

## アニサキス症の免疫学的診断における蛍光抗体法の 応用(1) 抗原の作製法について

佐藤良也 鈴木俊夫 山下隆夫  
白木公 関川弘雄 大鶴正満

新潟大学医学部医動物学教室

(昭和48年5月11日 受領)

### はじめに

近年、幼線虫を抗原とした間接蛍光抗体法を線虫症の免疫学的診断に応用しようという試みが数多く出され、特異的で再現性の高い抗原を得るためのいくつかの工夫がなされている。Sadun *et al.* (1962) が旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) の幼虫について10%ホルマリン+0.5%ウシ血清アルブミン (BSA) による固定抗原が好結果をしめすことを報告してから、Mitchell (1964), Bisseru & Woddruff (1968) はイヌ回虫 (*Toxocara canis*) の幼虫について、Muller (1970) はメダナ虫 (*Dracunculus medinensis*) 幼虫について、それぞれ追試して良好な成績を得たと述べた。他方、Sulzer (1965) は旋毛虫をペプシンで完全に消化して得た角皮を10%ホルマリン+0.5% BSA で固定したものを抗原として使用する方法を報告し、Kozar *et al.* (1966) はこの角皮抗原をスライドガラス上に熱固定して使用する変法、ついで Wegesa *et al.* (1971) はこの抗原を Tissue-Tec OTC に包埋して凍結切片とする変法を報告した。超音波やホモゲナイザーで破壊した虫体片を抗原とする方法も Baratawidjaja *et al.* (1963), Mantovani & Sulzer (1967), Le Viguelloux *et al.* (1972) によつて報告された。更に虫体の切片を抗原とする方法として、Brzosko *et al.* (1965) の筋肉内の旋毛虫幼虫の切片を使用するものや、Ruitenber *et al.* (1968) の施毛虫幼虫の凍結切片を使用する方法などがある。以上にあげた抗原は幼虫全体または虫体の不溶性の体構成成分を用いたもので、非特異的反応の排除は困難なものと思われる。虫体より抽出した各種可溶性蛋白質を抗原とする方法は、Toussaint & Anderson (1965) によつて最初に寄生虫症の免疫学的診断に導入されてから、種々の寄生虫感染に応用され

た (Toussaint *et al.* 1965, Toussaint 1966, Sadun & Gore 1967, Duxbury & Sadun 1967, Gore & Sadun 1968, Gore *et al.* 1970)。著者らはアニサキス症の免疫学的診断に関する研究の一環として、アニサキス幼虫を用いて間接蛍光抗体法を試み、これまでに各種寄生虫について報告された抗原の作製法をアニサキス幼虫に適用し追試してみたが、感度、特異性などの点で満足すべき成績を得ることができなかつた。今回は、これまでに報告された方法の欠点を補うような抗原作製法の開発を目標として次の点に重点をおいて検討を加えてみた。即ち、1) 非特異的な反応が少ないこと、2) 実験操作が簡便で、判定に際して主観的要素の入る危険性が少ないこと、3) 抗原の長期間の保存が可能なことなどである。

### 材料方法

#### 1) 実験材料

アニサキス幼虫は北海道産のスケトウダラの内臓より、ブタ回虫は屠場でブタの消化管内より、またイヌ回虫は新潟市において捕獲されたイヌの消化管内より得た。

#### 2) 抗原の作製

##### a) 粗抗原の作製法

虫体を蒸留水で十分に洗い、乳鉢を用いて、よく磨砕したあと凍結乾燥を行なつた。この乾燥粉末に4°Cのアセトンを加えて10分間脱脂したあと遠心し、沈渣に充分量のリン酸緩衝食塩水 (PBS) を加え4°C で48時間、スターラーを用いて攪拌抽出を行なつた。抽出液は20,000 rpm, 30分間遠心して上清をとり、濃縮したあと PBS に透析した。

##### b) アニサキス幼虫ヘモグロビン (An-Hb) の精製法

アニサキス幼虫の特異抗原としての An-Hb は既報の如く(鈴木ら1969), アニサキス幼虫を細切し, 少量の PBS とともに20,000rpm, 30分遠心して得た体液より精製した. An-Hb はこの体液を飽和硫酸液で60%飽和にすれば上清中に含まれ, 75%飽和では沈澱してくるため, 遠心して沈澱を集め, 少量の水に溶かして透析し, 0.005M リン酸緩衝液(PB), pH 7.2+0.1M NaCl で十分に平衡化した DEAE-セルローズカラムに吸着させ, 0.005M PB+0.3M NaCl で溶出させて得た.

