

# 蠕虫症の血清診断における抗平滑筋抗体による 偽陽性反応について

森田城次 前野芳正 楠原康弘 中村 治 長瀬啓三 中林敏夫

(掲載決定:平成4年7月31日)

## 要 約

寄生虫感染症の免疫血清学的診断時に問題となる交叉反応を解析する目的で、結節性多発性動脈炎 (PN) および慢性肝炎患者血清中から抗平滑筋抗体陽性の20血清を選出し、検討した。被検血清は6種の蠕虫抗原を用いた二重免疫拡散法 (Ouchterlony 法) で20例中10例 (50%) が、ブタ蛔虫、大平肺吸虫、広節裂頭条虫および無鉤条虫切片を基質とした間接蛍光抗体法で、20例すべてが陽性を示した。この間接蛍光抗体法により陽性を示した寄生虫組織部位は、免疫組織化学染色により染色されるアクチン、デスミンおよびビメンチンの組織部位とおよその一致をみた。Immunoblotting 法で被検血清が各種蠕虫抗原に対して示す偽陽性反応について解析し、被検血清および蠕虫症患者血清 (蛔虫、蟯虫、ズビニ鉤虫、有棘顎口虫、肝吸虫、肝蛭、宮崎肺吸虫、広節裂頭条虫、瓜実条虫感染各1名の患者血清) が共通して反応した抗原バンドは、38 k, 43 k 及び 50 k dalton に認められた。また83 k dalton の抗原は慢性肝炎患者血清と蠕虫症患者血清が共通して認識した抗原であった。これらの共通反応性抗原は、抗アクチン抗体、抗デスミン抗体、抗ビメンチン抗体の寄生虫抗原に対する immunoblotting を行った結果、平滑筋の主要構成成分であるアクチン、デスミン、ビメンチンと同じバンド位置に在ることを認めた。以上の成績から被検血清中の抗平滑筋抗体は、上記3種類のサイトスケルトン構成成分に対する抗体を含み、これが蠕虫症の血清診断における偽陽性反応の一因となる事が示唆された。

**Key words :** Cross reaction, Auto-antibodies, Parasitic diseases, Serological diagnosis, Periarteritis nodosa, Smooth muscle

## はじめに

寄生虫感染症、特に蠕虫症の確定診断は虫卵あるいは虫体の確認によるのが通常である。しかし、虫体が幼若期の場合や異所寄生などの場合には、虫卵や虫体の検出ができない事が多い。このような場合には、補助診断法として血清学的診断法が有用である (藤田, 1989; 荒木 1991)。寄生虫学分野においても、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) などの感度の高い検査法が応用され診断率の向上に寄与している。

しかし、蠕虫疾患の血清診断では、他種寄生虫抗原との間に交叉反応が見られるほか、他疾患、例えば結節性多発性動脈炎 (periarteritis nodosa; PN)、潰瘍性大腸炎および肝疾患などでは、一部の血清が寄生虫抗原と偽陽性反応を呈することが問題となっている (田中ら, 1978; 辻ら, 1979; 平井ら, 1981; 伊勢ら, 1981; 竹内・小林, 1987)。その理由の一つとして、使用される抗原が一般に粗抗原であることが考えられる。蠕虫の体組織

の分化や、組織構成成分の宿主生物のそれとの相似性などから、血清診断に有用な特異抗原の特定、分離が十分に達成されていないのが現状といえる。特異抗原の分離については多くの研究がみられるが、最近、井上、辻ら (1992) はゲル濾過法を用いて、犬蛔虫特異抗原の精製を報告している。

蠕虫症の血清診断において、これまで著者らもしばしば他疾患患者血清による偽陽性反応を経験している。抗平滑筋抗体は、各種動物間に広く分布し種族特異性の乏しいサイトスケルトンに対する抗体を含むことから、これが偽陽性反応の発現に関与するであろうと想定される。今回、患者血清中の自己抗体の一つである抗平滑筋抗体に着目し、各種蠕虫抗原に対する反応性の解析を試みた。

## 対象および方法

### 1. 対象

間接蛍光抗体法による抗平滑筋抗体陽性の PN 患者血清 3 例および偽陽性反応が言われている肝疾患の中で、抗平滑筋抗体の陽性者の多い慢性肝炎患者血清 (HBs

抗原, 抗体陰性 8 例; HBs 抗原陰性, 抗体陽性 9 例) 17 例, 計 20 例の血清を検討対象とした。また, 対照は抗平滑筋抗体陰性の蠕虫症 9 例 (蛔虫症, 蟯虫症, ズビニ鉤虫症, 有棘顎口虫症, 肝吸虫症, 肝蛭症, 宮崎肺吸虫症, 広節裂頭条虫症, 瓜実条虫症, 各 1 例) および健康人 10 例の血清を用いた。血清は非働化後,  $-20^{\circ}\text{C}$  に凍結保存し 6 ヶ月以内のものである。被検血清, 各種蠕虫症患者血清および健康人血清はラテックス凝集反応による CRP テストで陰性であった。

