

アニサキス属線虫の遺伝子変異と抗原多型を解明する研究

Genetic polymorphism and antigen diversity of parasitic nematodes of genus Anisakis

内田明彦, 川上 泰, 堂ヶ崎知格

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, Yasushi Kawakami, Chikaku Dogasaki

Course of Environmental Health Science, Azabu University

Abstract. Recently, new markers based on PCR-RFLP analysis was proved to be useful for the identification of the sibling species of *Anisakis simplex*, i.e. *A. simplex* sensu stricto, *A. pegreffii* and *A. simplex* C. In this study, parasites morphologically consistent with *Anisakis simplex* collected from the coast of Japan and Western North Pacific Ocean were examined by PCR-RFLP of the ITS region (ITS1, 5.8 subunit rRNA gene and ITS2). The RFLP patterns generated by *Hinf*I and *Hha*I showed that 100 % of the larvae collected from Hokkaido and 94 % of adults collected from Western North Pacific Ocean were identified as *A. simplex* s. str. On the other hand, 97 % of the larvae collected from Fukuoka prefecture were identified as *A. pegreffii*. A hybrid genotype was found in adults in Western North Pacific Ocean and larva in Fukuoka prefecture.

One hundred larvae from eighty five patients with Anisakiasis in Hokkaido and Kyusyu were also used for the molecular identification. The RFLP patterns showed that five larvae in Hokkaido and ninety four larvae in Kyusyu were identified as *A. simplex* s. str., only one larva that infected male patient in Kyusyu was identified as *A. pegreffii*.

We found that although *A. simplex* s. str. is primarily distributed in the North Pacific Ocean and *A. pegreffii* is primarily distributed in the southern Sea of Japan, *A. simplex* s. str. is the most important etiological agent in Japan.

1. 目 的

アニサキス症は、アニサキス科線虫の第3期幼虫によって発症する寄生虫感染症であり、現在でも我が国の患者は年間3千例に上ると推定されている。本症の病原虫として最も重要な *Anisakis simplex* は、近年、アイソザイム分析とリボソームRNA遺伝子のITS領域の配列から3種の同胞種に分類された[1-4]。そこで本研究では、分子生物学的手法を用いて日本近海における *A. simplex* 同胞種の分布を明らかにするとともに、アニサキス症患者から得た臨床サンプル

の同定も試みた。

2. 方 法

2.1 寄生虫体

第3期幼虫及び成虫は、海産魚4種と海棲哺乳類1種より採取した計151虫体を用いた。宿主、寄生虫数、採取地域はTable 1に示した。又、臨床サンプルは、北海道のアニサキス症患者5名及び九州のアニサキス症患者80名より摘出された100虫体を用いた。虫体は、胃部を含む体前方部の形態学的特徴[5, 6]をもとに *A. simplex* と同定した。

Table 1 Collection data of adults and larvae of *A. simplex*

Host species	No. of Parasites tested	Life stage	Collected location
<i>Pleurogrammus azonus</i>	20	L3 ^b	Hokkaido
<i>Theragra chalcogramma</i>	19	L3	Hokkaido
<i>Scomber japonicus</i>	16	L3	Hokkaido
<i>Hypomesus pretiosus japonicus</i>	10	L3	Hokkaido
<i>Scomber japonicus</i>	38	L3	Fukuoka prefecture
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	48	A ^c	Western North Pacific Ocean ^a

^a35-52 degree North latitude, 140-170 degrees East longitude. ^bThird stage larvae. ^cAdult worms

2.2 DNAの抽出

全DNAの抽出は、各虫体を試料として、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) 又は TNES-Urea 緩衝液を用いたフェノール・クロロホルム法 [7] により行った。