#### d) 蛍光抗体法 (IFAT) 抗原の作製法

IFAT 抗原としては虫体を磨砕して十分に体液成分を洗い流した虫体壁(BW 抗原)と, 更にこれを1%ペプシン+0.5%塩酸で37°C, 18時間消化して得た角皮(Cuti. 抗原), 更に粗抗原ならびに An-Hb 抗原を結合させた Sepharose 粒子 (Seph. 抗原) とを用いた. BW 抗原は虫体を磨砕し, ガーゼ2枚でろ過して得た比較的細かい体壁片を PBS で洗浄後, 凍結乾燥して4°C に保存しておき, 使用に際して4°C アセトンで5分間固定し, PBS で2回遠心洗浄したあと, 沈澱に4倍量の PBS を加えて浮遊液としたものを用いた. Cuti. 抗原もペプシン消化処理後, 同様に保存し, 20%浮遊液として用いた. 可溶性抗原を Sepharose に結合させる方法は Porath *et al.* (1967) に準拠した. CNBr 活性化 Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) の1g を Büchner 漏斗上で約200ml の0.001M 塩酸溶液を加えて膨潤, 吸引洗浄し, 更に0.1M NaHCO<sub>3</sub>+0.5M NaCl で洗浄後, 1,000rpm で3分間遠心した沈澱に予じめ0.1M NaHCO<sub>3</sub>+0.5M NaCl に溶かした蛋白抗原(10~20mg)を混合し, 室温で約2時間反応させた. ゲルの攪拌は Sepharose 粒子の破壊を防ぐためにスターラーによる攪拌はさけ, 栓をつけた試験管を用いて時々上下反転を繰り返すことによつて混合した. 更にゲル表面の遊離の活性基を遮蔽する目的で1M のエタノールアミン(塩酸にて pH 8.0に調節)を加えて1時間反応させ, 反応後は4°C の0.1M acetate buffer (pH 4.0)+1M NaCl と0.1M borate buffer (pH 8.0)+1M NaCl で交互に1回ずつ遠心洗浄したあと, 1%サッカロース+0.3% BSA を含む PBS で洗浄し, 凍結乾燥して4°C に保存した. 使用に際して, ゲルは PBS で膨潤させ, 3回洗浄して20%浮遊液とした.

#### 3) 間接蛍光抗体法 (IFAT)

反応は試験管内で行なつた. 倍数希釈した被検家兎血清の各希釈系列より0.3ml ずつを円錐小試験管にとり,

これに各抗原浮遊液0.05ml ずつを加えて混和し, 37°C で30分反応を行なつた. 反応中, この試験管は10分ごとに軽く振盪混和した. 反応終了後, PBS で3回遠心洗浄し, 更にこれに蛍光抗体液(抗家兎 IgG+FITC)を1滴加えて同様に30分反応させたあと, PBS で3回洗浄した. ついで沈澱に緩衝グリセリン(pH 9.0)を1滴加え混和してから, その1滴ずつを5×7.5cm のスライドガラス上に滴下し, 5×5mm のカバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で観察した. この方法により1枚のスライドガラス上に約40検体をのせることが可能であつた. 判定は BW 抗原では虫体破片のうち内部組織(筋層)と判断される部分, また Seph. 抗原では Sepharose 粒子の周辺部における特異蛍光の有無によつて行なつた.

#### 4) 間接赤血球凝集反応 (IHAT)

Boyden によるタンニン酸処理法の変法を用いた. 精製 An-Hb は box titration によつて蛋白量100μg/ml が至適と考えられた. これを等量の3%タンニン酸処理ヒツジ赤血球浮遊液と混じ, 血球を感作した. 他の抗原についても蛋白量を100μg/ml として同様の方法で血球感作を行なつた. 血清は56°C, 30分非働化したあと, 4°C で1晩無感作ヒツジ血球による吸収を行なつて使用し, 倍数希釈した血清0.5ml に3%感作血球浮遊液0.05ml を加えて混和し, 4時間後に凝集の有無を判定した.

#### 5) 感染方法

感染動物として体重2kg 程度の家兎を用いた. アニサキス幼虫による感染には4羽の家兎を用い, うち2羽には幼虫を25隻宛, 経口投与し, 他の2羽には同数の幼虫を手術的に1羽には腹腔内, 他の1羽には皮下に埋没させる方法で感染させた. また, プタ回虫およびイヌ回虫の場合は雌成虫より得た受精卵を0.1N 硫酸溶液中で25°C, 40日間培養した仔虫包蔵卵を家兎各2羽宛に1,000個と2,000個の割合で経口投与して感染させた. 家兎は感染前および感染後は経日的に血清を採取し, IFAT ならびに IHAT によつて抗体価を測定した.

### 実験成績

#### 1) 各種抗原の反応部位

BW 抗原は大小不同の不規則な断裂虫体よりなり, 角皮, 筋細胞, 消化管がそれぞれ遊離してみられるものもあるが, 角皮と筋細胞とが分離せずに細片となつていものが多かつたので, それらについて抗原性を調べた. それによると, 筋細胞と思われる部位での蛍光は強

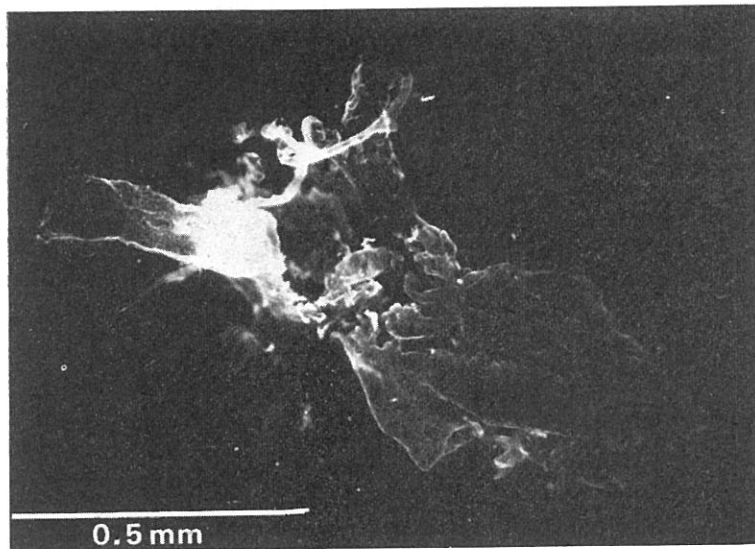


Fig. 1 Positive pattern of the *An.* BW-ag.