被検血清の持つ抗平滑筋抗体以外の自己抗体は, 間接蛍光抗体法による抗核抗体が 20 例中 15 例 (75%) に陽性であった。その染色型は homogeneous 型, shaggy 型と speckled 型であった。また, オクタロニー法による抗核酸タンパク (nuclear acidic protein antigens; NAPA) 抗体は 20 例中 9 例 (45%) が陽性であった。この検出された抗 NAPA 抗体はいずれも既知の抗 n-RNP 抗体, 抗 Sm 抗体, 抗 r-RNP 抗体, 抗 Scl-70 抗体, 抗 SS-A 抗体および抗 SS-B 抗体と一致せず未同定の抗 NAPA 抗体であった。抗ミトコンドリア抗体は 20 例中 3 例 (15%) が陽性であった。対照血清は抗核抗体, 抗核酸タンパク抗体, 抗ミトコンドリア抗体のいずれも陰性であった。

## 2. 抗原の調製

寄生虫抗原として, 次の種類のものを作製し, それぞれ血清反応の目的にしたがい使用した。蛔虫 *Ascaris lumbricoides*, 肝蛭 *Fasciola hepatica*, 宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii*, 広節裂頭条虫 *Diphyllobothrium latum* および瓜実条虫 *Dipylidium caninum* については, 全虫体アセトン乾燥粉末の PBS (Phosphate Buffer Saline) を可溶成分を全虫体抗原とした。ブタ蛔虫 *Ascaris lumbricoides suum* では全虫体抗原および生虫体の筋肉層, 消化管および生殖器の各分画の PBS 抽出液を分画抗原とした。また, ブタ蛔虫生虫体を PBS で洗浄し, ペニシリン G, ストレプトマイシン加 PBS 中で 24 時間培養後, 培養上清を濃縮して ES (Excretory Secretory) 抗原とした。さらに, 雌虫体尾端部を切断して体腔液を採取し体腔液抗原として用いた。抗原タンパク量の調製はタンパク量測定 (Lowry *et al.*, 1951) 後に一定とした。また, 後述のように, 間接蛍光抗体法では虫体のクリオスタット切片を, ABC 法では虫体のパラフィン切片をそれぞれ基質として用いた。

## 3. 抗寄生虫抗体の検索

抗寄生虫抗体の検索はオクタロニー法および間接蛍光抗体法によった。

### a) オクタロニー法

オクタロニーは 0.6% アガロース (ドータイド, PBS で溶解, 0.1% チッ化ソーダ含有) 平板を支持体とした。

各孔の直径は 4 mm, 孔の間隔は 3 mm とした。反応は室温湿潤箱中で行い, 24 時間ごとに 72 時間まで観察した。抗原は, 抗寄生虫抗体検索用として, 蛔虫, ブタ蛔虫, 肝蛭, 宮崎肺吸虫, 広節裂頭条虫および瓜実条虫の各 PBS 抽出液 (全虫体抗原) を用いた

### b) 間接蛍光抗体法

基質として, ブタ蛔虫, 太平肺吸虫 *Paragonimus ohirai*, 広節裂頭条虫および無鉤条虫 *Taenia saginata* のクリオスタット切片を用いた。標識抗体は, FITC 標識抗ヒト IgG 抗体 (ヤギ, MBL) を用いた。1 次抗体である被検血清は PBS で 100 倍希釈して用いた。1 次反応および 2 次反応は  $37^{\circ}\text{C}$ , 30 分間とし, 各洗浄は PBS で 15 分間行なった。

### 4. 共通反応性抗原の解析

共通反応性抗原の解析はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (Avidin-biotin-peroxidase complex; ABC) 法および immunoblotting により検討した。

#### a) ABC 法

基質としてブタ蛔虫, 太平肺吸虫, 広切裂頭条虫および無鉤条虫の 10% ホルマリン固定, パラフィン切片を用いた。一次抗体は抗アクチン抗体 (ウサギ, Bio Chemical), 抗デスミン抗体 (ウサギ, DAKO) および抗ビメンチン抗体 (マウス, DAKO) で, いずれも 180 倍 PBS 希釈し用いた。免疫組織化学法は, Hsu らの方法に準じ, ビオチン化二次抗体および avidin-biotin complex 反応後 DAB で発色させ, ヘマトキシリンで核染色を行った。各反応は 30 分とし, 洗浄は PBS で 15 分間行なった。

