

Anisakis simplex 排泄分泌抗原の基礎的研究 (酸性条件培養下における状況)

*Immunogenicity of excretory/secretory products from Anisakis simplex worms
(cultured under acidic condition)*

内田明彦, 堂ヶ崎知格, 川上 泰

麻布大学大学院環境保健学研究科 環境保健科学 専攻

Akihiko Uchida, Chikaku Dogasaki, Yasushi Kawakami

Course of Environmental Health, Science, Azabu University

Abstract. The somatic antigen of parasitic helminthes has generally been used in the immunodiagnosis of the parasitic infection. In recent years, excretory/secretory(ES) products of worms have been recognized as an important antigen for immunodiagnosis.

In our present study, we cultured *Anisakis simplex* worms in vitro separately under acidic (pH 1) and neutral (pH 7) conditions. The two culture media fluids were then concentrated and used as ES protein antigens. The two antigens were then fractionated and analyzed by SDS-PAGE. Antisera to the worm antigens, produced by orally infecting rats and golden hamsters with live worms, were used to react against the ES antigens in ELISA and Western blotting to examine the immunogenicity of the antigens. It was observed in the Western blot that antisera from the infected golden hamsters recognized different ES protein antigens derived from the acidic culture media when compared to those produced under neutral condition. Thus, we have shown that ES antigens produced by *A. simplex* worms under acidic condition differ from those produced under neutral condition.

1. 目的

海産魚介類に寄生するアニサキス亜科幼虫の人体消化管壁侵入によるアニサキス症が年間約2,000～3,000例に上るといわれている。

一般に寄生虫感染症の診断には、各種免疫反応が行われている。用いられる抗原としては、体成分抗原 (SA: Somatic Antigen) が普通であるが、近年、排泄/分泌物に含まれる虫体の排泄分泌抗原 (ES: Excretory/Secretory Antigen) の有用性が重視され始めており、抗原の種特異性が高いことから、免疫診断用の抗原としては最適であると報告されている

(Moneo *et al.* 2000)。

アニサキス亜科幼虫のES産物については、これまでpH7の条件下で虫体を培養し、その培養液から、虫体の排泄/分泌物を採取している報告が多かったのに対し、Moneo *et al.* (2002) は、*Anisakis simplex* 虫体を、pH7の条件下ではなく、ヒトの胃液に近い酸性条件下で培養することにより、得られたES産物について検討した結果、抗原性の強いタンパク質を検出している。

そこで本研究では、酸性条件下 (pH1) 及び中性条件下 (pH7) で培養を行い、得られたES産物について、SDS-PAGEにより可溶性タンパクの分離を行

い、その差異について再検証した。さらに、ラット及びハムスターを用いて *A. simplex* に対する抗血清を作製し、ELISA 及びウエスタンブロット法により、両条件下の抗原タンパク成分との反応性に差異が認められるか否かについて検討した。

2. 方法

2-1 寄生虫体

第3期虫体は、スケソウダラ、ホッケ、マサバから採取した。虫体の同定は光学顕微鏡を用いて行い、虫体の食道・胃の構造と尾部の形態から *A. simplex* と同定したものを使用した。

2-2 虫体タンパク質の抽出

採取した虫体は、生理食塩水で繰り返し洗浄した。次に氷上で冷やししながら、0.1% NP40とプロテアーゼ阻害剤（PMSF10 $\mu\text{g/ml}$, leupeptin0.5 μl , aprotinin2.0 $\mu\text{g/ml}$, pepstatinA3.7 $\mu\text{g/ml}$, EDTA0.4 $\mu\text{g/ml}$ ）を混合させたPBS〔(NaH₂PO₄ · 2H₂O 18 mM, Na₂HPO₄ 8.4 mM, NaCl 0.15 M (pH7.4))〕を加え、ホモジナイザーでホモジネートした。抽出物は4℃, 12,000 rpm, 30分間遠心分離をし、上清を10 ml シリンジに装着した0.20 μm フィルターで濾過した。抽出物は-20℃で保存した。

2-3 ES産物からのタンパク質の抽出

虫体を38℃, 10% CO₂の条件下で培養し、培養液は培養開始から3日目（以下ES1）及び7日目（以下ES2）に採取した。採取した培養液からタンパク質を沈殿させるため、-20℃アセトン（培養液の5倍量）を加えてよく混合し、-20℃で一晩放置後遠心分離を行ない、沈渣に1×PBSを1/10量入れ、タンパク質を溶解した。抽出物は-20℃で保存した。