く、明らかに抗原性の存在が証明されたが、角皮部分での蛍光抗体の結合は弱く、筋細胞と比較すると著しく抗原性が低いと思われた (Fig. 1). BW 抗原を消化して得た Cuti. 抗原では、更に抗原性は低下し、高濃度の抗血清を作用させた場合しか蛍光を観察することができなかった。凍結切片での反応性については著者らがしばしば報告したが (鈴木ら1971, 白木ら1973a), 擬体腔, 角皮下層の Hb の豊富に含まれる部分が最も強く、筋細胞, 消化管細胞がそれに次ぎ、排泄腺, 角皮では極めて弱い反応しか見られなかった。いずれにせよ虫体の組織, 器官によつて反応性にかなりの違いがあるということは、そのいずれの部位での蛍光を判定の基準にとるかということ成績にかなりの差が出てくると思われた。本実験では擬体腔ならびに筋細胞における蛍光の有無を判定の基準において実施した。

以上, 3種の抗原を用いた IFAT と An-Hb を用いた IHAT について, アニサキス幼虫25隻感染家兎血清の経目的な抗体価の変動を調べて比較したのが Fig. 2 である。それによると BW と凍結切片を抗原として使用した際には抗体価に殆んど差のないことがわかった。しかし, 後の考按でも述べるように, これらの抗原には特異性の点でやや欠ける面があると思われた。一方, Seph. 抗原は前記の抗原に比べ極めて明瞭な反応を示し, ほぼ同大の粒子の表面に抗原が均一に結合しているため, 蛍光抗体の結合も極めて均質であり, そのため高濃度の抗血清を作用させると, 粒子全体が“満月状”に

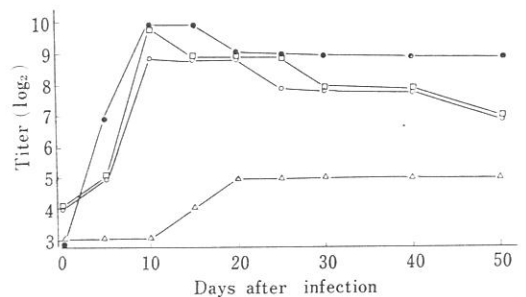


Fig. 2 The IHAT and IFAT titer in the sera from rabbit infected with *Anisakis* larvae. IHAT; *An.*-Hb ●, IFAT; frozen section of *An.* larva □, *An.* BW-ag. ○, *An.* Cuti-ag. △

蛍光を発しているが (Fig. 3a), 抗血清の希釈を上げ, 終点と判定される段階になると“円環状”にゲル周辺のみで蛍光がみられるようになった (Fig. 3b). 判定に際して, BW 抗原や横断切片で見られたような部位による蛍光の強さの差は殆んどなく均一で, 主観の入る余地は少ないと思われた。

2) アニサキス幼虫ヘモグロビン結合 Sepharose 抗原の反応性

以上に述べた如く, Sepharose が可溶性抗原の支持体として適していると思われたので, An-Hb 結合 Seph-抗原を作製し, BW 抗原や IHAT 力価との関係を検討してみた (Fig. 4 A~D). AおよびBの家兎は経口感

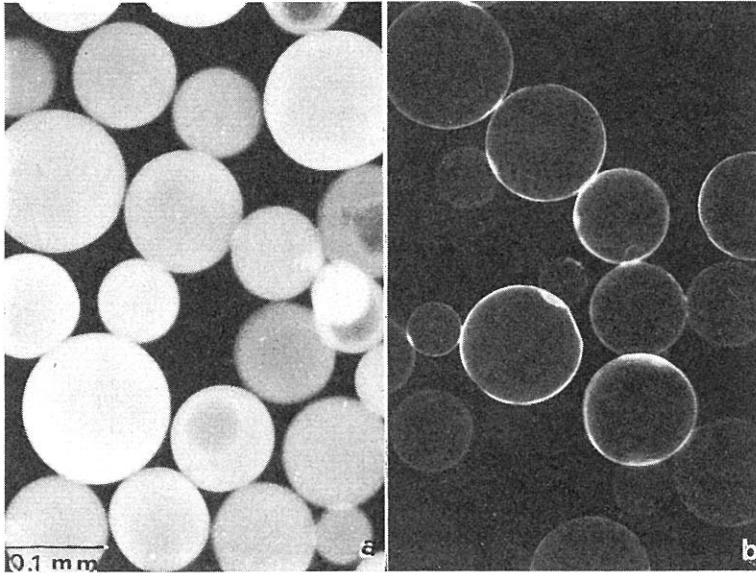


Fig. 3 Positive patterns of the Seph-ag. coupled with *An*-Hb. a) With high titer serum: The gel beads fluoresced like as "full moon" b) With low titer serum: A dim fluorescence is seen along the margins of the gel beads.

