

最近みられた顎口虫症患者の剛棘顎口虫幼虫抗原を用いた間接蛍光抗体法による検討

近藤力王¹⁾ 赤尾信明¹⁾ 高倉吉正¹⁾
吉村裕之¹⁾ 荒木恒治²⁾ 赤羽啓栄³⁾

(昭和60年3月26日 受領)

Key word: *Gnathostoma hispidum*, gnathostomiasis, immunodiagnosis, indirect fluorescent antibody technique (IFA)

はじめに

近年、輸入ドジョウの生食により、好酸球増多をともなう皮膚線状爬行症を主徴とする患者が、関西地方を中心に日本各地で頻発、報告されている。これら症例の多くは、その特徴ある臨床像と数種の免疫診断法による結果から顎口虫症と診断され（津島ら、1980；北島ら、1981；辻、1981；藤田ら、1982；荒木、1983）、しかも、その病原虫は輸入ドジョウに寄生する剛棘顎口虫 (*Gnathostoma hispidum* Fedtschenko, 1872) の幼虫に起因することが推察されている（赤羽ら、1982；石井、1983）。従来わが国でみられていた顎口虫症は虫体の確認が困難であったことから、診断はもっぱら免疫診断法に依存し、有棘顎口虫、ドロレス顎口虫の幼虫あるいは成虫の抽出抗原による皮内反応、ゲル内沈降反応 (Ouchterlony)、免疫電気泳動法 (IEP)、補体結合反応 (CF test) などが行なわれてきた。

著者らは、最近みられた顎口虫症患者の多くが輸入ドジョウを生食していることから、本症の診断に剛棘顎口虫幼虫を抗原とする間接蛍光抗体法 (IFA) を用い、検討した。

材料および方法

抗原の作製：抗原とした剛棘顎口虫第Ⅲ後期幼虫は、

本研究は昭和59年度文部省科学研究、総合研究A（課題番号 59372001）の補助をうけて行なった。記して謝意を表する。

¹⁾ 金沢大学医学部寄生虫学教室

²⁾ 奈良県立医科大学寄生虫学教室

³⁾ 福岡大学医学部寄生虫学教室

近藤ら (1984 b) の方法により得たものである。この幼虫は採取後 37°C 生理食塩水中に 1~2 時間飼養した後、直ちに 95% エタノールで固定、瀬野尾ら (1977) の方法に準じ JB-4 樹脂に包埋、2 μm の薄切片としたもの (PS) を抗原とした。他方、比較対照のためにドロレス顎口虫 (*G. doloresi*) 幼虫、マンソン裂頭条虫 (*Spirometra erinacei*) プレロケルコイドを、同様の方法で PS を作製し抗原とした。

酵素抗体染色法 (IES)：剛棘顎口虫第Ⅲ後期幼虫 PS 抗原（剛棘顎口虫抗原と略す）の抗原局在性を知るために、赤尾ら (1983) の方法に従って検討した。

間接蛍光抗体法 (IFA)：IFA は Kamiya and Kamiya (1980) の方法に準じ、近藤ら (1984a) に従い抗原の局在と、顎口虫症および顎口虫症が強く疑われた患者（顎口虫症患者と総称する）、マンソン孤虫症患者、および健康人のそれぞれについて、剛棘顎口虫抗原に対する抗体価を調べた。抗体価は被検血清の 2 倍希釈系列で、その反応最大希釈倍数をもって示した。また、ドロレス顎口虫第Ⅲ後期幼虫、マンソン裂頭条虫プレロケルコイドの PS 抗原（ドロレス顎口虫、マ条虫抗原と略す）は、交差反応性を知るために上記方法と同様にして抗体価を求め、比較検討した。

被検血清：

1) 顎口虫症患者血清：臨床所見およびすでに免疫診断法により、顎口虫症と診断された患者 19 名 (Table 1) の血清である。このうち 14 名の患者はいずれもドジョウを生食しており、残りの 5 名は淡水魚およびヘビを生食していた。これら患者のうち No. 1 は病理組織学的に顎口虫の虫体断端がみいだされたものであった。