2-4 ラット及びハムスターを用いたポリクローナル抗体（抗血清）の作製

ラットおよびハムスターにそれぞれ第3期虫体を20虫体ずつ経口投与した。抗体価の測定は、ELISAにより行った。

2-5 SDS-PAGE

検体は、Micro BCA™ Protein Assay Kit (Pierce,

Rockford) を用いてタンパク定量を行い、タンパク量は5 μg に統一した。泳動は、130 Vで90分間行った。泳動後、ゲルは銀染色を施した。電気泳動装置は、X Cell Sure Lock™ Mini (invitrogen, America) を用いた。(Kim *et al*, 2005)

2-6 ウエスタンブロッティング

ゲルを取り出し、Mini Trans-Blot Cell Description and Assembly of Parts (BIO-RAD) で100 V 2.5~3時間水中でPVDF膜に転写した。転写終了後、メンブレンを取り出し、5%スキムミルクに浸し、4℃で一晩ブロッキングした。TTBSで洗浄後、1:199に希釈した1次抗体〔ラット及びハムスターの抗血清〕で1.5時間反応させた。次に洗浄後、ラットに対しては、1:999に希釈した二次抗体〔Anti-IgG, Rat, HRP (Sigma, A5795)〕ハムスターに対しては、1:499に希釈した二次抗体〔Anti-IgG, Hamster, HRP (KPL, 14-22-06)〕で1時間反応させた。洗浄後、Super Signal West Pico Chemiluminescent を均等に添加し、3~5 min 反応させた。検出は、KURABO Chemi Stage を使用した。

3. 結果

3-1 In vitro 培養で得られたES抗原量

pH1の条件下においてES1では579.3 μg , ES2では923.0 μg であった。pH7の条件下においては、ES1では1314.5 μg , ES2では1151.3 μg であった。

3-2 ラットにおける抗体価の推移

A. simplex を感染させたラットの血清の抗体価とControlの血清を比較したところ、免疫したラットでは、免疫約20日以降から抗体価が上昇し、約40日以降でプラトーとなった。

3-3 ES抗原及び体成分抗原のタンパク組成

ES抗原：pH1の条件下、ES1では25kD, 30kDおよび37kDを中心にバンドが形成され、ES2では、22kD, 30kDを中心にバンド形成がされていた(Lane1, 2)。pH7の条件下、ES1では10kD, 37kDを中心にバンドが形成され、ES2では、バンドは特に検出されなかった(Lane3, 4)。また、両pH条件下においてスミアな多数バンドが10kD以下で形成さ

れていた。一方、22kD、25kD及び30kDのバンドは、pH1の条件下のみで認められた。

体成分抗原：10kD、37kDを中心とする多バンド形成を示しており、10kD～37kDに多数バンドが認められた (Lane5) (Fig. 1)。

3-4 ウエスタンプロッティング

ラット：ES抗原は両pH条件下で35kD、47kDを中心にバンド形成されており、両pH条件間で差異は特に認められなかった (Lane1-4)。体成分抗原では10kD、37kDを中心とする多バンド形成を示しており、10kD～37kD及び37kD～104kDにスミアな多数バンドが認められた (Lane5) (Fig. 2)。

ハムスター：ES抗原ではpH1の条件下、ES1では15kD、25kD、30kD及び37kDを中心にバンドが形成され、ES2では、15kD、22kD及び30kDを中心にバンドが形成されていた (Lane1, 2)。一方、pH7の条件下、ES1では37kDを中心にバンドが形成され、ES2では13kD、37kDを中心にバンドが形成された

(Lane3, 4)。体成分抗原では15kD、37kD、86kDを中心とする多バンド形成を示していた (Lane5) (Fig. 3)。

4. 考 察

pH1及びpH7の両条件下で*A. simplex*虫体を培養し、得られたES産物をSDS-PAGEで比較したところ、22kD、25kD、30kDのバンドは、pH1の条件下でのみ検出され、pH7の条件下では検出されなかった。この結果よりES産物のタンパク質組成は、培養液のpHにより異なることが明らかになった。

一方、両条件下の培養1-3日間から得られたES1と培養4-7日間から得られたES2においても、タンパク質組成に差異が認められた。これは培養開始後4日目以降から虫体の脱皮、破損が多かったことや虫体の運動性が弱まっていたことに起因すると考えられた。Hwang *et al.* (2003)は、培養後4日目に虫体が脱皮することから、培養後3～4日の脱皮期間にタンパク成分の変化が認められると報告している。このことから、今回の培養4日目以降の培養液中には、虫体成分が溶解している可能性が考えられた。