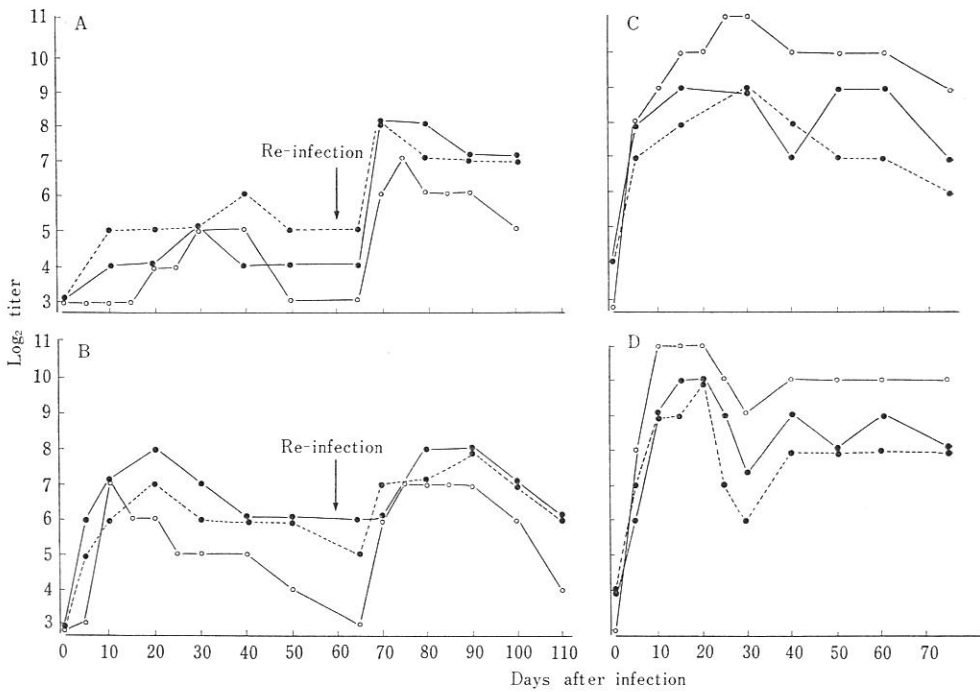


Fig. 4 Differences of the IHAT and IFAT titers in 4 rabbits exposed to 25 *Anisakis* larvae by different infection routes. IHAT titer; *An*-Hb ○—○, IFAT titer; *An*. BW-ag. ●·····●, Seph-ag. ●—●, Rabbits infected with *An*. larvae orally (A, B), intraperitoneally (C) and subcutaneously (D).

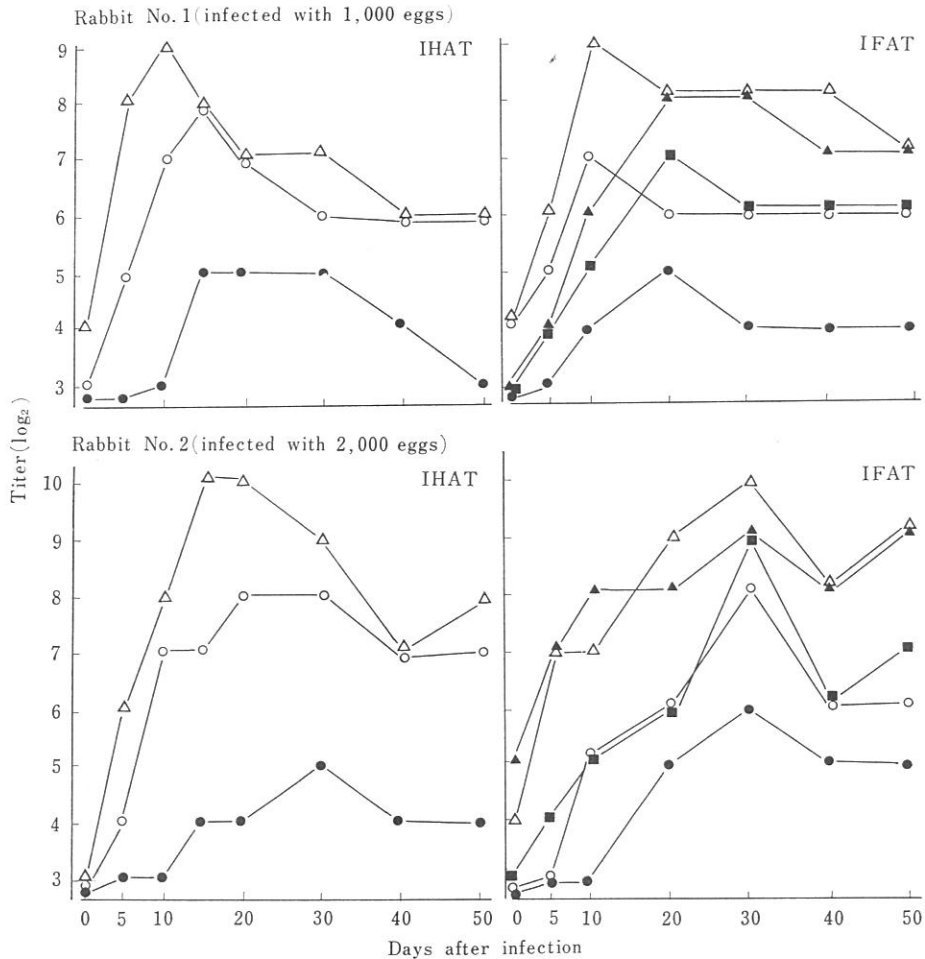


Fig. 5 Antibody levels estimated by the IHAT and IFAT against various type of homologous and heterologous antigens in the sera from rabbits infected respectively with 1,000 and 2,000 eggs of *Ascaris suum*. IHAT; *An*-Hb ●, *An.* crude ○, *As.* crude ▲, IFAT; Seph-ag. (*An*-Hb ●, *An.* crude ■, *As.* crude ▲), BW-ag. (*An.* ○, *As.* △)