2) マンソン孤虫症患者血清：すでに虫体が摘出、ある

Table 1 The results of immunodiagnoses on gnathostomiasis patients

No.	Patienti		Locality	ST	DD	IEP	CF	ELISA	IFA titers		
	Age	Sex							G. h.	G. d.	S. e.
1*	54	M	Hamamatsu						1:2 ⁶		1:2 ¹
2	50	M	Kitakyushu	+	+				1:2 ⁹	1:2 ⁶	1:2>
3	33	M	Nara	+	+	+			1:2 ¹⁰	1:2 ⁵	1:2 ²
4	33	M	Nara	+	+	+			1:2 ⁸	1:2 ⁵	1:2>
5	46	M	Nara	+		+			1:2 ⁸		1:2>
6	19	M	Osaka	-		+			1:2 ⁹	1:2 ⁷	1:2>
7	35	M	Osaka	+	+				1:2 ⁵	1:2 ⁸	1:2>
8	46	M	Nara	+	-				1:2 ²		1:2 ³
9	32	M	Nara	-	+	+			1:2 ⁶		1:2>
10	51	M	Nara	+	+	+			1:2 ⁶	1:2 ⁵	1:2 ⁵
11	33	M	Hamamatsu						1:2 ⁹		1:2 ¹
12	47	M	Maebashi						1:2 ¹⁰	1:2 ⁸	1:2>
13	82	M	Nagano						1:2 ⁵		1:2 ¹
14		M	Chiba		+			+	1:2 ⁶	1:2 ⁵	1:2>
15**	58	M	Nagano						1:2 ⁶	1:2 ⁴	1:2 ¹
16**	67	F	Toyama						1:2 ⁴		1:2>
17**	56	M	HongKong	+	+		+		1:2 ⁵	1:2 ⁵	1:2 ¹
18**			HongKong		-				1:2 ⁴		1:2>
19**	47	M	Toyama						1:2 ²	1:2 ⁴	1:2>

ST: Skin test by antigen of *Gnathostoma dorolei*. DD: Ouchterlony technique.

IEP: Immunoelectrophoresis.

G. h.: The advanced third stage larval antigen of *Gnathostoma hispidum*.

G. d.: The advanced third stage larval antigen of *G. dorolei*.

S. e.: The plerocercoid antigen of *Spirometra erinacei*.

*: *Gnathostoma* was found in sectioned subcutaneous tissues.

** : Freshwater fishes (carp or chinese snakehead) or snakes had been eaten raw.

いは病理組織学的検索により虫体が確認され、マンスン孤虫症と診断された患者11名の血清である。

3) 健康人血清: 20歳代の健康女性43名の血清は、本研究の対照血清として用いた。

4) ラット血清: 体重 180~200g の雄ラット (Wistar系) 8頭に、剛棘顎口虫第Ⅲ前期幼虫を経口的に投与し、5週目と22~30週目に採血し、抗原の局在ならびに交差性について検討した。

成 績

1. IES および IFA による剛棘顎口虫抗原の抗原局在部位

剛棘顎口虫第Ⅲ前期幼虫感染後5週目のラット血清を剛棘顎口虫抗原に反応させると、Fig. 1-1にみられる如

く、IES では虫体の断面においては食道部分をはじめ、筋層、体腔内顆粒、側線に抗原性を有することが認められた。しかし、対照では全くそれら部位に反応はみられなかった (Fig. 1-2)。IFA による反応部位は IES による反応部位とはほぼ同様で、食道、側線、体腔内顆粒、筋細胞の体腔側胞体部分および消化管壁に抗原性が認められ、ごく軽度ではあるが角皮にも抗原性があることが認められた (Figs. 1-3, 4)。