ラットで作製した抗血清を用いて、ウエスタンプ

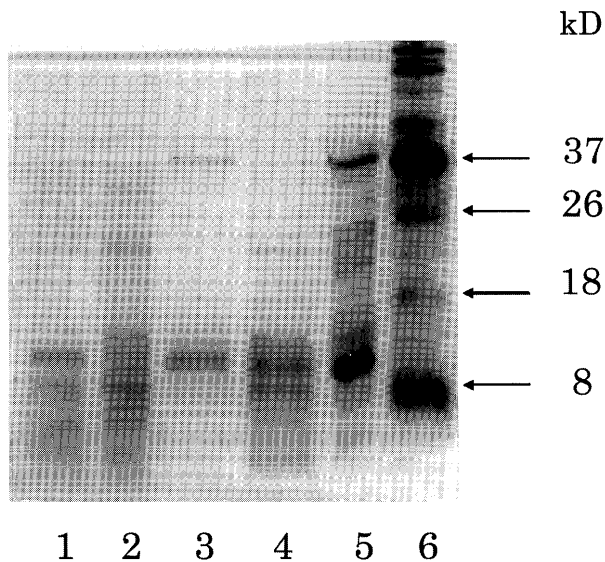


Fig. 1
SDS-PAGE of *A. simplex* larva ESP and SA. The distribution of main protein was analyzed by discontinuous gel with 16% running gel.

Lane 1: acidic culture to 1-3 day (ESP),
Lane 2: acidic culture to 4-7 day (ESP),
Lane 3: neutral culture to 1-3 day (ESP),
Lane 4: neutral culture to 4-7 day (ESP),
Lane 5: SA and Lane 6: Marker

The arrows on the right side of each figure indicate a relative molecular weight of upper 37, 26, 18 and 8kDa.

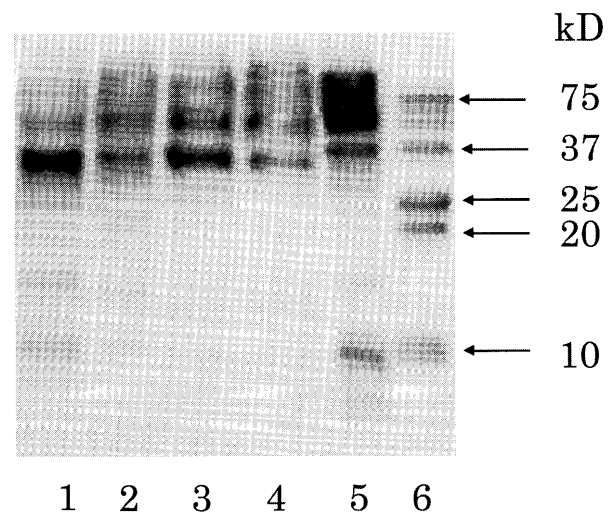


Fig. 2
Western blot of *A. simplex* larva ESP and rat serum. The distribution of main protein was analyzed by discontinuous gel with 16% running gel.

Lane 1: acidic culture to 1-3 day (ESP),
Lane 2: acidic culture to 4-7 day (ESP),
Lane 3: neutral culture to 1-3 day (ESP),
Lane 4: neutral culture to 4-7 day (ESP),
Lane 5: SA and Lane 6: Marker

The arrows on the right side of each figure indicate a relative molecular weight of upper 75, 37, 25, 20 and 10kDa.

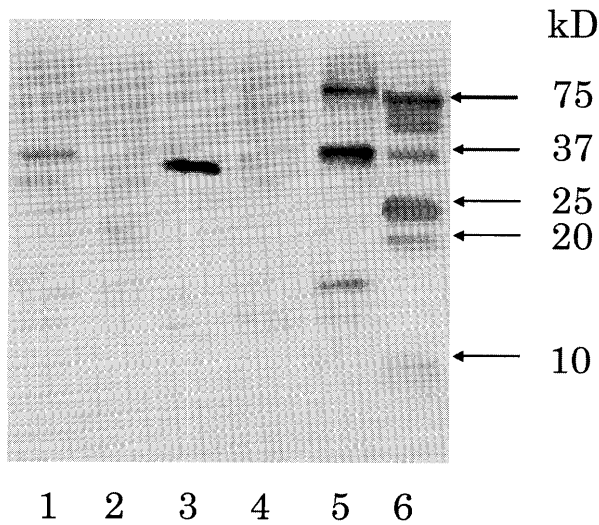


Fig. 3
Western blot of *A. simplex* larva ESP and golden hamster serum. The distribution of main protein was analyzed by discontinuous gel with 16% running gel.
Lane 1: acidic culture to 1-3 day (ESP),
Lane 2: acidic culture to 4-7 day (ESP),
Lane 3: neutral culture to 1-3 day (ESP),
Lane 4: neutral culture to 4-7 day (ESP),
Lane 5: SA and Lane 6: Marker
The arrows on the right side of each figure indicate a relative molecular weight of upper 75, 37, 25, 20 and 10kDa.