#### b) Immunoblotting

使用抗原として蛔虫, ブタ蛔虫, 肝蛭, 宮崎肺吸虫, 広節裂頭条虫, 瓜実条虫の各全虫体抗原, ブタ蛔虫の分画抗原, ブタ蛔虫 ES 抗原および体腔液を用いた。抗原を Laemmli (1970) の方法に準じ, SDS-ポリアクリルアミドゲル (12.5% 単一スラブゲル) 電気泳動を行い, 次に Gershoni and Palade (1983) の方法に準じ, 転写膜 (immobilon-p, 日本ミリポア) に転写した。1 次抗体は PBS で 180 倍希釈し用いた。標識抗体は, ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (ヤギ, MBL) を用い, 4-クロロ-1-ナフトール (3 mg/ml, メタノールで溶解) 溶液にて発色させた。洗浄は TBS (Tris Phosphate Buffer Saline) で 15 分間行なった。

## 成 績

### 1. 被検血清の寄生虫抗原への反応

被検血清 (抗平滑筋抗体陽性の PN あるいは慢性肝炎患者血清) 20 例の寄生虫抗原への反応性をオクタロニー法および間接蛍光抗体法を用いて検討した。

成績を Table 1 に総括した。オクタロニー法では、被検血清20例中10例（50%）が何らかの寄生虫抗原に陽性を示した。その内容は蛔虫およびブタ蛔虫抗原に対し7例（35%）、広節裂頭条虫に2例（10%）、また瓜実条虫抗原に5例（20%）であった。尚この10例の血清は用いた吸虫抗原のどれに対しても陽性を示さなかった。症

例4, 7および17は線虫および条虫の両抗原に陽性であった。健常人血清10例は、すべて陰性であった。

他方、ブタ蛔虫、太平肺吸虫、広節裂頭条虫および無鉤条虫クリオスタット節片を用いた間接蛍光抗体法では、被検血清20例全例が陽性であった。虫体組織の陽性染色部位はどの基質においても、角皮下層、筋層、消化管お

Table 1 Cross reaction of anti smooth-muscle antibody positive sera to helminth antigens in double immunodiffusion (Ouchterlony method) and indirect immunofluorescence test

Patient number	DID						IFA			
	AL	AS	FH	PM	DL	DC	ASS	POS	DLS	TSS
1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
11	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
13	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
14	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
15	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
17	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
19	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
No. and % of positive reaction	7 35%	7 35%	0 0%	0 0%	2 10%	5 25%	20 100%			
	Total 10		50%							
10 normal sera	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note

DID: Double immunodiffusion method

IFA: Indirect immunofluorescence test

AL: *Ascaris lumbricoides* whole body extract

AS: *Ascaris lumbricoides suum* whole body extract

FH: *Fasciola hepatica* whole body extract

PM: *Paragonimus miyazakii* whole body extract

DL: *Diphyllobothrium latum* whole body extract

DC: *Dipylidium caninum* whole body extract

ASS: *Ascaris lumbricoides suum* section

POS: *Paragonimus ohirai* section

DLS: *Diphyllobothrium latum* section

TSS: *Taenia saginata* section

Patient number 1-3: Polyarteritis nodosa

4-11: Chr. hepatitis (HBs Ag(-), Ab(-))

12-20: Chr. hepatitis (HBs Ag(-), Ab(+))

よび生殖器で、特に角皮下層、筋層に強い蛍光像を認めた (Figs. 1, 2)。一方、各種蠕虫症患者血清は、Table 2 に示すように蛔虫症患者血清は蛔虫およびブタ蛔虫に、肝吸虫症患者血清は肝吸虫に、宮崎肺吸虫症患者血清は宮崎肺吸虫に、広節裂頭条虫症患者血清は広節裂頭条虫お

よび瓜実条虫に、瓜実条虫症患者血清は瓜実条虫および広節裂頭条虫にそれぞれ陽性を示した。また各種蠕虫クリオスタット切片を用いた間接蛍光抗体法では9例全例が陽性であった。どの基質に対しても角皮下層および筋層など被検血清による場合と同じ部位に蛍光像を呈した

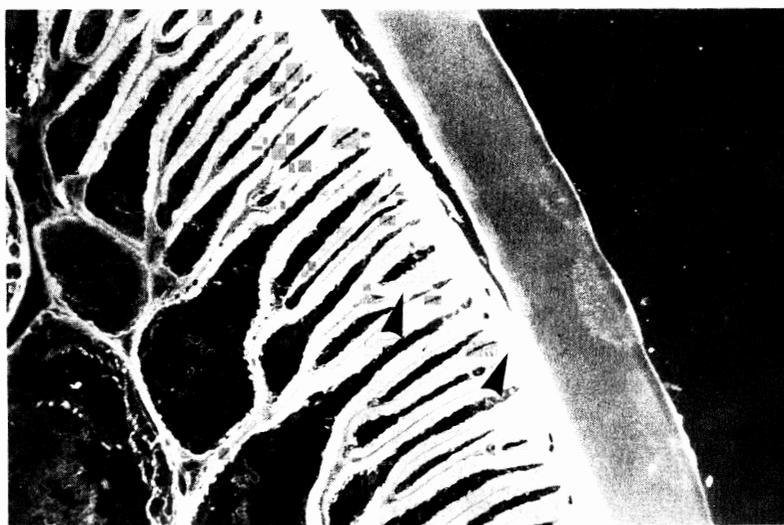


Fig. 1 IFA image of a cryostat transverse section of *Ascaris lumbricoides* by anti-smooth muscle antibody positive serum. Fluorescence was shown at muscle cells and cuticle underlayer (arrows).