2. 剛棘顎口虫、下顎口虫抗原を用いた IFA による、剛棘顎口虫感染ラットの抗体価の比較

Table 2にみられるように、剛棘顎口虫第Ⅲ前期幼虫感染後22~30週目の8頭のラット血清は、剛棘顎口虫抗原に対し平均抗体価 $1:27.3 \pm 6.9$ を示したが、下顎口虫抗原に対するそれは $1:25.1 \pm 1.0$ で、両抗原の間には有意な

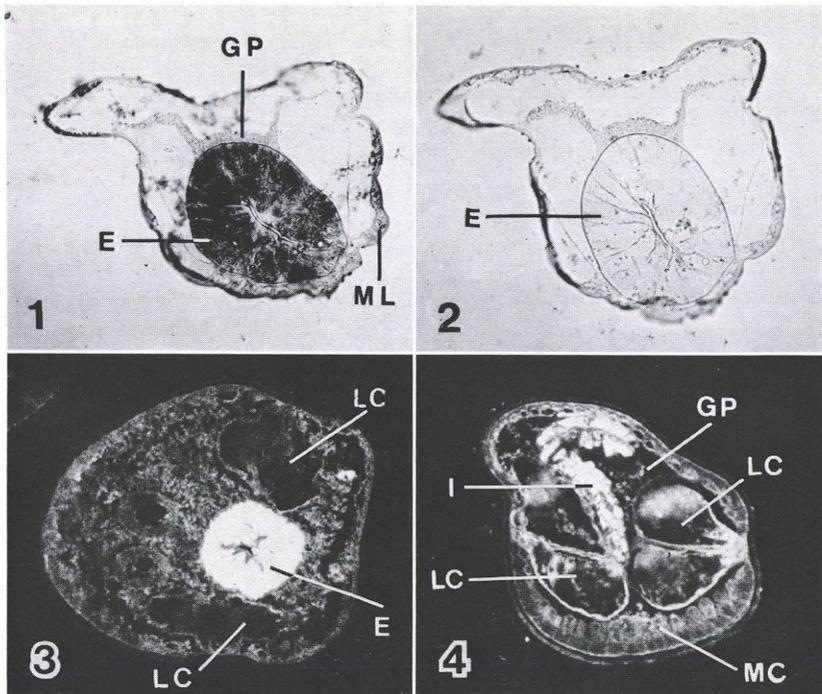


Fig. 1 (1-4) The localizations of antigen in advanced third stage larva of *G. hispidum* by JB-4 plastic sections were seen by means of immunoenzymatic staining and indirect fluorescent antibody technique. Antisera were taken from the rat of 10 weeks after infection.

1. Immunoenzymatic staining: Antigenicities were seen on the esophagus, muscle layer and granules of pseudocoel in the larva.
2. No antigenicities was seen in the larval inner organs by immunoenzymatic staining with the serum of uninfected rat (control).
- 3 & 4. Indirect fluorescent antibody technique: Antigenicities were seen on the esophagus, intestine, lateral chords, granules of pseudocoel and in loculus of the muscle cells in the larva.

E: esophagus I: intestine LC: lateral chord GP: granules of pseudocoel ML: muscle layer MC: muscle cells.

差がみられた ($t=4.51, p<0.01$).

3. 顎口虫症患者の IFA による抗体価

顎口虫症患者19名と、対照としたマンスン孤虫症患者11名および健康人43名の計73名について、剛棘顎口虫抗原に対する抗体価を調べ、その分布を Fig. 2 に示した。顎口虫症患者の個々についての抗体価は Table 1 に示したが、 $1:2^2 \sim 2^{10}$ の間にそれぞれ分布したのに対し、対照としたマンスン孤虫症患者、健康人ではそれぞれ $1:2 > \sim 2^9$ の間に分布した。即ち、これら計73名の抗体価は $1:2^4$ を谷とする二峰性の分布を示し、顎口虫症患者の平均抗体価 $1:2^{6.3 \pm 2.5}$ に対し、対照群のマンスン孤虫症患者、健康人のそれは $1:2^{1.1 \pm 0.9}$ 、 $1:2^{0.5 \pm 0.9}$ と低