ロットティングを行い、ES抗原タンパク成分との反応性を分析した。検出されたバンドは各pH条件下で類似し、差異は認められなかったため、両者の虫体が分泌/排泄した抗原タンパク成分との反応性に差異がない可能性が高かった。

ハムスターで作製した抗血清を用いて、ウエスタンブロットティングを行った結果では、検出された15kD, 22kD, 25kD, 30kDのバンドは、pH1の条件下のみで検出され、13kDのバンドはpH7の条件下のみで検出されたことから、両者の抗原タンパク成分との反応性に差異が認められた。

一方、ラット及びハムスターの無感染血清を用いてウエスタンブロットティングを行なった結果では、両抗血清において、体成分抗原のみと反応が起きたため、ES抗原の方が特異性は高く、免疫診断用の抗原として有用であった。

以上のことから、各pH条件下のES産物に対してラットで作製した抗血清は、類似した反応を起こしたため種々な抗原タンパク成分に対して反応を起こしやすかったと考えられた。これに対し、ハムスタ

ーで作製した抗血清とは、異なった反応が認められたため、ハムスターで作製した抗血清の方が、各pH条件下のES産物との反応性を比較検討するには有用である可能性が高い。今後はラット及びハムスターの個体数を増やし、さらに検討する必要がある。また、ハムスターを用いたウエスタンブロットティングの結果では、各pH条件下のES産物に対して異なった反応を起こしたため、生きた虫体が排泄/分泌する抗原タンパク成分は、中性条件下と異なると考えられ、さらに比較検討する必要性がある。

5. 要約

一般に寄生虫感染症の各免疫反応に用いられる抗原としては、体成分抗原 (SA: Smatic Antigen) が用いられてきたが、近年、虫体の排泄/分泌抗原 (ES: Excretory/Secretary Antigen) の有用性が重視され始めている。

アニサキス症全症例の約80%の原因寄生虫である *A. simplex* を用いて、酸性条件下 (pH1) 及び中性条件下 (pH7) で培養を行い、得られた培養液から排泄/分泌抗原タンパクを抽出し、SDS-PAGEでタンパク質分画を行って、その組成について比較した。また、ラット及びハムスターに生きた虫体を感染させて抗血清を作製し、ELISA及びウエスタンブロット法を行い、両条件下の抗原タンパク成分と反応性に差異が認められるか否かについて検討した。

pH1及びpH7の両条件下で *A. simplex* 虫体を培養し、得られたES産物をSDS-PAGEで比較したところ、22kD, 25kD, 30kDのバンドは、pH1の条件下でのみ検出され、pH7の条件下では検出されなかった。この結果よりES産物のタンパク質組成は、培養液の酸性、中性条件下では抗原タンパク成分に差異が認められ、酸性条件下で虫体が排泄/分泌する抗原は中性条件下とは異なることが明らかとなった。

文献

- 1) Hwang YK., Kim JS., Lee JB., Song TJ., Joo KH., Lee JS., and Cho SW. (2003): Human anisakiasis Diversity in antibody response profile to the changing antigens in larval excretions/secretions. *Parasite. Immunol.*, 25,1-7.
- 2) Kim JS., Kim KH., Cho S., Park HY., Cho SW., Kim YT., and Joo KH.(2005): Immunochemical and Biological Analysis of Allergenicity with Excretory-

- Secretory Products of *Anisakis simplex* Third Stage Larve. Allergy Immunol., 136, 320-328.
- 3) Moneo I. and Caballero ML. (2002): Las larvas de *Anisakis simplex* incubadas en medio acido diluido liberan alergenosen que pueden tener utilidad en diagnostico clinico. Allergy Immunol. Clin., 17, 210-207.
- 4) Moneo I., Caballero ML., Gomez F., Ortega E., and Alonso MJ. (2000): Isolation and Characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. J Allergy Clin. Immunol., 106, 177-182.