

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 immunoadsorbent
を用いた非特異成分の吸収除去について

佐藤 良也 鈴木 俊夫* 白 木 公
山下 隆夫 大鶴 正満

新潟大学医学部医動物学教室

(昭和49年7月12日 受領)

緒 言

さきに著者らは、アニサキス幼虫の特異的抗原物質として幼虫固有のヘモグロビンに着目して、その分離精製を行ない(鈴木, 1968; 鈴木ら, 1969), これを用いて術後アニサキス症と確認された患者やアニサキス症多発地帯の一般住民について皮内反応を行なった成績などから、それがかなり特異性の高いものであることを報告してきた(鈴木ら, 1970)。また、この幼虫ヘモグロビンは Sepharose に結合させ蛍光抗体法抗原として使用してもアニサキス幼虫感染血清ときわめて敏感に反応し、非対応のブタ回虫、イヌ回虫感染血清とは弱い交差反応しか示さないことがわかった(佐藤ら, 1973)。

今回は、この幼虫ヘモグロビンの抗原特異性についてさらに実験的に確かめ、同時にその精製過程において Porath *et al.* (1967) によつて考案された immunoadsorbent (CNBr 活性化 Sepharose 4B) を用いて非特異成分の除去を試みたので報告する。

材料方法

1) 実験材料

a) 虫体の採取

アニサキス I 型幼虫 (*Anisakis type I larva*; Berland, 1961), ブタ回虫 (*Ascaris suum*) およびイヌ回虫 (*Toxocara canis*) の 3 種寄生虫を用いた。アニサキス幼虫は北海道産スケソウダラの内臓より、ブタ回虫とイヌ回虫はそれぞれブタおよびイヌの消化管内より得た。

b) 虫体全抽出液

虫体全抽出液の作製は既報の如く(佐藤ら, 1974), 磨

碎した虫体の凍結乾燥粉末に 4°C のアセトンを加えて脱脂後、リン酸緩衝食塩水 (PBS), pH 7.2 を用いて 4°C, 48 時間スターラーで攪拌抽出した。

c) 虫体抽出液に対する抗血清

各寄生虫体抽出液に対する抗血清は体重 2.5kg 程度の 3 羽の家兔を免疫して作製した。各虫体抽出液の 1 ml (蛋白量 10~20mg) に等量の Freund's complete adjuvant (Difco) を混和し、家兔の背部、下腿の皮下または筋肉内の十数カ所に少量ずつ接種した。この操作は 4~5 日間隔で 4 回行ない、最終接種後 10 日目に頸動脈より全採血して血清を分離した。この血清に等量の PBS を加えて希釈したあと、総量と等しい量の飽和硫酸を加えて 50% 飽和とし、沈澱した粗グロブリンを大量の PBS に 3 日間透析したあと、凍結乾燥して -20°C に保存した。

d) 感染血清

各寄生虫感染家兔血清の作成法は既に報告した如く(佐藤ら, 1973), 体重約 2.5kg の家兔 3 羽を用いた。アニサキス幼虫の感染は 1 羽の家兔に幼虫を 25 隻経口投与した。ブタ回虫、イヌ回虫の場合、雌成虫の子宮内より採取した受精卵を 0.1N 硫酸溶液中で 25°C, 40 日間培養した仔虫包蔵卵をそれぞれ 1 羽の家兔に 2,500 個ずつ経口投与して感染させた。これらの家兔は感染前と、感染後 20 日間は 3~5 日間隔、それ以降 40 日間は 7~10 日間隔で採血して血清を採取し、-20°C に保存した。

2) 抗原の精製方法

a) アニサキス幼虫ヘモグロビンの精製

アニサキス幼虫からのヘモグロビン (Hb) の抽出は第 2 報に記載した如く(鈴木ら, 1969), 幼虫を細切して少量の PBS とともに 20,000rpm, 30 分遠心して得た体

(* 秋田大学医学部寄生虫学教室)

腔液を飽和硫酸による塩析法、次いで DEAE-セルローズカラムクロマトグラフィーにより予備精製した粗 Hb (c-Hb) を、さらに調整用ディスク電気泳動法により精製 Hb (p-Hb) とした。

b) immunoabsorbent による非特異成分の吸収

immunoabsorbent には CNBr 活性化 Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals) を用いた。抗体結合 Sepharose カラムの作製およびこれを用いての非特異成分の吸収方法は既報の如く (佐藤ら, 1974), Porath *et al.* (1967) の方法に準拠して行なつた。すなわち、乾燥 Sepharose ゲル 1 g を 0.001 M 塩酸溶液を用いて膨潤、洗浄を行ない、直ちに 0.1M NaHCO₃+0.5M NaCl 溶液中で抗体グロブリン液 (蛋白量 10~20 mg) と混合し、室温下 4 時間反応させた。反応は栓をした試験管内で行ない、時々試験管の上下反転を繰り返してゲルを混和した。反応終了後、ゲルはさらに 1 M のエタノールアミン溶液 (pH 8.0) 30ml と混合し、同様に 1 時間反応させてゲル表面の遊離の結合基を遮へいしてからカラムに充填した。カラムは充填したゲルの高さが 7~10 cm 程度になるようにゲル量に応じて直径をかえた。このカラムに PBS を流して十分に洗浄し、溶出液の OD 280 m μ が 0.04 以下になってから次の吸収操作に使用した。