2.3 PCR-RFLP解析

Amelio ら (2000) [4] の方法に従い、プライマー A (5'-GTC GAA TTC GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA-3') 及び B (5'-GCC GGA TCC GAA TCC TGG TTA GTT TCT TTT CCT-3') を用いてリボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域の増幅を行った。抽出したDNAは鋳型とし、PCR 反応緩衝液 (1x TaKaRa Ex Taq Buffer, 170 µM dNTPs, 0.3 µM primers, 0.75 Unit TaKaRa Ex, Taq (Takara Bio Inc.)) と混合して全量を 30 µl とした。反応条件は、最初に熱変性 95 °C, 10 分, 次に熱変性 95 °C, 30 秒, アニーリング 55 °C, 30 秒, 伸長反応 72 °C, 75 秒を 1 サイクルとして 26 サイクル増幅後、最後に伸長反応 72 °C, 7 分である。サーマルサイクラーは、RoboCycler Gradient 96 with Hot Top (Stratagene Japan K.K.) を用いた。PCR 後、2.0 % アガロースゲルを用いた電気泳動により増幅産物の有無を確認し、制限酵素処理を行った。PCR 産物は、2 種類の制限酵素 (*HinfI* 及び *HhaI*) で消化し、3 % アガロースゲルで電気泳動を行い、各制限酵素の切断型の組み合わせにより同胞種を同定した。

3. 結果と考察

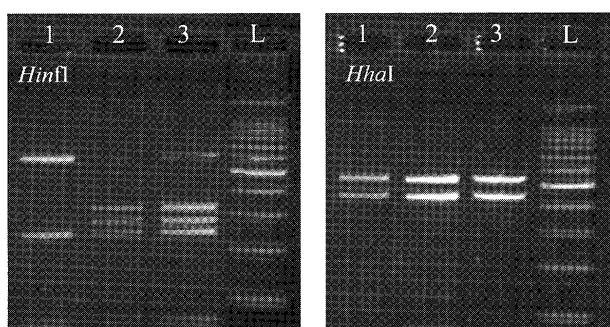
PCR を行った結果、形態学的に *A. simplex* と同定した虫体において、約 1 kbp の増幅産物が得られた。そこで、RFLP 解析により同胞種の鑑別を試みたところ、

HinfI では異なる切断パターンが認められ、*HhaI* ではすべての虫体が同じ切断パターンを示した。すなわち、*HinfI* で消化した結果、110 虫体では 620 bp, 250 bp 及び 80 bp の位置にバンドが認められ、37 虫体では 370, 300 及び 250 bp の位置にバンドが認められた。一方、*HhaI* で消化した結果、全虫体で 550 及び 430 bp の位置にバンドが認められた。これら 2 種類の制限酵素による切断パターンの組み合わせにより、*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* を同定した。さらには、*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* のバンドを併せ持つ交雑型も検出した (Table 2, Fig. 1)。これより、今まで日本近海で単一種として同定されていた *A. simplex* は、2 種の同胞種 (*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii*) に分類できる事が明らかとなった。さらに、これら同胞種の分布域を解析したところ、北海道沿岸の幼虫 (100 %) と北西北太平洋産の成虫 (97 %) は *A. simplex* s. str. であり、九州沿岸の幼虫 (97 %) は *A. pegreffii* であった。又、交雑型は両地域で 3 % の割合で検出した。よって、日本近海において *A. simplex* s. str. は北方域、*A. pegreffii* は南方域に分布すると考えられた (Fig. 2)。

次に、同法により、アニサキス症患者より摘出された臨床検体の鑑別を試みたところ、*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* を同定した。これは、日本近海に存在する同胞種を考慮すると、妥当な結果であると考えられる。しかし、各同胞種の感染率については、顕著な差異が認められた。北海道と九州の患者の 99 名 (99 %) は、*A. simplex* s. str. に感染しており、九州の患者 1 名 (1 %) のみで *A. pegreffii* の感染が認められた (Table 3)。又、複数の虫体に感染した患者において、重複感染は認められず、すべて *A. simplex* s. str.

Table 2 Genotypes obtained by RFLP analysis for the 151 isolates

No. of Parasites	Collected location	Species ^a
65(L3 ^b)	H okkaido	<i>A. simplex</i> s. str.
37(L3)	Fukuoka prefecture	<i>A. pegreffii</i>
1(L3)	Fukuoka prefecture	Hybrid genotype
45(A ^c)	Western North Pacific Ocean	<i>A. simplex</i> s. str.
3(A)	Western North Pacific Ocean	Hybrid genotype