く、有意に差がみられた ($t=8.31, 9.41, p<0.01$)。

このうち、ドジョウ生食者14名の抗体価は $1:2^2 \sim 2^{10}$ の間に分布し、平均抗体価は $1:2^{7.1 \pm 2.3}$ であったが、そうでない5名の抗体価は $1:2^2 \sim 2^6$ の間に分布し、平均抗体価 $1:2^{4.2 \pm 1.5}$ であって、明らかにドジョウ生食者の抗体価は高い値を示した ($t=3.18, p>0.01$)。

剛棘顎口虫とド顎口虫の両抗原で、ともに検査できた顎口虫症患者は11名であるが、両抗原に対する抗体価の間には明らかな差がみられなかった (Table 2)。一方、顎口虫症患者19名の剛棘顎口虫抗原とマ条虫抗原に対する平均抗体価は $1:2^{6.3 \pm 2.5}$ 、 $1:2^{0.8 \pm 1.3}$ であって、明らかに剛棘顎口虫抗原に対する抗体価の方が高い値を示し

Table 2 Comparison of IFA titers using *Gnathostoma hispidum* and *G. doloresi* larval PS antigen for sera of patients of gnathostomiasis and of experimentally infected rats with *G. hispidum* larvae

Sera	No. of cases	IFA titers		Probability*
		G. h.	G. d.	
Patients of gnathostomiasis	11	1 : 2 ^{6.9±2.5}	1 : 2 ^{5.6±1.4}	No significant
Rats infected with <i>G. hispidum</i> larvae	8	1 : 2 ^{7.3±0.9}	1 : 2 ^{5.1±1.0}	Significant

PS: JB-4 plastic section. * Paired-sample *t*-test is used, $P < 0.01$.

G. h.: The advanced third stage larval antigen of *Gnathostoma hispidum*.

G. d.: The advanced third stage larval antigen of *G. doloresi*.

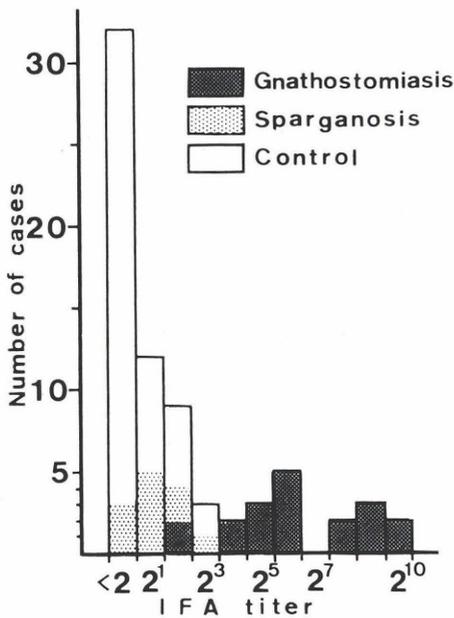


Fig. 2 Frequency distribution of IFA titers of 19 gnathostomiasis, 11 sparganosis patients and 43 control human sera.

Antigen: The advanced third stage larvae of *Gnathostoma hispidum*.

た ($t=9.39, p<0.01$).