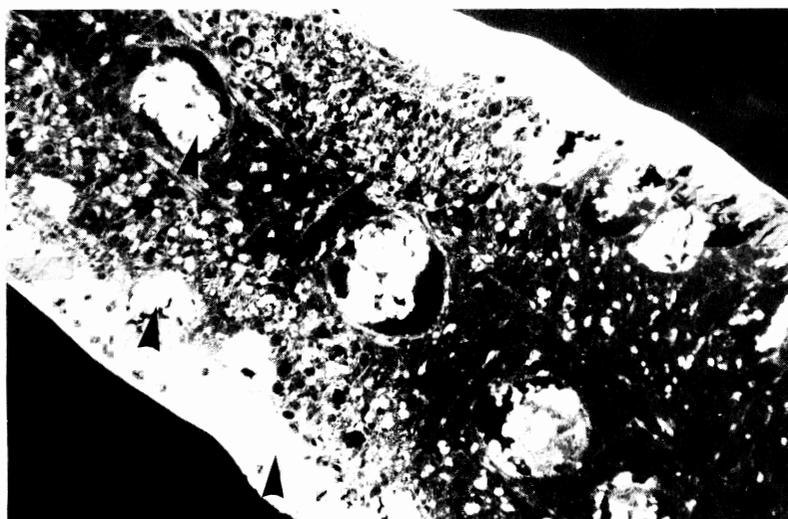


Fig. 2 IFA image of a cryostat transverse section of *Diphyllobothrium latum* (mature proglottid) by anti-smooth muscle antibody positive serum. Fluorescence was shown at testis, vitellarium and muscle cells (arrows).

(Fig. 3)。健常人血清はどの基質に対しても陰性であった。

## 2. 抗原性状の免疫組織学的検討

間接蛍光抗体法で基質としたブタ蛔虫、太平肺吸虫、広節裂頭条虫および無鉤状虫切片標本の蛍光陽性部位の抗原について免疫組織学的に検討した。被検血清が抗平滑筋抗体を有すること、さらに蛍光陽性部位が角皮下層、筋層等であることから、抗原物質がサイトスケルトンの

構成成分であるアクチン、デスミンおよびビメンチンと関連することが想定された。そこで、それらの存在を抗アクチン、抗デスミンおよび抗ビメンチン抗体を用いてABC法で検討した。

得られた成績を Talbe 3, Figs. 4, 5 に示したが、使用した各虫体切片中のアクチン、デスミンおよびビメンチンの分布は、寄生虫間に若干の相違はあるものの、角皮下層や子宮の輪走筋などの筋層、その他消化管上皮

Table 2 Cross reaction of helminthic disease sera to helminth antigens in double immunodiffusion (Ouchterlony method) and indirect immunofluorescence test

	DID						IFA			
	AL	AS	FH	PM	DL	DC	ASS	POS	DLS	TSS
<i>A. lumbricoides</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>A. duodenale</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>G. spinigerum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>C. sinensis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>F. hepatica</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. miyazakii</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>D. latum</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>D. caninum</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10 normal sera	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Note: Refer to the note in Table 1

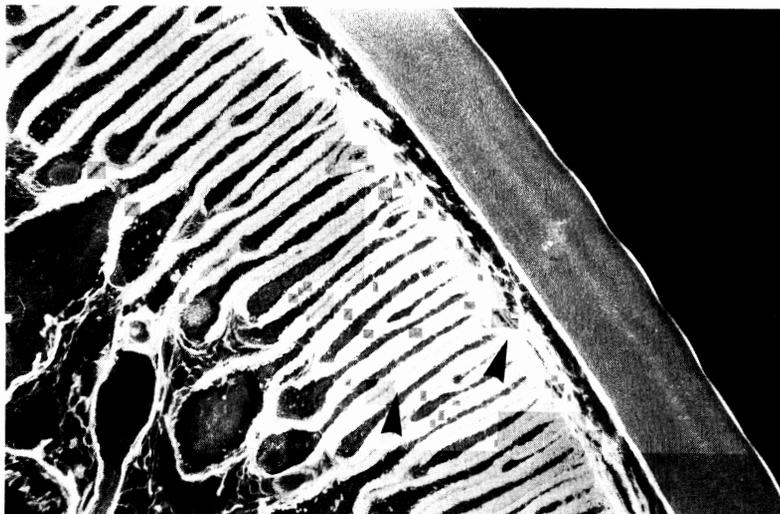


Fig. 3 IFA image of a cryostat transverse section of *A. lumbricoides* by serum from a patient with *D. latum* infection. Fluorescence was shown at muscle cells and cuticle underlayer (arrows).