抗原の採取はまず、このカラムに吸収しようとする抗原液一定量 (蛋白量 5~10mg) を加え、PBS を 1 時間当り 8 ml の割合で流して溶出させた。ゲル表面の抗体と抗原-抗体反応を起こさずに流出してくる成分を OD 280m μ で測定しつつ集め、濃縮してその抗原特異性を検討した。使用後のカラムは氷冷 0.1M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.5) で洗い、吸着した非特異抗原成分を解離除去し、直ちに PBS を流して十分に平衡化した。この操作は十分に冷却した緩衝液を用いて手早く行なえば、ゲルに結合させた抗体の活性をそれほど低下させることなく同一カラムを 4~5 回繰り返し使用することが可能であつた。著者らはカラム全体を氷水中に浸けて冷却できる装置を作製して使用した。

3) 抗原の検定方法

a) Ouchterlony 法および免疫電気泳動法 (IEP)
Ouchterlony 法 (Ouchterlony, 1962) および免疫電気泳動法 (Scheidegger, 1955) はペロナール-塩酸緩衝液に加熱溶解した 1.2% アガロース (Behringwerke) を用いた。IEP は既報の如く 100 V 定電圧で 2 時間行なつた (佐藤ら, 1974)。アニサキス幼虫全抽出液における Hb バンドの同定には IEP の Ossermann 法 (Ossermann,

1960) が用いられた。

b) 間接赤血球凝集反応 (IHAT)

間接赤血球凝集反応は Boyden (1951) によるタンニン酸処理法の変法を用いた。ヒツジ赤血球への抗原の感作方法および抗体価測定法は既に報告した如く (佐藤ら, 1973), 10 万倍タンニン酸溶液で 4 °C, 15 分間処理したヒツジ赤血球 3% 浮遊液に蛋白濃度を 100 μ g/ml に調整した抗原液を等量加え、37 °C, 15 分間抗原感作を行なつた。感染家兎からの血清 0.2ml を PBS で 4 倍に希釈して 56 °C, 30 分非働化したあと、3% 無感作ヒツジ赤血球浮遊液を等量加えて 1 晩吸収を行ない、2 倍連続希釈した血清 0.5ml に 3% 感作赤血球浮遊液 0.05ml ずつ加えて混和し、室温で 4 時間後に凝集の有無を観察した。

実験成績

1) 精製ヘモグロビン (p-Hb) の抗原特異性

a) Ouchterlony 法および免疫電気泳動法による検討
アニサキス幼虫から精製した p-Hb は Ouchterlony 法では、Fig. 1 に示した如く抗-アニサキス免疫血清との

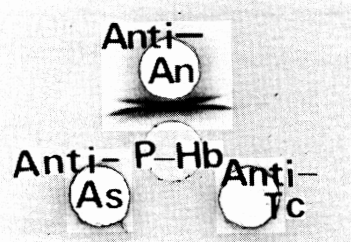


Fig. 1 Ouchterlony plate illustrating the reactivity of purified *Anisakis* larval hemoglobin against homologous and heterologous antisera p-Hb: hemoglobin purified by sequential combination of the salting out with ammonium sulfate, DEAE-cellulose column chromatography and preparative disc electrophoresis; Anti-An, As, Tc: antiserum of rabbit immunized with whole worm extract of *Anisakis*, *Ascaris suum* and *Toxocara canis* respectively.

間に著明な 2 本の沈降線を形成したが、抗-ブタ回虫、抗-イヌ回虫免疫血清との間には沈降線の形成が認められなかつた。この p-Hb の IEP パターンは原点よりも陽極側に同じ易動度をもつ 2 本の沈降線として示され、また Ossermann 法によれば幼虫の全抽出液中でこれと同じ易動度をもつ 3 本の沈降線のうち拡散の遅い成分として示された (Fig. 2)。

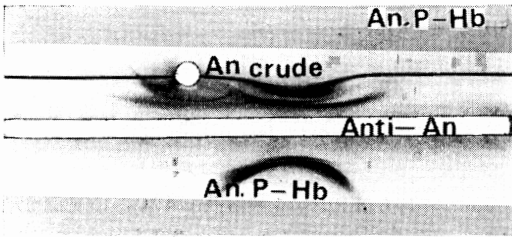


Fig. 2 Immunoelectrophoretic identification of hemoglobin in whole worm extract of *Anisakis* larvae by Ossermann technique

Whole worm extract (An crude) and purified hemoglobin (p-Hb) were added to the central wells. After electrophoresis, the immunoelectrophorogram was developed with rabbit antiserum to whole worm extract (Anti-An, lower trough) and purified hemoglobin (p-Hb, upper trough).