考 察

これまでわが国における顎口虫症は、もっぱら有棘顎口虫による症例で、その診断は臨床所見と免疫診断法によって行われたものであった。免疫血清学的検査については、有棘顎口虫、ドロレス顎口虫の成虫や幼虫を抗原とする皮内反応、Ouchterlony法、IEP法、CF testなどがその主なものであった。他方、抗原性に対する検討

もなされ、ドロレス顎口虫、日本顎口虫よりも有棘顎口虫の方がより特異的であることが報告されている（山口, 1951 a, b, 1952 a, b; 江頭, 1951, 1953; 多田ら, 1966; 森下ら, 1969）。ところが、近年みられた輸入ドジョウの生食に起因すると考えられる顎口虫症患者は、ド顎口虫抗原による皮内反応、Ouchterlony法に陽性を示している（辻, 1981; 荒木・森田, 1981; 藤田ら, 1982）が、藤田ら（1982）は Ouchterlony法における他線虫との間に交差反応がみられることも報告している。

今回、著者らは剛棘顎口虫幼虫 IES と IFA による抗原局在部位がほぼ同位置にあることを確認した。従って、剛棘顎口虫抗原による IFA が本症診断の一助となりうると思われた。

剛棘顎口虫抗原に対する顎口虫症患者および対照としたマンスン孤虫症患者、健康人血清（計73名）の IFA 抗体価の分布をみると、1 : 2⁴ を谷とする二峰性の分布を示した（Fig. 2）。この結果から 1 : 2⁵ 以上の抗体価を仮に陽性とするならば、顎口虫症患者19名中15名（78.9%）が 1 : 2⁵ 以上を示したのに対し、対照群のマンスン孤虫症患者、健康人の総てが 1 : 2³ 以下であった。従って、本方法による陽性限界を 1 : 2⁵ とすることが妥当ではないかと考えられた。このことから、ドジョウ生食者14名について 1 : 2⁵ 以上のものは13名（92.9%）と高い陽性率であった。また、初診時血清の抗体価が低い値を示したもので、その後の検査で抗体価の上昇、高値の持続も観察された。

他方、顎口虫症患者のマ条虫抗原に対する抗体価は極めて低い値であったが、ド顎口虫抗原に対する抗体価と剛棘顎口虫抗原のそれとの間に有意の差はみられなかった。しかし、実験的感染ラット血清では剛棘顎口虫とド顎口虫抗原に対する抗体価には明らかな差がみられた。

このことは、人は他種寄生虫をはじめ、種々な抗原に感作されていることも考えられ、実験的感染ラットと違って交差反応がみられたものと思われた。

結 論

近年頻発した顎口虫症患者血清について、剛棘顎口虫第Ⅲ後期幼虫の JB-4 樹脂包埋薄切切片を用い、間接蛍光抗体法 (IFA) による検討を行ない、次の如き結果を得た。

1) 酵素抗体染色法 (IES) と IFA による剛棘顎口虫抗原の抗原局在部位は、両方法とも食道、消化管、側線、体腔内顆粒、筋細胞の体腔側胞体にそれぞれ認められた。

2) 剛棘顎口虫第Ⅲ前期幼虫感染後22~30週目のラット血清では、剛棘顎口虫とド顎口虫抗原とにそれぞれ $1:2^{7.3 \pm 0.9}$, $1:2^{5.1 \pm 1.0}$ と平均抗体価の間に有意な差がみられた。

3) 顎口虫症患者19名と、対照としたマンソン孤虫症患者11名、健康人43名の計73名の剛棘顎口虫抗原に対する IFA 平均抗体価は、顎口虫症患者で $1:2^{6.3 \pm 2.5}$ 、対照群のそれは $1:2^{1.1 \pm 0.9}$, $1:2^{0.5 \pm 0.9}$ であって、顎口虫症患者の方が有意に高い値を示した。また、これら73名の抗体価の分布は $1:2^4$ を谷とする二峰性を示した。一方、顎口虫症患者血清は、ド顎口虫抗原および剛棘顎口虫抗原に対する抗体価には、明らかな差がみられなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたって、顎口虫症患者の血清をお送りいただいた浜松医科大学寄生虫学教室 佐野基人教授、長崎大学医学部医動物学教室 藤田紘一郎教授、群馬大学医学部寄生虫学教室 鈴木 守教授、千葉大学医学部寄生虫学教室 横川宗雄名誉教授、小林 仁博士、横浜市立大学医学部皮膚科学教室 石井則久博士、林 正幸博士、富山県立中央病院外科 辻 政彦博士、富山市民病院皮膚科 松本鎌一博士に厚く謝意を表します。