Table 3 Localization of the cytoskeleton in helminth tissues revealed by ABC with anti cytoskeleton antibodies

	Cuticle	Hypodermis	Muscle	Intestine	Uterus	Ovary	Vitelline gland	Testis
<i>A. lumbricoides</i>								
<i>suum</i>								
Actin	-	-	+	+	+	+	/	/
Desmin	-	+	-	+	+	+	/	/
Vimentin	-	+	-	+	+	-	/	/
<i>P. ohrai</i>								
Actin	-	+	+	+	/	+	+	+
Desmin	-	+	+	+	/	+	+	+
Vimentin	-	-	-	+	/	+	+	-
<i>D. latum</i>								
Actin	-	+	+	/	-	/	+	+
Desmin	-	+	+	/	+	/	+	+
Vimentin	-	+	+	/	+	/	+	-
<i>T. saginata</i>								
Actin	-	+	+	/	/	/	+	+
Desmin	-	+	+	/	/	/	+	+
Vimentin	-	-	-	/	/	/	+	-

Note

+ : positive

- : negative

/ : no data

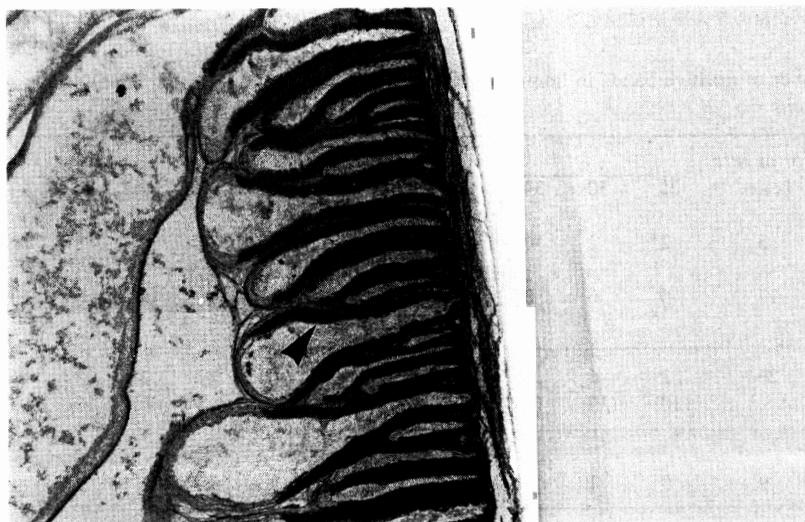


Fig. 4 ABC staining of a paraffine transverse section of *A. lumbricoides* by anti-actin antibody.

Positive staining was shown at muscle cells (arrow).

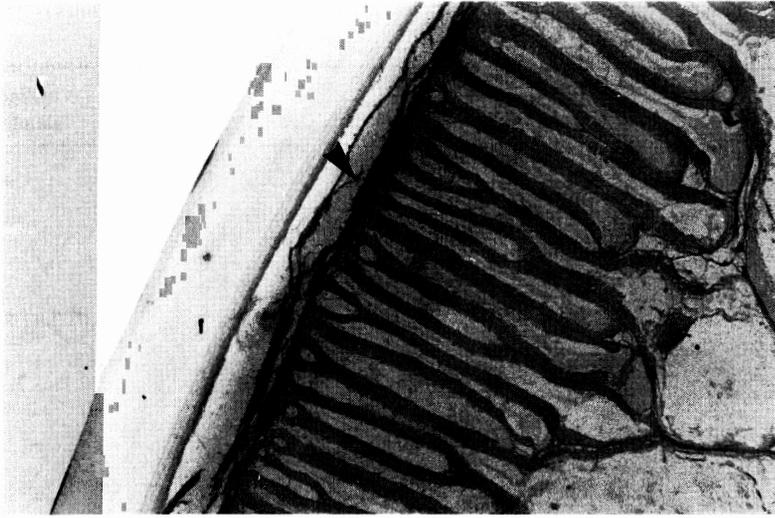


Fig. 5 ABC staining of a paraffine transverse section of *A. lumbricoides* by anti-desmin antibody.

Positive staining was shown at cuticle underlayer (arrow).

や卵巣辺縁などに認められた。このサイトスケルトン陽性部は、被検血清を用いて行った間接蛍光抗体法での陽性部位と一致していた。

### 3. 共通反応性抗原の解析

間接蛍光抗体法およびABC法による検討で、被検血清は寄生虫体のサイトスケルトンに反応することが判明

した。そこで、オクタロニー法に用いた各種抽出寄生虫抗原中にサイトスケルトンが含有されているかについて、immunoblottingで検討した。

解析に用いた抗原は蛔虫、ブタ蛔虫、肝蛭、宮崎肺吸虫、広節裂頭条虫、瓜実状虫の全虫体抗原およびブタ蛔虫分画抗原、ES抗原、体腔液抗原の9種類である。成

Table 4 Number of positive bands in immunoblotting of anti smooth-muscle antibody positive sera to helminth antigens