染を行なつたもので、IHAT 値はAにおいては初感染後の力価上昇は顕著でなかつたが、再感染によつてかなりの高力価を示した。一方、Bでは初感染、再感染後の反応には大差がなかつた。BW, Seph. 抗原に対するIFAT 値は、A、BともにIHAT 値とほぼ対応した変動を示し、Aの初感染後の反応においてBW 抗原がSeph. 抗原よりも高い値を示したほかは、全般にSeph. 抗原の方がBW 抗原使用時よりも高い抗体価を示した。Aの初感染後の弱い反応においてのみBW 抗原がSeph. 抗原よりも高い値を示したことは、BW 抗原では被検血清濃度の高い際にしばしば非特異的の反応がみられることが原因していると思われた。CおよびDは幼虫

をそれぞれ腹腔内と皮下に埋没感染させた家兎血清について検討した結果であるが、この場合にはIHAT 値は感染5日後には確実に上昇し、IFAT 値はIHAT 値に比較して全般にやや低い値ではあるがIHAT 値の変動に対応した動きを示した。この場合にもSeph. 抗原の反応性はBW 抗原に比べてやや良好であつた。これはSeph. 抗原の判定基準が単純であるのに対して、BW 抗原では形が多様で、判定がかなり大まかで厳密さを欠くためと考えられた。しかし、この両種抗原によつて測定した抗体価には決定的な差は認められなかつた。IHAT 値とIFAT 値との関係については両者の実験手技が異なるために厳密な比較はできないが、抗体価の低い血清

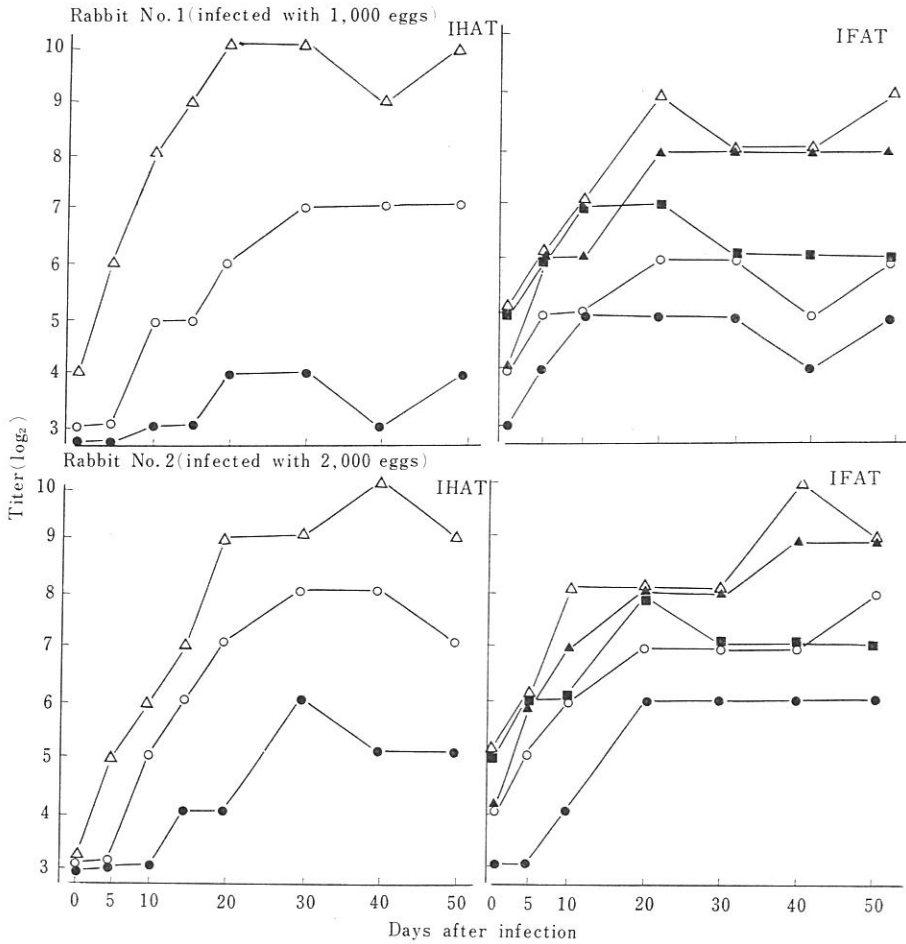


Fig. 6 Antibody levels estimated by the IHAT and IFAT against various type of homologous and heterologous antigens in the sera from rabbits infected respectively with 1,000 and 2,000 eggs of *Toxocara canis*. IHAT; An-Hb ●, An. crude ○, Tc. crude △, IFAT; Seph-ag. (An-Hb ●, An. crude ■, Tc. crude ▲, BW-ag. (An. ○, Tc. △)

では IFAT 値が IHAT 値よりも高いのに対し、高抗体価の血清では IHAT 値の方がやや高かった。これは IFAT 抗原に若干の非特異抗体が結合するためと考えられる。

### 3) アニサキス幼虫ヘモグロビン結合 Sepharose 抗原の特異性

上述のように An-Hb 結合 Seph. 抗原はアニサキス感染家兎血清で BW 抗原や凍結切片抗原に匹敵するか、むしろそれ以上の反応性を有することが示された。An-Hb はアニサキス幼虫に特異的な抗原と考えられているので (鈴木 1968, 鈴木ら 1969, Suzuki *et al.* 1971), An-Hb 結合 Seph. 抗原は IFAT においても