文 献

- 1) 赤羽啓榮・岩田久寿郎・宮崎一郎 (1982): 中国から輸入されたドジョウに寄生していた剛棘顎口虫 *Gnathostoma hispidum* Fedchenko, 1872. 寄生虫誌, 31, 507-516.
- 2) 赤尾信明・近藤力王至・岡本 敬・吉村裕之 (1983): 犬蛔虫第2期幼虫ES抗原の抗原分析と感染経過中にみられる宿主の抗原認識の変化. 寄生虫誌, 32, 541-548.
- 3) 荒木恒治 (1983): 顎口虫症一臨床面. 寄生虫誌, 32(増), 2.

- 4) 荒木恒治・森田 博 (1981): 輸入ドジョウからの顎口虫症. MEDICO, 12, 1095-5072.
- 5) 江頭正義 (1951): 顎口虫症における皮内反応. 臨床と研究, 28, 220-223.
- 6) 江頭正義 (1953): 有棘顎口虫に関する研究 その2 人体顎口虫症における診断法の研究. 医学研究, 23, 114-122.
- 7) 藤田紘一郎・荒木国典・本井智己・藤田一之・月館説子・小田 力・森 章夫・松田 肇 (1982): 免疫学的に診断された皮膚顎口虫症の最近の1症例. 熱帯医学, 24, 1-7.
- 8) 石井洋一 (1983): 輸入淡水魚由来の顎口虫の形態. 寄生虫誌, 32(増), 4.
- 9) Kamiya, H. and Kamiya, M. (1980): Preliminary application of a formalin fixed tissue section to the indirect fluorescent antibody test and intraovial precipitin reaction for the diagnosis of schistosomiasis japonica. Jpn. J. Vet. Res., 28, 155-160.
- 10) 北島拓弥・島田真路・今野保敏・西脇宗一・宮地純樹・小須田達夫・野坂謙二 (1981): 皮膚顎口虫症一臨床と治療一. 皮膚臨床, 23, 665-672.
- 11) 近藤力王至・赤尾信明・小西喜彦・吉村裕之 (1984a): 実験的幼線虫移行症の研究. (4) 蛍光抗体法および酵素抗体法による犬蛔虫感染家兎における血清免疫グロブリン. 寄生虫誌, 33, 99-104.
- 12) 近藤力王至・赤尾信明・高倉吉正・大西義博・小西喜彦・吉村裕之 (1984b): 剛棘顎口虫 (*Gnathostoma hispidum* Fedtschenko, 1872) の走査電子顕微鏡像. 寄生虫誌, 33, 577-586.
- 13) 森下哲夫・小林端穂・長瀬啓三・西田侑三・岩永 大・鷺見方孝 (1969): 顎口虫皮内反応の非特異性. 寄生虫誌, 18, 120-122.
- 14) 瀬野尾 章・渡辺 斉・土井優子 (1977): 生検組織標本作製法. 臨床検査, 21, 1530-1537.
- 15) 多田 功・川島建治郎・西村謙一・宮原道明 (1966): 日本顎口虫抗原の皮内反応活性について. 寄生虫誌, 15, 196-200.
- 16) 辻 守康 (1981): 皮膚顎口虫症の免疫学的診断. 皮膚科の臨床, 23, 659-663.
- 17) 津島弘文・沼田恒実・山本 治・岩崎晴治・岩永 襄 (1980): 広島市内で感染したと思われる皮膚顎口虫症. 広島医学, 33, 1183-1187.
- 18) 山口富雄 (1951a): 顎口虫症の免疫学的研究第1報 皮内反応 (その1. 幼虫抗原による反応). 久留米医誌, 14, 317-322.
- 19) 山口富雄 (1951b): 顎口虫症の免疫学的研究第1報 皮内反応 (その2. 成虫抗原による反応). 久留米医誌, 14, 323-324.
- 20) 山口富雄 (1952a): 顎口虫症の免疫学的研究第2報 沈降反応. 久留米医誌, 15, 26-28.
- 21) 山口富雄 (1952b): 顎口虫症の免疫学的研究第3報 補体結合反応. 久留米医誌, 15, 29-34.