幼虫の全抽出液は抗-ブタ回虫免疫血清との間に5本、抗-イヌ回虫免疫血清とは3本の沈降線を形成したが、これらはいずれも前述のHbと同定した沈降線とは異なるものであった (Fig. 3).

b) 間接赤血球凝集反応による検討

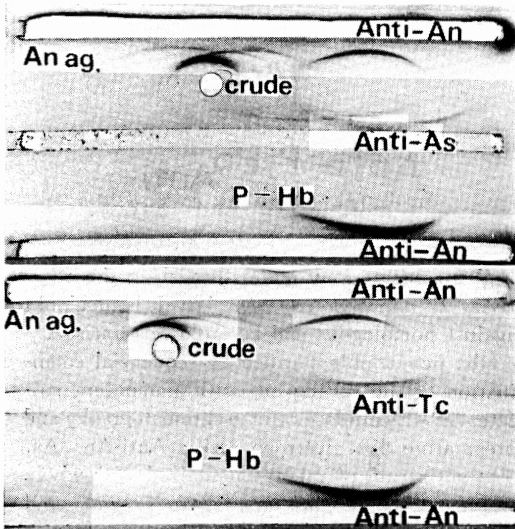


Fig. 3 Immunoelectrophoretic analysis of whole worm extract and purified hemoglobin of *Anisakis* larvae against homologous and heterologous antisera

An ag. crude: whole worm extract of *Anisakis* larvae; p-Hb: purified hemoglobin from *Anisakis* larvae; Anti-An, As, Tc: antiserum of rabbit immunized with whole worm extract of *Anisakis*, *Ascaris* and *Toxocara canis* respectively.

アニサキス幼虫感染家兔血清を用いて IHAT を行ない、幼虫の全抽出液と p-Hb との抗原活性を比較した (Fig. 4). 比較のために感染血清とは非対応のブタ回虫、イヌ回虫全抽出液についても蛋白濃度を対応抗原と同じ100µg/ml に調整して IHAT を行なったが、対応抗原である幼虫の全抽出液と p-Hb はいずれも非対応の全抽出液より良好な反応性を示した. 感染初期においては p-Hb の反応性が全抽出液のそれよりも若干良かったが、この両抗原間には大きな差は認められなかった.

一方、ブタ回虫あるいはイヌ回虫感染家兔血清に対す

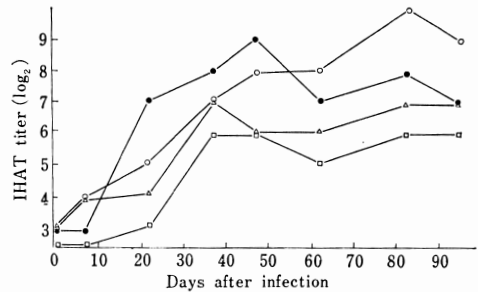


Fig. 4 IHAT titers in the serum of rabbit infected with *Anisakis* larvae against whole worm extracts of *Anisakis* larvae O, *Ascaris suum* Δ, *Toxocara canis* □, and purified hemoglobin from *Anisakis* larvae ●

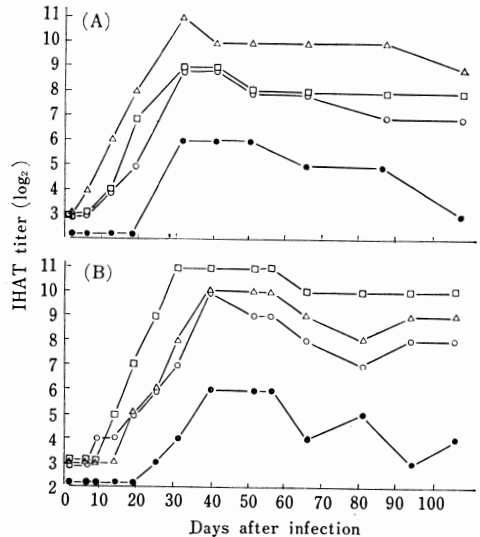


Fig. 5 IHAT titers in the sera of rabbits infected with *Ascaris suum* (A) and *Toxocara canis* (B) against whole worm extracts of *Anisakis* larvae O, *Ascaris suum* Δ, *Toxocara canis* □ and purified hemoglobin from *Anisakis* larvae ●

る p-Hb の反応性について全抽出液と比較した結果が Fig. 5 である。ブタ回虫感染血清において非対応のアニサキス幼虫、イヌ回虫の抗原はいずれも対応ブタ回虫抗原よりは低い値を示したが、全抽出液の場合にはかなりの交差反応が認められたのに対し、p-Hb では対応抗原に対する力価の上昇に対応して多少力価が上昇する傾向が認められるものの、その値はきわめて低いものであった。

イヌ回虫感染血清について得られた結果もブタ回虫感染血清の場合とほぼ同様であり、非対応の抗原であっても全抽出液の場合にはかなりの交差反応が認められたのに対し、p-Hb ではこの交差反応はほとんど除外できた。

2) immunoabsorbent による非特異成分の吸収

a) 全抽出液からの吸収

乾燥 Sepharose ゲル 3g に抗-ブタ回虫家兔免疫グロブリン (蛋白量 50mg) を反応させたカラムにアニサキス幼虫の全抽出液 5ml (蛋白量 5mg) を流して吸収を行なった。Fig. 6 は抗原流入後、PBS で十分に溶出させ、次いで氷冷グリシン-塩酸緩衝液を流して得た蛋白溶出パターンを示したもので、Fig. 7 には PBS に