高い特異性を有するものと予想され、この点を検討するためにブタ回虫およびイヌ回虫感染家兎血清についても IFAT を行なった (Fig. 5, Fig. 6)。Fig. 5 はブタ回虫仔虫包蔵卵 1,000 個或いは 2,000 個感染させた家兎血清について経日的に IHAT, IFAT を実施した結果である。IHAT は感染血清に対応するブタ回虫の粗抗原と非対応の An-Hb, 更に比較のためにアニサキス幼虫粗抗原について行ない、一方、IFAT は対応抗原としてブタ回虫の BW 抗原と粗抗原結合 Seph. 抗原、また、非対応抗原では An-Hb 結合 Seph. 抗原のほか比較のためにアニサキス BW 抗原と粗抗原結合 Seph. 抗原を用いた。IHAT 値についてみるとアニサキス粗

抗原では対応ブタ回虫抗原に比べて常に低い値ではあつたが、相当の交差反応が認められたのに対して、An-Hb 抗原はかなり低い値であつた。IFAT 値においても同様で、アニサキス抗原では BW 抗原、粗抗原結合 Seph. 抗原ともに交差反応に基く高い値を示し、著しい場合には対応抗原と同値を示すこともあつた。しかし、An-Hb 結合 Seph. 抗原では反応はかなり弱く、高い値でも $2^3 \sim 2^6$ 程度であり、IFAT では正常血清においても常に $2^3 \sim 2^4$ 程度の非特異反応を含むという点を考慮に入れば、交差反応自体はそれ程大きな値とは考えられなかつた。Fig. 6 は同様の検討をイヌ回虫感染家兎血清について行なつたもので、この場合にもブタ回虫感染血清について得られた結果とほぼ同じであつた。イヌ回虫感染血清に対しては、アニサキス粗抗原自体がブタ回虫感染血清に対して示したほどの交差反応を IHAT, IFAT のいずれにおいても示さず、したがつて、アニサキス BW 抗原や粗抗原結合 Seph. 抗原と An-Hb 結合 Seph. 抗原との間に認められた差はブタ回虫感染血清の場合よりも少なかつた。

#### 考 按

アニサキス幼虫を IFAT 抗原として使用する際、幼虫全体を固定して抗原とする Sadun *et al.* (1962) の方法は幼虫が大きすぎるため適当ではない。したがつて、今回は Le Viguelloux *et al.* (1972), Sulzer (1965) の方法に準拠して破壊虫体 (BW 抗原) と、それを更に消化して得た角皮 (Cuti. 抗原) のほかに、著者らの考案した虫体抽出抗原を Sepharose に結合したもの (Seph. 抗原) の 3 種抗原について IFAT を行なつた。BW 抗原は特異蛍光を発することから抗体との結合が証明されたが、Cuti. 抗原を用いた際には殆んど蛍光抗体の結合が認められないか、または極めて微弱で、Sulzer (1965), Kozar *et al.* (1966), Wegesa *et al.* (1971) が旋毛幼虫を用いて行なつた成績とは著しい違いを示した。さきに著者らがアニサキス幼虫の角皮より抗原物質を抽出する実験を行なつた際、普通、角皮といわれる部分は数層から成つており、いずれの層でも抗原性は他の組織に比べて著しく低いが、そのうちでも緻密な構造から成る最外層からは、いかなる処理によつても抗原物質を抽出することは不可能であつた (白木ら 1973b)。このように角皮本来の抗原性の低さに加え、ペプシンによる長時間の消化が抗原活性を更に低下せしめたと考えられるが、この抗原性の低さは単に技術的な差にもとづくものであるのか、寄生虫種の違いによるものであるのか今後検討する

必要がある。BW 抗原は Baratawidjaja *et al.* (1963), Mantovani *et al.* (1967), Le Viguelloux *et al.* (1972) が用いたと基本的に同じタイプの抗原であるが、著者らは虫体の破壊後、これを 10%ホルマリン+0.5% BSA 固定は行なわず、凍結乾燥して $4^{\circ}\text{C}$ で保存しておいたものを使用に際して $4^{\circ}\text{C}$ アセトンで固定した。著者らはアニサキス幼虫の凍結切片抗原を 10%ホルマリンで固定すると、その抗原性がすみやかに失われる成績 (白木ら 1973a) を得ており、ホルマリン固定後の虫体片がなお十分な抗原性を保持しているかどうかについて疑問を抱いている。BW 抗原において反応性の極めて強い部分は虫体の内部組織、特に筋層などであり、角皮部分は殆んど蛍光がみられず、Ruitenber (1970) がアニサキス幼虫の凍結切片抗原で角皮に特異蛍光がみられたという所見と異なる成績を得た。BW 抗原は 20%浮遊液として、0.3ml の被検血清量に対して 0.05ml づつ反応させた場合には凍結切片抗原を用いて測定した IFAT 値とほぼ等しい抗体価を示し、反応性という点では凍結切片法との優劣はつけ難いと思われた。しかし、凍結切片法では被検血清の各希釈倍数に応じて多数の切片を製ししなければならない。また、抗原の長期間の保存がきかず、アニサキス幼虫の如く時期によつては入手困難な寄生虫を取扱う場合に不便な面が多い。実験操作においても、この方法は全操作をスライドガラス上で行なうため手技が煩雑となり、1枚のスライド上に載せられる切片数にも限界があるため、検査血清の希釈系列について 1枚のスライド上で連続的に蛍光発生の度合を検討することができず、判定に際してかなりの主観的要素の入る危険性を含んでいる。また、被検血清と抗原量を厳密に規定することができず、定量的実験においてはその都度結果に違いを生ずる恐れがある。以上の諸点を考え合せると、今回著者らの用いた BW 抗原は凍結切片抗原に比べかなりの利点有しているものと思われた。しかしながら、この BW 抗原も他のタイプの抗原と同様に複雑な抗原組成を有した複合抗原であり、交差反応の極めて多い寄生虫症においてはその抗原を用いての IFAT の診断的価値は必ずしも高いとは判断されなかつた。そこで著者らは、これまでに報告されていない新しいタイプの IFAT 抗原として Seph. 抗原を考案した。可溶性の寄生虫抗原をセルローズアセテート膜に吸着させ、IFAT 抗原として使用するという試みは既にいくつか報告されているが (Toussaint & Anderson 1965, Toussaint *et al.* 1965, Toussaint 1966, Sadun 1968, Sadun