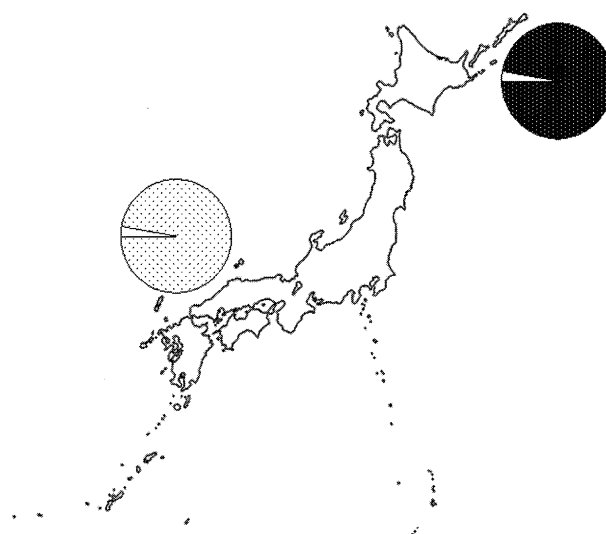
^aSpecies are based on rDNA RFLP patterns. ^bThird stage larvae.^cAdult wormsFig. 1 PCR-RFLP analysis for the identification of sibling species of *A. simplex*.Lane 1, *A. simplex* s.str.; Lane 2, *A. pegreffii*;
Lane 3, Hybrid genotype.; L: 100 bp ladder.

又は *A. pegreffii* の単独感染であった。

形態的には区別できない *A. simplex* の同胞種、*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* は、日本近海で南北に分かれて分布し、ヒトへの感染率に顕著な差がある事を明らかにした。このように *A. simplex* の同胞種間において病原性の違いを示唆する結果は初めての報告であり、今後は組換え抗原を作製し、主要抗原の抗原性について同胞種間で検討を行っていく予定である。

4. 要 約

近年、PCR-RFLP 法は、形態学的に鑑別不可能な *Anisakis simplex* 同胞種 (*A. simplex* sensu stricto, *A. pegreffii*, *A. simplex* C) の同定法として、その有効性

Fig. 2 Distribution of sibling species of *A. simplex* in Japanese waters.(■, *A. simplex* s. str.; ■, *A. pegreffii*; □, Hybrid genotype).

が証明された。そこで本研究では、日本近海に生息し、形態学的に *A. simplex* と同定された虫体について、rRNA 遺伝子 ITS 領域の PCR-RFLP 解析を行った。その結果、ITS 領域の制限酵素切断パターンにより、北方域の幼虫 (100 %) と成虫 (94 %) は *A. simplex* s. str., 南方域の幼虫 (97 %) は *A. pegreffii* と同定した。又、今回は、これら同胞種 2 種の混合感染は認められなかったが、両地域において交雑型を検出し

Table 3 Numbers of sibling species of *A. simplex* isolated from patients in Hokkaido and Kyusyu

Species	Patients			
	Hokkaido male	Hokkaido female	Kyusyu male	Kyusyu female
<i>A. simplex</i> s. str.	1	4	56	38
<i>A. pegreffii</i>	0	0	1	0

た。さらに、アニサキス症患者から摘出された虫体についても、同法により同定を行ったところ、調査した患者の99%より摘出された虫体は*A. simplex* s. str.であり、九州の患者1名(1%)のみで*A. pegreffii*の感染が認められた。

日本近海では*A. simplex* s. str.と*A. pegreffii*の2種が生息し、南北に分かれて分布しているが、アニサキス症においては*A. simplex* s. str.が最も重要な病原虫と示唆された。

文 献

- [1] Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Mattiucci S, Bullni L. *Parassitologia* 1983; 25: 239-241.
- [2] Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Smith JW, Mattiucci S, Bullini L. *Int J Parasitol* 1986; 16: 633-640.
- [3] Mattiucci S, Nascetti G, Cianchi R, Paggi L, Arduino P, Margolis L, Bratley J, Webb S, D Amelio S, Orecchia P, Bullini L. *J Parasitol* 1997; 83: 401-416.
- [4] D Amelio S, Mathiopoulous KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanco M, Paggi L. *Int J Parasitol* 2000; 30: 223-226.
- [5] Yamaguti S. Published by the author, 1942: 35.
- [6] Ishii Y, Fujino T, Weerasooriya MV. *Gastric Anisakiasis in Japan. Epidemiology, Diagnosis, Treatment*. 1, 19-29, Springer-Verlag, Tokyo, 1989.
- [7] Asahida T, Kobayashi T, Saitoh K, Nakayama I. *Fish Sci*. 1996; 62: 727-730.