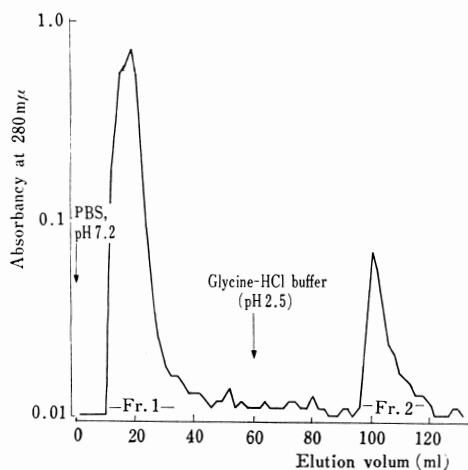


Fig. 6 Elution pattern of whole worm extract of *Anisakis* larvae in affinity chromatography on Sepharose coupled with immunoglobulin of rabbit immunized with whole worm extract of *Ascaris suum*

Fr. 1 was eluted with phosphate buffered saline, pH 7.2 at 20°C, and Fr. 2 was eluted with cold glycine-hydrochloric acid buffer, pH 2.5. The arrows indicate the start of elution with phosphate buffered saline and glycine-hydrochloric acid buffer.

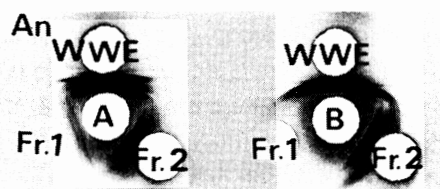


Fig. 7 Ouchterlony plate illustrating the selective removal of cross-reacting components to anti-*Ascaris* antibodies

A: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *Anisakis* larvae; B: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *Ascaris suum*; WWE: whole worm extract of *Anisakis* larvae; Fr. 1: fraction of the 1st step elution with phosphate buffered saline; Fr. 2: fraction of the 2nd step elution with glycine-hydrochloric acid buffer

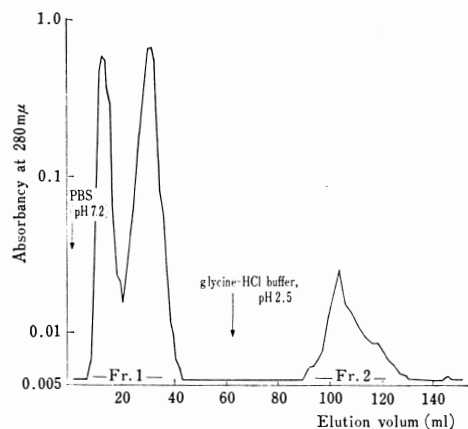


Fig. 8 Elution pattern of whole worm extract of *Anisakis* larvae in affinity chromatography on Sepharose coupled with immunoglobulin of rabbit immunized with whole worm extract of *Toxocara canis*

Fr. 1 was eluted with phosphate buffered saline, pH 7.2 at 28°C, and Fr. 2 was eluted with cold glycine-hydrochloric acid buffer, pH 2.5. The arrows indicate the start of elution with phosphate buffered saline and glycine-hydrochloric acid buffer

よる溶出分画 (Fr. 1) とグリシン-塩酸緩衝液による溶出分画 (Fr. 2) について Ouchterlony 法を行なった結果を示した。Fr. 1 には抗-アニサキス免疫血清と反応する成分は存在するが、吸収前の全抽出液中に存在していた抗-ブタ回虫免疫血清との交差反応成分は除去されており、この成分は Fr. 2 に現れるのがわかる。

イヌ回虫抽出液に対する抗体を結合させた Sepharose カラムによる吸収操作によつて得られた結果もほぼ同様であり、Fig. 8 に示した如く PBS で溶出される分画とグリシン-塩酸緩衝液による溶出分画とを得たが、それぞれについて Ouchterlony 法を行なつた結果 (Fig. 9), 非特異成分は PBS 分画には検出されず、グリシン-塩酸緩衝液による溶出分画に存在していた。

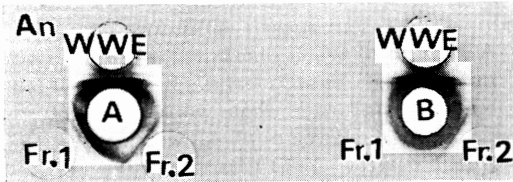


Fig. 9 Ouchterlony plate illustrating the selective removal of cross-reacting components to anti-*Toxocara* antibodies from whole worm extract of *Anisakis* larvae

A: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *Anisakis* larvae; B: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *Toxocara canis*; WWE: whole worm extract of *Anisakis* larvae; Fr. 1: fraction of the 1st step elution with phosphate buffered saline; Fr. 2: fraction of the 2nd step elution with glycine-hydrochloric acid buffer.