Abstract

STUDIES ON IMMUNODIAGNOSIS BY INDIRECT FLUORESCENT
ANTIBODY TEST (IFA) USING LARVAL ANTIGEN OF
GNATHOSTOMA HISPIDUM FOR GNATHOSTOMIASIS

KAORU KONDO¹⁾, NOBUAKI AKAO¹⁾, YOSHIMASA TAKAKURA¹⁾,
HIROYUKI YOSHIMURA¹⁾, TSUNEJI ARAKI²⁾ AND HIROSHIGE AKAHANE³⁾

¹⁾Department of Parasitology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa City, Japan;

²⁾Department of Parasitology, Nara Medical University, Kashihara City, Japan;

³⁾Department of Parasitology, School of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka City, Japan)

In recent years, many cases of human gnathostomiasis have been reported in Japan. According to the several Japanese investigators, the larvae of *Gnathostoma hispidum* in the loaches are incriminated as the causative agent of this disease which has been probably occurred by eating raw loaches.

In order to evaluate the sensitivity and specificity of IFA using larval antigen of *G. hispidum* for 19 patients of gnathostomiasis, the study was designed to compare with antibody titers of 11 patients of sparganosis and 43 healthy persons as control. The patients of gnathostomiasis and sparganosis were previously diagnosed by clinical evidences or positive finding in the several immunological tests. The larval antigen made by JB-4 plastic section of the advanced third stage larvae of *G. hispidum* (Gh antigen) was provided for immunoenzymatic staining and IFA.

The results obtained were summarized as follows;

1) The localizations of the antigen in the larva of *G. hispidum* were clearly shown on the esophagus, intestine, lateral chords, granules in pseudocoel and loculus of the muscle cells by means of both immunoenzymatic staining and IFA (Fig. 1).

2) The sera of eight rats experimentally infected with *G. hispidum* larvae were obtained 22 to 30 weeks after infection. The IFA titers of rat sera for Gh and *G. doloresi* (Gd) antigens were $1:2^{7.3 \pm 0.9}$ and $1:2^{5.1 \pm 1.0}$ respectively. There was significant difference in the titer between Gh and Gd antigens (*t*-test, $p < 0.01$).

3) The antibody titers of the patient sera of gnathostomiasis, sparganosis and healthy persons for Gh antigen ranged from $1:<2$ to $1:2^{10}$. The frequencies of the respective titers on these sera revealed a bimodal distribution with a trough at $1:2^4$, and thereby the titers of $1:2^5$ or more was evaluated as positive finding (Fig. 2). Based on the evaluation of the antibody titers, 13 (92.9%) out of 14 patients who had eaten raw loaches were positive, though the sera of sparganosis or healthy persons as controls were negative for Gh antigen. The antibody titers of the sera of gnathostomiasis, sparganosis and healthy persons were $1:2^{6.3 \pm 2.5}$, $1:2^{1.1 \pm 0.9}$ and $1:2^{0.5 \pm 0.9}$ respectively. The titers of the sera of gnathostomiasis were significantly higher than those of sparganosis and healthy persons as controls (*t*-test, $p < 0.01$).

4) No significant difference in cross-reactivity was seen between Gh and Gd antigens in the sera of human gnathostomiasis.

From the results obtained in this study, IFA using the larval antigen of *G. hispidum* seemed to be an useful tool for immunodiagnosis of human gnathostomiasis hispidum.