& Gore 1967, Duxbury & Sadun 1967, Gore & Sadun 1968, Gore *et al.* 1970), セルロースアセテート膜自体, 抗原物質と何ら化学的に結合する特性をもった支持体ではないため, 抗原物質と同様に蛍光抗体液も吸着され, 洗浄に際しては抗原と結合した蛍光抗体と非結合蛍光抗体とが同時に洗い流されるし, 洗浄回数を少なくすれば非特異的蛍光が残るといふ不都合がある。それで可溶性抗原を用いる方法では, 支持体と抗原蛋白との間に強固な化学的結合が起り, 多少の操作によつてこの結合が解離しないこと, 二次的に加えられた蛋白質の支持体への物理的吸収が少ないか, 吸収されたとしても洗浄によりすみやかに除去できること, 更に支持体へ抗原を結合させることによつて抗原性に大きな影響を与えないことなどの条件が要求される。そうした要求を満たすものとして Porath *et al.* (1967) が報告した CNBr 活性化 Sepharose が最適と考えられ, これにアニサキス幼虫の特異抗原として抽出した An-Hb を化学的に結合させたものを IFAT 抗原として使用してみた。この Seph. 抗原は対応するアニサキス幼虫感染血清に対して十分な抗原性を発揮し, 等濃度浮遊液で使用した場合には BW 抗原で得られた IFAT 値と同程度かむしろそれより高い値を示した。一方, 非対応のブタ回虫, イヌ回虫感染血清に対する反応はいずれも BW 抗原と比較して弱く, したがつて, BW 抗原でみられた交差反応をこの Seph. 抗原ではかなり除外できたものと考えられた。この抗原は BW 抗原と同様に浮遊液として使用するため, 既述した如く実験手技, 抗原の保存, 結果の客観性などの点において多くの利点を有し, 更に粒子が比較的均一であり, BW 抗原のように抗原粒子の大きさや形に多様性をもたないので判定する際の基準がかなり単純化でき, 判定が容易であつた。Sepharose は任意の蛋白抗原を粒子表面に結合させることが可能であり, 精製した特異抗原を用いることによつて, これまでに報告されたいろいろなタイプの抗原よりも, 特異性の高い IFAT 値を求めることができるので, 今後, 各種寄生虫症の免疫学的診断において IFAT を応用する場合, 極めて診断的価値が高いと判断された。

#### まとめ

アニサキス症の免疫学的診断に資するため, アニサキス幼虫を用いて取扱いが簡便で, しかも特異性の高い蛍光抗体法抗原の作製法を検討してみた。

1) アニサキス幼虫をペプシンで消化して得た角皮抗原は抗原性に乏しく, 抗原としては不適當であつた。

2) 一方, 体壁抗原あるいは幼虫のヘモグロビンを結合させた Sepharose 抗原は十分な反応性を示し, 蛍光抗体法抗原として適當であつた。

3) とりわけ, Sepharose 抗原は任意の特異的抗原物質に対する反応のみを測定することが可能で, BW 抗原よりも特異性の高い結果を得ることができた。

4) これらの抗原は長期間にわたる保存が可能で, 実験手技にも煩雑な要素が少なく, しかも判定にかなりの客観性をもたせることができた。また, 反応性の点においても抗原濃度が適當であれば凍結切片法を用いて得た結果とほぼ等しい抗体価が得られた。

稿を終るにあたり, 多大の実験材料を提供して下さいました札幌医大第1外科浅石和昭氏および西野千郷氏に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Baratawidjaja, R. K., and Labzoffsky, N. A. (1963): Fluorescent antibody staining in the serodiagnosis of trichinosis. *Canad. J. Micro.*, 9, 625-628.
- 2) Bisseru, B., and Woodruff, A. W. (1968): The detection of circulating antibody in human *Toxocara* infections using the indirect fluorescent antibody test. *J. Clin. Path.*, 21, 449-455.
- 3) Brzosko, W., Gancarz, Z., and Nowoslawski, A. (1965): Immunofluorescencjaw diagnostyce serologiczenj wlosnic. *Med. Dosw. Mikrob.*, 17, 4, 325-332.
- 4) Duxbury, R. E., and Sadun, E. H. (1967): Soluble antigen fluorescent antibody (SAFA) test from human filariasis. *Exp. Parasit.*, 20, 77-82.
- 5) Gore, R. W., and Sadun, E. H. (1968): A soluble antigen fluorescent antibody (SAFA) test for the immunodiagnosis of trichinosis in man and experimental animals. *Exp. Parasit.*, 23, 287-293.
- 6) Gore, R. W., Sadun, E. H., and Hoff, R. (1970): *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*: Soluble antigen fluorescent antibody test. *Exp. Parasit.*, 28, 272-279.
- 7) Kozar, Z., Karmanska, K., and Kozar, M. (1966): Indirect fluorescent antibody test with isolated *Trichinella spiralis* larvae. *Wiad. Parzyt.*, 12, 637-642.
- 8) Le Viguelloux, J., Alause, P., Jan, C., Laban, P., and Doury, J. C. (1971): Indirect immunofluorescence test on homogenized *Schistosoma mansoni* adult worms. I. Its technique