それぞれの操作によつて得られた PBS 分画について、アニサキス幼虫全抽出液に対する免疫血清と幼虫感染血清との間の IEP パターンを検討したのが Fig. 10 である。抗-ブタ回虫抗体結合 Sepharose カラムで吸収した試料では、抗-アニサキス免疫血清との間に 5 本、一方、幼虫感染血清との間には 3 本の沈降線が認められ、これらのうち 1 本は前述の Hb と 同定される成分であった。

他方、抗-イヌ回虫抗体結合 Sepharose カラムで吸収した試料では抗-アニサキス免疫血清、幼虫感染血清との間にそれぞれ 8 本と 4 本の沈降線が認められ、これらのうちの 3 本はブタ回虫に対する抗体結合 Sepharose カラムで吸収されなかつた成分の沈降線と一致しており、さらにこの中の 1 本はやはり Hb と 同定された。

b) 粗ヘモグロビン (c-Hb) からの吸収

以上述べた如く、抗-ブタ回虫あるいは抗-イヌ回虫家兎抗体結合 Sepharose カラムを用いて、アニサキス幼虫の全抽出液中よりこれらの抗体と交差反応を示す成分を吸収除去することが可能であった。しかし、幼虫の全抽出液の場合、交差反応を示さない特異成分よりも交

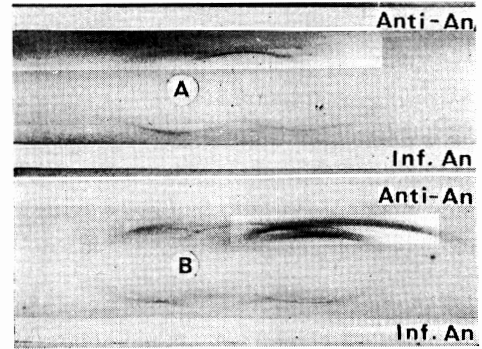


Fig. 10 Immunoelectrophoretic analysis of the absorbed extract of *Anisakis* larvae. Whole worm extract of *Anisakis* larvae was absorbed by the columns of Sepharose coupled with immunoglobulins of rabbits immunized with whole worm extract of *Ascaris suum* (Well A) or *Toxocara canis* (Well B)

Inf. An: serum of rabbit infected with *Anisakis* larvae; Anti-An: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *Anisakis* larvae.

差反応成分の方が多く含まれるため、これらの成分を完全に吸収するためには吸収しようとする抗原の量をかなり制限するか、そうでなければ数度の繰り返し吸収を行なう必要があつた。また、この方法で得られる試料には感染血清との非反応性成分が多く含まれるなどの不備な点もある。

既述の如く、幼虫からの Hb はアニサキス幼虫感染血清との反応性が高く、その精製方法も確立していることから、同様の吸収操作を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで予備精製した c-Hb についても行なつてみた。Fig. 11 はこの c-Hb を抗-ブタあるいは抗-イヌ回虫家兎抗体結合 Sepharose カラムに適用して得られた蛋白溶出パターンを示したものである。いずれの場合にも酸性条件下で溶出される成分 (Fr. 2) は前述の全抽出液を吸収した際のそれに比べて著しく少なかつた。Fig. 12 には各分画について Ouchterlony 法を行なつた結果を示した。PBS 分画 (Fr. 1) には吸収前の c-Hb に認められた非特異成分は存在せず、交差反応成分は 1 回のみの吸収操作により完全に除去することができた。Fig. 13 は吸収前、後の試料について IEP を行ない比較したもので、未吸収 c-Hb には抗-アニサキス免疫血清との間に 5 本の沈降線が形成されたのに対し、これを抗-ブタ回虫抗体結合 Sepharose カラムで吸収した後では Hb と思われる 1 本の沈降線が、また、抗-イヌ回虫抗体結合 Sepharose カラムで吸収した試料では Hb を

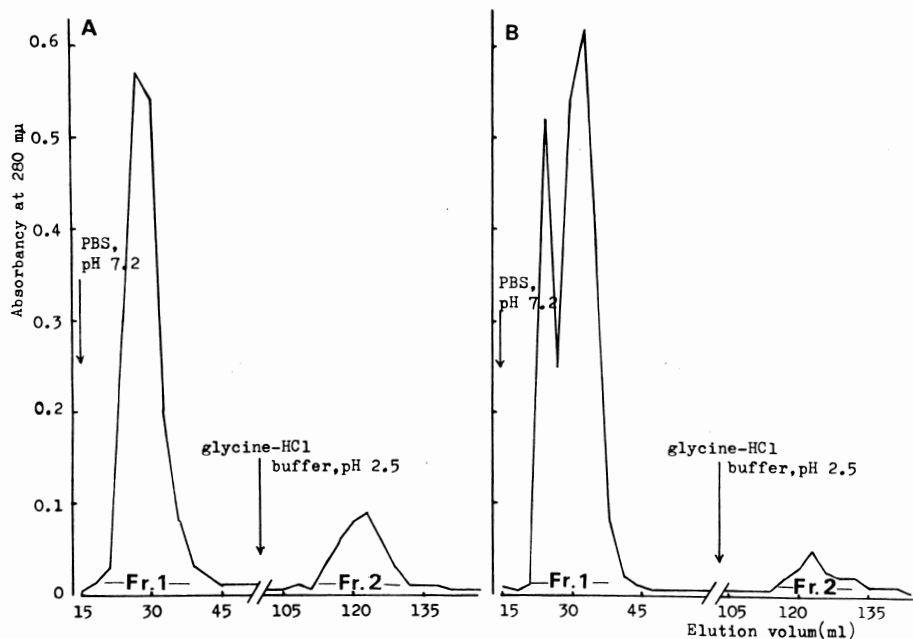


Fig. 11 Elution patterns of crude hemoglobin purified incompletely from whole worm extract of *Anisakis* larvae in affinity chromatography on Sepharose coupled with immunoglobulin of rabbits immunized with whole worm extracts of *Ascaris suum* (A) and *Toxocara canis* (B)

Fr. 1 was eluted with phosphate buffered saline, pH 7.2 at 20°C, and Fr. 2 was eluted with cold glycine-hydrochloric acid buffer, pH 2.5. The arrows indicate the start of elution with phosphate buffered saline and glycine-hydrochloric acid buffer.

