、方法で角皮抗原の分離を試みたが、その結果角皮に特異的な分画を分離することができた。この分画に対応する蛍光抗体液は角皮と特異的に反応することから、アニサキス症の陳旧性病巣における角皮の検出にある程度利用できると考えられる。この分画の化学的組織についての解析はまだ行なっていないが、豚回虫、*Contracaecum* 等の角皮とも同様に反応することから、おそらく単一成分ではなく、各線虫の角皮に共通した種々の成分を含むものと思われる。

これまで蛍光抗体により寄生虫抗原の解析を行なった報告は著者らの知るかぎりではまだ無い。複雑な体制をもつ蠕虫類の抗原解析にあたり、蛍光抗体法はきわめて有効な手段と考えられる。

#### ま と め

アニサキス症の組織診断に資するため、*Anisakis* 幼虫から角皮に特異的な成分の抽出を試みた。すなわち、幼虫を磨碎して生理食塩水により易溶性成分を抽出して、これを取り除いた後、凍結融解と超音波振動によって虫体組織から難溶性成分を抽出した。さらにこれから硫酸塩析により40~80%飽和で沈澱する分画を得、次いで DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーにより0.05~0.1M 濃度の NaCl で溶出される分画が角皮特異抗原として分離された。この分画に対応する蛍光抗体液は *Anisakis* 幼虫および近縁線虫の角皮とのみ反応することから、陳旧性のアニサキス症組織診断において角皮の検出に利用できると考えられる。

#### 文 献

- 1) Jeska, E. L. (1976a): Antigenic analysis of a metazoan parasite, *Toxocara canis*. I. Extraction and assay of antigens. *Exp. Parasitol.*, 20, 38-50.
- 2) Jeska, E. L. (1976b): Antigenic analysis of a metazoan parasite, *Toxocara canis*. II. Purification and analysis of two antigenic components. *J. Immunol.*, 98, 1290-1300.
- 3) Jeska, E. L. (1969): Purification and immunochemical analysis of a genus specific cuticular antigen of *Toxocara canis*. *J. Parasitol.*, 55, 465-471.

- 4) 白木公(1969): 消化管幼虫線虫移行症(主としてアニサキス症) 病理組織学的診断について. 最新医学, 24, 378-389.
- 5) 白木公・鈴木俊夫・大鶴正満・佐藤良也・監物実・浅石和昭(1973): アニサキス症の組織診断における蛍光抗体法の応用. 1. 抗-粗抗原 IgG および抗-精製抗原 IgG の反応性. 寄生虫誌, 22, 131-140.
- 6) 鈴木俊夫(1968): アニサキス症の免疫学的診断に関する研究 1. 電気泳動法による抗原の分析. 寄生虫誌, 17, 213-219.
- 7) 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に関する研究 2. 抗原の分離・精製. 寄生虫誌, 18, 232-239.

## Abstract

EXPERIMENTS FOR THE APPLICATION OF FLUORESCENT ANTIBODY METHOD  
TO HISTOLOGICAL DIAGNOSIS OF ANISAKIASIS  
2. ANTIGENIC ANALYSIS OF *ANISAKIS* LARVA, ESPECIALITY  
ON THE CUTICULAR ANTIGEN

TADASHI SHIRAKI, TOSHIO SUZUKI, MASAMITSU OTSURU,  
YOSHIYA SATO AND MINORU KENMOTSU  
(*Department of Medical Zoology, Niigata University School of  
Medicine, Niigata, Japan*)

KAZUAKI ASAISHI  
(*First Department of Surgery, Sapporo Medical College,  
Sapporo, Japan*)

In order to apply fluorescent antibody technique to histological diagnosis of anisakiasis, the authors tried to extract cuticular antigen of *Anisakis* larva from the "somatic antigen" mentioned in the preceding paper. "Somatic antigen" extracted by freezing-and-thawing and ultrasonic vibration was fractionated by salting out with ammonium sulfate and DEAE-cellulose column chromatography. These several fractions were inoculated to rabbits subcutaneously with Freund's complete adjuvant. Rabbits anti-sera corresponding to each fraction were labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and cryostat sections of larva stained by these labelled anti-sera were observed under fluorescent microscope.

As a result, it was known that a fraction which was precipitated with 40~80% ammonium sulfate and eluted by 0.05~0.1 mol NaCl in DEAE-cellulose column chromatography was specific to cuticle component.

As the FITC-labelled anti-serum corresponding to the cuticular antigen reacted only to cuticular layers of *Anisakis* larva and other related nematodes, this fluorescent antibody seemed to be useful for detection of cuticle in histological diagnosis of long-standing anisakiasis.