- and its value. *Trop. Dis. Bull.*, 69, 117-118.
- 9) Mantovani, A., and Sulzer, A. J. (1967) : Indirect fluorescent antibody technique for diagnosis of canine filariasis. *Amer. J. Veter. Res.*, 28, 351-354.
  - 10) Mitchell, J. R. (1964) : Detection of *Toxocara canis* antibodies with the fluorescent antibody technique. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117, 267-270.
  - 11) Muller, R. (1970) : *Dracunculus medinensis* : Diagnosis by indirect fluorescent antibody technique. *Exp. Parasit.*, 27, 357-361.
  - 12) Porath, J., Axen, K., and Ernback, S. (1967) : Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature*, 215, 1491.
  - 13) Ruitenbergh, E. J. Kampelmacher, E. H., and Berkvens, J. (1968) : The indirect fluorescent antibody technique in the serodiagnosis of pigs infected with *Trichinella spiralis*. *Heth. J. vet. Sci.*, 1, 143-153.
  - 14) Ruitenbergh, E. J. (1970) : Anisakiasis : Pathogenesis, serodiagnosis and prevention. *Tesis, Rijks Inst.*
  - 15) Sadun, E. H., Anderson, R. I., and Williams, J. S. (1962) : Fluorescent antibody test for the serological diagnosis of trichinosis. *Exp. Parasit.* 12, 423-433.
  - 16) Sadun, E. H., and Gore R. W. (1967) : Relative sensitivity and specificity of soluble antigen (metabolic and somatic) and whole cercariae in fluorescent antibody test for schistosomiasis in human and rabbits. *Exp. Parasit.*, 20, 131-137.
  - 17) 白木公・鈴木俊夫・大鶴正満・佐藤良也・監物実・浅石和昭(1973a) : 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.
  - 18) 白木 公・鈴木俊夫・大鶴正満・佐藤良也・監物実・浅石和昭(1973b) : 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. 寄生虫誌, 22, 141-145.
  - 19) Sulzer, A. J. (1965) : Indirect fluorescent antibody test for parasitic diseases. I. Preparation of a soluble antigen from larvae of *Trichinella spiralis*. *J Parasit.*, 51, 717-721.
  - 20) 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.
  - 21) 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, 232-239.
  - 22) Suzuki, T., Shiraki, T., and Otsuru, M. (1971) : Immunodiagnosis of anisakiasis, with special reference to purification of specific antigen. *Chinese J. Microb.*, 4, 217-231.
  - 23) Toussaint, A. J., and Anderson, R. I. (1965) : A soluble antigen fluorescent antibody technique *Appl. Microb.*, 13, 552-558.
  - 24) Toussaint, A. J., Tarrant, C. I., and Anderson, R. I. (1965) : An indirect fluorescent antibody technique using soluble antigen for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113, 394-397.
  - 25) Toussaint, A. J. (1966) : Improvement of the soluble antigen fluorescent antibody procedure. *Exp. Parasit.*, 19, 71-76.
  - 26) Wegesa, P., Sulzer, A. J., and Orden, A. V. (1971) : A slide antigen in the indirect fluorescent antibody test for *Trichinella spiralis*. *Immunology*, 21, 805-808.

**Abstract**INDIRECT ELUORESCENT AMTIBODY TEST FOR DIAGNOSIS OF ANISAKIASIS  
(1) PREPARATION OF ANTIGENS

Yoshiya SATO, Toshio SUZUKI, Takao YAMASHITA, Tadashi SHIRAKI,  
Hiroho SEKIKAWA and Masamitsu OTSURU  
(Department of Medical Zoology, Niigata University  
School of Medicine, Niigata, Japan)

In an attempt to obtain the suitable antigen for the indirect fluorescet antibody test for anisakiasis, 3 types of antigens were prepared from *Anisakis* larvae and compared with each other with respect to the specificity, sensitivity and reproducibility. These antigens included: (1) Homogenates of the larvae (Bw-ag) prepared by the method described by Le Viguelloux (1971). (2) Cuticular fragments (Cuti-ag) obtained by the pepsin-digestion of homogenized larvae. This procedure was originally reported by Sulzer (1965). (3) Soluble antigen coupled with agarose beads (Seph-ag). The coupling technique was devepoled as a means for converting protein into insoluble form by Porath *et al.* (1967).

The results obtained on sera from rabbits infected with *Anisakis*, *Ascaris suum* and *Toxocara canis* are summarized as follows:

(1) In the test using Cuti-ag, any conclusive result to evaluate its usefulness was not obtained, since a dim fluorescence was observed only with high titer sera.

(2) By the test with BW-ag, the considerable sensitive reaction was observed with sera of rabbits exposed to *Anisakis* larvae, but the obvious cross-reactions with other nematode infections also occurred.

(3) Employing the Seph-ag coupled with a purified *Anisakis* hemoglobin which was recognized formerly as a specific antigenic component of *Anisakis* larvae (Suzuki 1968; Suzuki *et al.* 1969, 1971), the specific reactions were observed.

(4) From the results obtained in the present study, therefore, it was considered that the fluorescent antibody test system with Seph-ag was most useful for the diagnosis of anisakiasis, and that the technique might be also successfully applied to other infectious diseases.