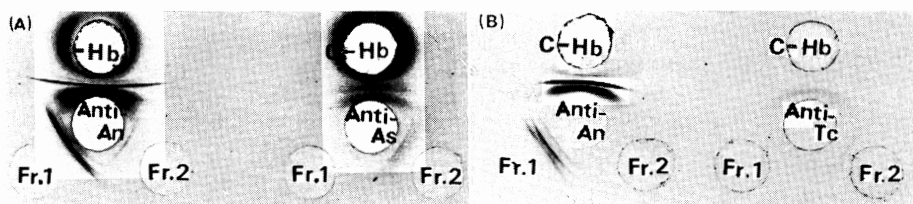


Fig. 12 Ouchterlony plate illustrating the selective removal of cross-reacting components from incompletely purified hemoglobin of *Anisakis* larvae. The hemoglobin preparation was absorbed by the columns of Sepharose coupled with immunoglobulins of rabbits immunized with whole worm extract of *Ascaris suum* (A) or *Toxocara canis* (B)

c-Hb: non-absorbed crude hemoglobin of *Anisakis* larvae; Fr. 1: fraction of the 1st step elution with phosphate buffered saline; Fr. 2: fraction of the 2nd step elution with glycine-hydrochloric acid buffer; Anti-An, As, Tc: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *Anisakis* larvae, *Ascaris suum* or *Toxocara canis* respectively.

含む3本の沈降線が吸収されずに残った。

3) 吸収抗原を用いての間接赤血球凝集反応

前述の如く抗-ブタ回虫あるいは抗-イヌ回虫抗体結合 Sepharose カラムで吸収し、Ouchterlony 法で交差反

応成分の混在が認められなかつた抽出液あるいは c-Hb について蛋白濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ で IHAT を行なつた (Table 1)。対照として吸収前の全抽出液, c-Hb および p-Hb についても同一蛋白濃度で IHAT を実施し

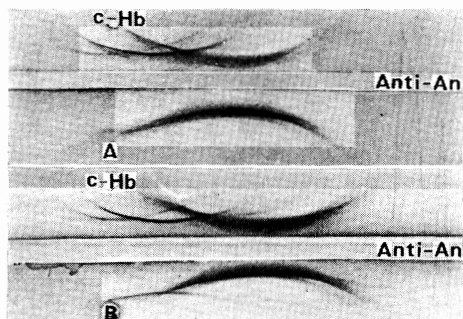


Fig. 13 Comparison of immunoelectrophoretic patterns between non-absorbed crude hemoglobin and the same sample absorbed with columns of Sepharose coupled with immunoglobulins of rabbits immunized with whole worm extract of *Ascaris suum* (Well A) or *Toxocara* (Well B) c-Hb: crude hemoglobin purified incompletely from whole worm extract of *Anisakis* larvae; Anti-An: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *Anisakis* larvae.

た。これらの抗原は対応アニサキス幼虫感染血清に対してはいずれも良好な反応性を示し、未吸収全抽出液の場合でやや低い抗体価が示されたほかは、ほぼ一定した抗体価であった。他方、これらの抗原を非対応のブタ回虫

あるいはイヌ回虫感染血清に反応させた場合、吸収前の全抽出液、c-Hb はいずれも高い値を示したが、吸収後の試料では吸収前のそれに比べ著しく低い値であった。とりわけ吸収後の c-Hb の値は低く、p-Hb と同程度の特異性を示すものであった。

考 按

幼線虫移行症のカテゴリーで総称される疾患の診断には、一般に糞便、喀痰、血液等について通常の寄生虫卵(幼虫)の検査を適用することができない。そのため、免疫学的補助診断法に関する研究が活発に行なわれてきた。しかし、これまでに使用されてきた抗原はそのほとんどが寄生虫体の全抽出液であり、複雑な要素から構成されるそれら抗原によつては、他種寄生虫との交差反応を含む非特異反応が強くなるおそれが多く、抗原の精製が必要と考えられる。アニサキス症においても診断用抗原として特異性の高い成分を単離抽出しようという試みは、著者らによつてこれまで系統的に進められており(鈴木, 1968; 鈴木ら, 1969; Suzuki *et al.*, 1971)、それによるとアニサキス幼虫の体腔液に含まれる遊離の有色蛋白質であるヘモグロビンが実験的アニサキス感染家兎血清とかなり特異的に反応することを認め(鈴

Table 1 Reciprocal of IHAT titers with non-absorbed or absorbed antigens of *Anisakis* larvae to the sera of rabbits infected with *Anisakis* larvae, *Ascaris suum* or *Toxocara canis*

Sera from rabbit	Days after infection	IHAT titers with various type of non-absorbed or absorbed antigens of <i>Anisakis</i> larvae				
		Non-absorbed antigen			*Absorbed antigen	
		WWE	c-Hb	p-Hb	WWE	c-Hb
infected with 25 larvae of <i>Anisakis</i>	20	32	128	128	64 (128)	128 (128)
	40	128	256	256	256 (256)	256 (256)
	60	256	128	256	256 (256)	256 (256)
infected with 2,500 eggs of <i>A. suum</i>	20	32	32	8	8	8
	40	512	256	64	128	16
	60	256	256	32	64	8
infected with 2,500 eggs of <i>T. canis</i>	20	32	64	8	(64)	(8)
	40	1024	512	64	(128)	(16)
	60	512	256	64	(128)	(8)

* Whole worm extract and crude hemoglobin of *Anisakis* larvae were absorbed by the columns of Sepharose coupled with immunoglobulins of rabbits immunized with whole worm extract of *Ascaris suum* (or *Toxocara canis*).