Sources of sera	No. of sera Tested	Positive bands (k dalton)													
		22	30	34	38	43	45	50	56	63	74	83	98	200	
PN	3	2*	2	0	2	3	0	1	2	0	3	0	3	0	
Chr. hepatitis	17	0	6	0	13	14	6	9	0	12	0	10	3	1	
Total	20	2 (10)†	6 (30)	1 (5)	15 (75)	17 (85)	6 (30)	10 (50)	2 (10)	12 (60)	3 (15)	10 (50)	6 (30)	1 (5)	
helminthic diseases	9	0	2	0	9	9	0	9	0	3	9	9	3	2	
control (normal)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

#### Note

\*: No. of sera showing the positive reaction at 22k dalton band

†: Positivity rate (%) of 20 sera at 22k dalton band

績は総括して Table 4 に示した。20例の被検血清はこれら抗原の種々の分子量の抗原バンドに反応したが、その中で各被検血清が、解析に用いた9種類の抗原中、7種類以上と反応したのは22 k dalton から200 k dalton の間にある13の抗原とであった。PN 患者血清3例中2例以上が共通反応を示した抗原バンドは22 k, 30 k, 38 k, 43 k, 56 k, 74 k および98 k dalton の抗原で、慢性肝炎患者血清17例中の9例以上が共通反応を示したのは38 k, 43 k, 50 k, 63 k および83 k dalton であった。それらの中で総被検血清数20例中10例(50%)以上が共通反応を示した抗原バンドを選出すると38 k, 43 k, 50 k, 63 k および83 k dalton 抗原であった。蠕虫症患者9例の血清を用いた immunoblotting では、すべての血清が共通して反応した38 k, 43 k, 50 k, 74 k および83 k dalton の抗原中、38 k, 43 k, 50 k および83 k dalton の抗原は抗平滑筋抗体陽性患者血清(被検血清)が陽性反応を示した主要抗原バンドと一致していた。

抗平滑筋抗体陽性患者血清(被検血清)と蠕虫症患者血清が共通して認識した38 k, 43 k, 50 k および83 k dalton の抗原に、サイトスケルトン構成成分が含有されているかを検討するため、抗アクチン、抗デスミンおよび抗ビメンチン抗体を用い、前述の寄生虫抗原との間に immunoblotting を試みた。Table 5 に示されたように、アクチンは各種寄生虫抗原の30 k, 38 k, 43 k および63 k dalton の位置に認められ、特に43 k dalton に強い染色がみられた。デスミンは22 k, 38 k, 43 k, 50 k および63 k dalton に認められ、特に50 k dalton に強く反応した。また、ビメンチンは22 k, 38 k, 43 k および50 k dalton に認められ、デスミンと同様に50 k dalton に強く染色された。

以上の結果から、被検血清と蠕虫症患者血清およびサイトスケルトン構成成分に対する抗体の3者が、共通し

て強く反応した抗原バンドは、アクチンについては38 k, 43 k, 特に43 k dalton, デスミン, ビメンチンについては38 k, 43 k, 50 k, 特に50 k dalton においてであった。

## 考 察

寄生虫症の免疫血清学的診断にはオクタロニー法、補体結合反応、間接赤血球凝集反応、間接蛍光抗体法および ELISA 法などが実施されているが、使用抗原の大部分が粗抗原のため、他の寄生虫間、特に蠕虫類間での交叉反応がみられるなど現在なおその特異性が問題となっている(荒木(1991))。一方、田中ら(1978)、平井ら(1981)、伊勢ら(1981)などの報告にみられるように、潰瘍性大腸炎、SLE、PN および肝疾患などの疾患で寄生虫抗原との間に交叉反応による偽陽性反応がみられることが指摘されている。本研究では抗平滑筋抗体陽性のPN および慢性肝炎患者血清を検討対象として、各種蠕虫抗原との間に出現する偽陽性反応について解析した。

被検血清をオクタロニー法および間接蛍光抗体法で検討した結果、各種蠕虫抗原との間にオクタロニー法では被検血清の50%、間接蛍光抗体法では全例が陽性反応を呈した。この結果より、被検血清は用いた蠕虫抗原に対して、交叉反応による偽陽性反応を起こすことが認められた。

この交叉反応による偽陽性反応の成立機序に関して、Araujo *et al.* (1971)、平井ら(1981)はトキソプラズマ症診断時の間接蛍光抗体法に起こる偽陽性反応は、抗核抗体による交叉反応の可能性を考察している。また、田中ら(1981)は潰瘍性大腸炎患者にみられる寄生虫抗原に対する交叉反応について、患者血清中にはブタ蛔虫特異タンパク抗原とほぼ同分子量(約15 k dalton)の大腸粘膜細胞成分に対する抗体が認められ、この抗体が交叉反応の原因となることを考察している。このように