WWE: whole worm extract of *Anisakis* larvae; c-Hb: incompletely purified hemoglobin; p-Hb: purified hemoglobin.

木, 1968), その抽出方法の検討 (鈴木ら, 1969; Suzuki *et al.*, 1971) と, 精製されたヘモグロビンを用いたの皮内反応による疫学調査などが行なわれ (鈴木ら, 1970), アニサキス症の診断用抗原として使用可能であることが示された。今回, Ouchterlony 法や免疫電気泳動法によって検討した結果においても, このヘモグロビンは抗-プタ回虫や抗-イヌ回虫抗血清との間で著明な沈降線を形成せず, アニサキス幼虫に固有の抗原性をもつものであることが示された。しかし, 寒天ゲルを用いた沈降反応は間接赤血球凝集反応などに比較して反応の感受性において著しく劣っており, 高力価血清中の抗体の検出は可能であっても感染初期の抗体価の低い血清では抗体の検出ができないし, また, この方法では抗体価定量も困難であるという点で実用性に欠ける面がある。

本実験では間接赤血球凝集反応のような敏感な方法によつても, このヘモグロビンが十分に高い抗原特異性を発揮するか否かについても検討がなされた。アニサキスの全抽出液では非対応感染血清に対してかなりの非特異的反応がみられたが, 精製ヘモグロビンでは非対応の感染血清に対する交差反応はほとんど除外できたものと考えられた。しかし, これらの感染血清についてそれぞれ対応する抗原の抗体価が感染後次第に上昇するのに対応して, この精製ヘモグロビン抗原の抗体価もやや上昇する傾向にあつたことは, この抗原液中になお若干の交差反応成分が混在していることを示しているものと考えられた。そうした非特異成分が Ouchterlony 法によつて検出されないのは, その量が極めて微量であるためか,あるいは交差反応においては多いと考えられる一価性の抗原物質, すなわち, 非対応の抗-プタ回虫あるいは抗-イヌ回虫抗体に対して1個もしくはごく少数の抗原決定基しか反応できないために, 沈降物を形成し難いような成分の混在などが原因として考えられた。したがつて, この精製ヘモグロビンの抗原特異性をさらに高めるためには適切な吸収処理が必要と思われた。抗原中の非特異成分の吸収除去法として従来用いられてきた方法は抗原液と吸収に用いる抗体液とを最適比の状態に混合し, 生じた沈降物を除去する方法であり, この方法では非特異成分が単一の場合には比較的完全に吸収できても, 数種類の交差反応成分が存在している場合には厳密な意味で最適比を求めることは難しく, したがつて完全な吸収除去を行なうことは不可能と思われる。また, 前述の如く一価性もしくは吸収しようとする抗体との間に反応基をごく少数しかもたないような抗原物質であれば, これを

沈降反応によつて完全に除去することは難しい。さらに, 吸収の目的で加えた抗体側の成分で反応に関与しなかつた成分が吸収後の抗原液中に多量に混入してしまうことから, 間接赤血球凝集反応の如く, 用いる抗原蛋白濃度がある程度厳密に規定される必要のある反応にこれを用いることは適当ではないと考えられる。

以上に述べたような欠点を補う新しい吸収方法として著者らはさきに広東住血線虫全抽出液を用いて抗体結合 Sepharose カラムによる吸収方法を試みた (佐藤ら, 1974)。この方法では吸収に用いる抗体側の成分はすべて Sepharose 粒子表面に強固に結合し, 不溶性となつているため, 吸収に際して沈降物を形成させる必要はなく, 吸収後の抗原液中に抗体側の成分が混入することもない。したがつて, 抗原量に対して抗体量を十分に多くすれば, 非特異成分がたとえ非沈降性の抗原物質であっても完全に吸収できるものと考えられた。

アニサキス幼虫の全抽出液を直接非対応の抗-プタ回虫あるいは抗-イヌ回虫抗体結合 Sepharose カラムで吸収する試みでは, 全抽出液に含まれる交差反応成分が多く, 1回のみでの吸収操作によつて完全に吸収することはできなかつたが, 数回の吸収を繰り返すことによつて抗-プタ回虫, 抗-イヌ回虫抗血清とは反応しない成分のみをとり出すことができた。しかも, これらの試料はヘモグロビンと同定される成分が主であつたが, アニサキス幼虫感染血清とは非反応性の成分も存在していた。他方, まだ若干の非特異成分を含む粗ヘモグロビン試料では同様の吸収操作を1回のみ行なうことによつて完全にその非特異成分を除くことができ, この場合にもヘモグロビンとみなされる成分は吸収されずに残つた。

吸収後の試料を用いての間接赤血球凝集反応において, 全抽出液を直接吸収して得た試料では不十分ながら未吸収の全抽出液に比べて著しく特異性が高められ, 他方, 吸収を行なう前に予備精製した粗ヘモグロビン試料では吸収後には精製ヘモグロビンと同程度の特異性が示された。

これまでのヘモグロビン精製過程において, その最終段階の調整用ディスク電気泳動法は実験室内の手技としても操作が煩雑であり, 特別な実験器具を必要とするなどの点から, 調整用ディスク電気泳動法による精製操作にかわる簡便な手段として, immunoabsorbent を用いた非特異成分除去法が有効であると考えられる。

結 語

アニサキス症の免疫学的診断のための抗原として単離

精製された幼虫ヘモグロビンについてゲル内沈降反応および間接赤血球凝集反応により特異性を調べるとともに、従来の精製過程に新たに immunoabsorbent による非特異成分の吸収除去を加えた精製法について検討を行なった。得られた結果を要約すると次の通りであった。

1) 幼虫の体腔液より予備的に精製された粗ヘモグロビン試料は間接赤血球凝集反応ではまだかなりの交差反応を示した。

2) しかし、調整用ディスク電気泳動法によりさらに精製されたヘモグロビン試料では非対応の感染血清に対する交差反応は極めて微弱であった。

3) 抗-ブタ回虫あるいは抗-イヌ回虫抗体結合 Sepharose カラムによつて、アニサキス幼虫の全抽出液に含まれる交差反応成分の吸収除去を試みたが、得られた試料にはアニサキス幼虫感染血清とは非反応性の成分が含まれることや、未吸収の全抽出液に比べてかなり特異性を高められたとはいえ、まだ若干の非特異成分を含むものであった。

4) 他方、予備的に精製されたヘモグロビンを同様の方法で吸収した結果、交差反応成分は全抽出液を直接吸収した際よりも容易に除去され、得られた試料は高い特異性を示した。

文 献

- 1) Boyden, S. V. (1951) ; The adsorption of proteins on erythrocyte treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.*, 93, 107-120.
- 2) Ossermann, E. F. (1960) ; A modified tech-

- nique of immunoelectrophoresis facilitating the identification of specific precipitin arcs. *J. Immunol.* 83, 93-97.
- 3) Ouchterlony, Ö. (1962) ; Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Prog. Allergy*, IV.
 - 4) Porath, J., Axén, R. and Ernback, S. (1967) ; Chemical coupling of protein to agarose. *Nature*, 215, 1941.
 - 5) 佐藤良也, 鈴木俊夫, 山下隆夫, 白木公, 関川弘雄, 大鶴正満(1973) ; アニサキスの免疫学的診断における蛍光抗体法の応用 I. 抗原の作製法について, *寄生虫誌*, 22, 249-258.
 - 6) 佐藤良也, 鈴木俊夫, 山下隆夫, 関川弘雄, 大鶴正満, 陳秀男, 李松王, 劉国輝(1974) ; 広東住血線虫症の免疫診断に関する研究 4. Immunoabsorbent を用いた抗原の精製. *寄生虫誌*, 23, 42-52.
 - 7) Scheidegger, J. J. (1955) ; Une micro-méthode de l'immunoélectrophoreses. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7, 103-110.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 鈴木俊夫, 白木公, 関野敏, 大鶴正満 (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.
 - 11) 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.

Abstract

STUDIES ON THE IMMUNOLOGICAL DIAGNOSIS OF ANISAKIASIS
IV. ANTIGENIC SPECIFICITY OF HEMOGLOBIN OF *ANISAKIS*
LARVAE AND FURTHER PURIFICATION OF ANTIGEN
USING IMMUNOADSORBENT

YOSHIYA SATO, TOSHIO SUZUKI, TADASHI SHIRAKI, TAKAO YAMASHITA
AND MASAMITSU OTSURU

(*Department of Medical Zoology, Niigata University*
School of medicine, Niigata, Japan)

In the previous informations, the authors indicated that a hemoglobin isolated from perienteric fluid of *Anisakis* larvae showed specific antigenicity, and that it was useful as skin test antigen for anisakiasis.

The present study dealt with further purification by using immunoabsorbent and an extended application of this antigen on other immunologic tests. The results obtained were summarized as follows :

1) When an incompletely purified *Anisakis* larvae hemoglobin which was isolated from perienteric fluid of the larvae by fractionations with ammonium sulfate and DEAE-cellulose column was used as antigen for indirect hemagglutination test, a considerable cross-reaction was observed in sera of rabbits infected with *Ascaris suum* or *Toxocara canis*.

2) Cross-reaction with these heterologous nematode infections, however, were sufficiently diminished by using purified hemoglobin which was further purified by means of preparative disc electrophoresis.

3) In attempts to remove common components sharing with *Ascaris suum* and *Toxocara canis* from whole worm extract of *Anisakis* larvae by the anti-*Ascaris* and anti-*Toxocara* immunoglobulin coupled Sepharose columns, unsatisfactory results were obtained since many non-reacting components were still contained in the sample yielded.

4) Removal of cross-reaction components by using the heterologous antibody coupled Sepharose columns was more easily attained in the incompletely purified hemoglobin than in the whole worm extract, and sample yielded was also shown a highly specific antigenicity.