Table 5 Positive bands in immunoblotting of anti-actin, anti-desmin and anti-vimentin antibodies to helminth antigens

antibodies	positive bands (k dalton)												
	22	30	34	38	43	45	50	56	63	74	83	98	200
Anti-actin antibody		○		○	◎				○				
Anti-desmin antibody	○			○	○		◎		○				
Anti-vimentin antibody	○			○	○		◎						

### Note

- ◎ : Major positive band
- : Minor positive band

交叉反応による偽陽性反応は、自己抗体などの抗体が、異種抗原タンパクのエピトープと交叉反応を呈することにより成立するものと推測される。

本研究に使用した被検血清20例は全例が抗平滑筋抗体、15例(75%)が抗核抗体を含むものであった。抗平滑筋抗体はその対応抗原として、マイクロフィラメントの主成分である42 k~43 k daltonのアクチンや中間径フィラメントの主成分である50 k daltonのデスミンとビメンチンが知られている。原生動物と骨格筋のアクチンを比較すると、アミノ酸配列の相同性が高く(広野・渡邊, 1989), 抗アクチン抗体は異なる動物種のアクチンに交叉反応を示す(Nishioka *et al.*, 1983)。このように、抗アクチン抗体は種および臓器特異性の乏しい抗体である。本研究においても、抗平滑筋抗体を含有する被検血清で、アクチンの分布がみられたブタ蛔虫などの各種蠕虫の筋層などに蛍光陽性像を認めたこと、さらにimmunoblottingにおいて、被検血清が各種蠕虫抗原の43 k daltonに泳動されたアクチンに、また、50 k daltonに位置するデスミンおよびビメンチンにも共通反応を示したことにより、抗平滑筋抗体による各種寄生虫抗原に対する交叉反応が示唆された。今後、これら交叉反応が示唆されたサイトスケルトンの特定ならびに精製サイトスケルトン添加による反応阻害の検討などにより、偽陽性反応とサイトスケルトンとの関連をより明解にする必要があり、これらの試みが診断の向上に寄与するものと思われる。

一方、蠕虫症患者血清9例は、臨床検査法として常用される間接蛍光抗体法(基質はマウス胃、腎 MBL)による抗平滑筋抗体はすべて陰性であった。しかし本研究ではimmunoblottingで、平滑筋の主要構成成分であるアクチン、デスミン、ビメンチンに対する抗体を検査したもので、蠕虫症患者血清のすべてに陽性バンドが認められた。

他方、今回の被検血清には抗平滑筋抗体の他に、代表的な自己抗体である抗核抗体の存在が75%に認められた。今回は抗核抗体についてその詳細な解析をしていないが、間接蛍光抗体法でshaggy型の染色型を示す被検血清があった。shaggy型抗核抗体は抗DNA抗体である。抗DNA抗体はカルジオライピン(Guarnieri and Eisner, 1974)、細胞表面のポリペプチド(Jacob *et al.*, 1984)やサイトスケルトン(Andre-Schwartz *et al.*, 1984)などに広く交叉反応を呈するとされている。したがって、被検血清にみられたshaggy型抗核抗体も蠕虫抗原のサイトスケルトンに交叉反応を起こすことが推測された。今回は抗核抗体について検討しえなかったが、今後の研究対象と考えている。

寄生虫症の免疫血清学的診断時にみられる交叉反応による偽陽性反応は、本研究で検討した被検血清中の抗平

滑筋抗体や抗DNA抗体等の非特異的抗体が関与するものと推測された。しかし、寄生虫抗原に対する交叉反応については藤田(1989)が報告したCRPや他の要因も多いと思われる。それに関連して、寄生虫抗原の抗原解析も今後の重要な研究課題と考えられる。

本論文要旨は第45回日本寄生虫学会西日本大会(倉敷, 1989)、第59回日本寄生虫学会総会(福岡, 1990)および第60回日本寄生虫学会総会(大阪, 1991)に於て発表した。

## 謝 辞

有益な御指導、御助言を頂いた杏林大学医学部辻守康教授に感謝します。

## 文 献

- 1) Andre-Schwartz, J., Datta, S. K., Shoenfeld, Y., Isenberg, D. A., Stollar, B. D. and Schwartz, R. S. (1984): Binding of cytoskeletal proteins by monoclonal anti-DNA Lupus autoantibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 31, 261-271.
- 2) 荒木国興(1991): 寄生虫症の血清学的診断法の発達. 寄生虫疾患の診断法の開発と症例検討 神原廣二監修, 139-157.
- 3) Araujo, F. G., Barnett, E. V., Gentry, L. O. and Remington, J. S. (1971): Falsepositive anti-*Toxoplasma* fluorescent antibody tests in patients with anti-nuclear antibodies. *Appl. Microbiol.*, 22, 270-275.
- 4) 藤田紘一郎(1989): 寄生虫感染症の免疫および免疫診断. 最新医学, 44, 678-685.
- 5) Gershoni, J. M. and Palade, G. E. (1983): Protein blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem.*, 131, 1-5.
- 6) Guarnieri, M. and Eisner, D. (1974): DNA antigen that reacts with antisera to cardiolipin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 347-353.
- 7) 平井徳幸・内田雅子・小林昭夫・橋本博史・塩川優一(1981): SLE患者におけるトキソプラズマ間接蛍光抗体法の偽陽性反応について. 寄生虫誌, 30, 477-483.
- 8) Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J.*

- Histochem. Cytochem., 29, 577-580.
- 9) 井上洋子・古川敏紀・辻 守康 (1992) : 犬蛔虫由来物質の抗原精製とその免疫化学特性 第2報. 寄生虫誌, 41 (増), 73p.
  - 10) 広野雅文・渡邊良雄 (1989) : 細胞機能とアクチン系細胞骨格; 原生動物アクチンの構造と機能. 蛋白質核酸酵素, 34, 1533-1541.
  - 11) 伊勢やよい・飯田 孝・佐藤功栄・鈴木貴和・嶋田孝吉 (1981) : ラテックス凝集反応による抗トキソプラズマ抗体検出における非特異反応に関する研究. 寄生虫誌, 30, 579-585.
  - 12) Jacob, L., Tron, F., Bach, J-F. and Lonvard, D. (1984) : A monoclonal anti-DNA antibody also binds to cell-surface protein (s). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3843-3845.
  - 13) Laemmli, U. D. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature, 227, 680-685.
  - 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement. with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
  - 15) Nishioka, M., Watanabe, S., Kobayashi, K. and Nakamura, T. (1983) : Rabbit auto-antibodies to actin induced by immunization with heterologous actin ; a possible mechanism of smooth muscle antibody production. clin. Exp. Immunol., 53, 159-164.
  - 16) 竹内 勤・小林正規 (1987) : 感染症の血清学的診断法; 赤痢アメーバ症, 臨と微生物, 14, 72-76.
  - 17) 田中 孝・宮地幸隆・辻 守康・三好秋馬 (1978) : Ascaris specific protein の radioimmunoassay 法の確立とその臨床的応用. 日消病会誌, 75, 138-145.
  - 18) 田中 孝・河村 寛・東儀宣哲・辻 守康・平林直樹・山田博康・宮地幸隆・三好秋馬 (1981) : ラット大腸粘膜に存在する Ascaris 特異蛋白類似物質の分析. 日消病会誌, 78, 1606-1612.
  - 19) 辻 守康・木村公彦 (1979) : 潰瘍性大腸炎の線虫抗原による免疫反応. 臨床検査, 23, 927-932.

Abstract

STUDIES ON THE FALSE POSITIVE REACTION BY ANTI SMOOTH-MUSCLE  
ANTIBODY TO VARIOUS HELMINTH ANTIGENS

JOJI MORITA, YOSHIMASA MAENO, YASUHIRO KUSUHARA,  
OSAMU NAKAMURA, KEIZO NAGASE AND TOSHIO NAKABAYASHI

*Department of Parasitology, Fujita Health University, School of Medicine,  
Toyoake, Aichi 470-11, Japan*

In serological diagnosis of helminthic diseases, the false positive reactions were sometimes found in the sera from patients of other diseases, particularly those containing the autoantibodies. Twenty anti smooth-muscle antibody-positive sera of which 17 were taken from patients of chronic hepatitis and the remaining 3 from polyarteritis nodosa (PN) patients were examined for analysis of the false positive reactions to helminth antigens. The antigens used were prepared from 6 species of parasites (*Ascaris lumbricoides*, *Ascaris lumbricoides suum*, *Fasciola hepatica*, *Paragonimus miyazakii*, *Diphyllobothrium latum* and *Dipylidium caninum*). To some of the helminth antigens, 10 of 20 anti smooth-muscle antibody-positive sera showed positive reaction in immunodiffusion (Ouchtelony's method: DID). All sera were positive in indirect immunofluorescence antibody test (IFA). The localizations of positive reactions in the helminth tissues in IFA were almost identical with the localizations of the actin, desmin and vimentin which were the major components of the cytoskeleton immunohistochemical by stained by ABC.

To examine cross reaction to the helminth antigens, immunoblotting was conducted with 2 groups of the patients' sera, i.e., 20 anti smooth-muscle antibody-positive sera and 9 sera from patients infected with *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*, *Gnathostoma spinigerum*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica*, *Paragonimus miyazakii*, *Diphyllobothrium latum* and *Dipylidium caninum*, respectively. The positive reactions common between the two serum groups were seen as the bands of 38k, 43k, 50k and 83k daltons. Some of these bands were commonly recognized by immunoblotting with anti-actin, anti-desmin and anti-vimentin antibodies to helminth antigens. It was suggested that the autoantibodies to 3 major components of the cytoskeleton, i.e., actin, desmin and vimentin would be contained in anti smooth-muscle-antibody positive sera and these autoantibodies might be a cause for the false positive reaction sometimes observed in serological diagnosis of helminthic diseases.