

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：84406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590768

研究課題名(和文) アニサキス線虫による急性食中毒の発症メカニズムを解明する

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism for acute anisakiasis by Anisakis simplex

研究代表者

阿部 仁一郎 (ABE, Niichiro)

大阪市立環境科学研究所・その他部局等・研究副主幹

研究者番号：10321936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アニサキスに感染したことがない未感作ラットでは、凍結、加熱、切断またはホモジナイズ処理で死滅した幼虫を少なくとも1回経口投与した場合、幼虫抗原に対して特異抗体は産生されない。しかし、一度感染して特異抗体の産生を認めた感作ラットにホモジナイズ処理した死滅幼虫を投与した場合、アレルギーに關与する可能性がある特異IgE抗体の値は再上昇した。さらに、再感作ラットへの生きた幼虫の投与または幼虫ホモジネートの投与により、個体によっては幼虫抗原が血中に検出された。このことから、感作個体が死滅幼虫を摂取した場合、再感作されるとともに蕁麻疹などのアレルギー症状が引き起こされる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the possible allergenicity for dead *Anisakis simplex* larvae contaminated in seafood, except for the cases by infection with live *A. simplex* larvae. The dead *A. simplex* larvae treated with heat, frozen, cutting or homogenizing could not have possibility for inducing immune response in non-sensitized rats by at least once oral inoculation of them. However, IgE antibody specific to *A. simplex* larvae was produced and elevated in sensitized-rats after inoculation of *Anisakis* homogenates, and that antigen was detected in sera in those rats, suggesting that possible allergenicity especially urticaria could be occurred in sensitized individuals after ingestion of dead *A. simplex* larvae.

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：社会医学、衛生学

キーワード：食品衛生 食中毒 アレルギー 寄生虫

### 1. 研究開始当初の背景

アニサキス症は、海産魚の内臓表面や筋肉中に寄生するアニサキス亜科線虫の第3期幼虫が、刺身や加熱不十分な調理品を介してヒトに摂取され、幼虫が胃や腸管粘膜に侵入することにより発症する。その病態は感染しても無症状か軽度の腹痛で終結する場合と、激しい腹痛、腸閉塞、蕁麻疹などのアレルギーや呼吸困難、血圧低下などのアナフィラキシーといった重度の症状を呈する場合がある。この差異は宿主のアニサキス幼虫に対するアレルギーによると考えられている。すなわち、初感作のヒトは単なる異物反応にとどまるため症状が軽く、再感作の場合はI型アレルギー反応として激しい腹痛を生ずると考えられている。したがって、アニサキス症の発症には、生きた幼虫による消化管粘膜への侵入とそれに伴う特異抗体の産生(感作状態)が必要と考えられている。一方、アニサキスによる慢性蕁麻疹などのアレルギー症状は必ずしも生きた幼虫による感染を必要とせず、感作個体では食材に紛れた死滅幼虫を経口摂取した場合でも引き起こされる可能性のあることが示唆されていた。しかし、その実態は実験的データがないことからこれまで不明であった。

### 2. 研究の目的

前述した研究背景のもと、本研究では2つの可能性に焦点をあてた。(1)海産魚の筋肉や腹腔内に寄生する幼虫などの抗原を実験動物に経口投与した場合に、その寄生虫に対する特異抗体の産生が報告されていた。アニサキス幼虫の抗原には熱耐性のものがあることから、アニサキスでもそれらと同様に、死滅幼虫として経口摂取された場合に、特異抗体の産生が引き起こされるのではないだろうか?(2)感作個体では死滅幼虫を摂取した場合に再感作が引き起こされ、さらに、その抗原が血中を介して末梢へと移行し、アレルギーが引き起こされるのではないだろうか?この2点を解明する手がかりをつかむため、以下の実験を行った。

### 3. 研究の方法

(1)サバより採取したアニサキス幼虫 *Anisakis simplex* を生きたままの状態、または、加熱(60 1時間)凍結(-80 1時間)切断(体中央部で切断)ホモジナイズ処理で死滅または半死滅させた状態でラット(Wistar)に経口投与し、4週間まで毎週採血して特異抗体の産生をELISA法で測定した。ELISAプレートへの抗原のコートリングは、幼虫の培養上清から精製したES(分泌・排泄)抗原を用いた。ブロッキング後、一次抗体(ラット血清)をプレートウェルに添加反応させ、HRP標識抗ラットIgG、IgM二次抗体を添加反応後、発色基質を加えプレートリーダーでOD値を測定した。IgE抗体の測定には、二次抗体に抗ラットIgEモノクロー

ナル抗体(MARE-1)を用いた。カットオフ値は、幼虫投与前のラットの血清OD値の平均 $+3 \times SD$ (標準偏差)とした。また、感作個体(一度生きた幼虫に感染し特異抗体の産生を認めた個体)に死滅幼虫を投与後、特異抗体値の再上昇を認めるか否かを確認するため、初感作後抗体OD値が下降している時期に、凍結死滅幼虫10隻をラットに経口投与し、その後のOD値を測定した。

(2)消化管潰瘍の試験系に用いられているラット-アスピリンモデルを用いて、未感作ラットにアスピリン投与後、幼虫ホモジネートを投与した場合、特異抗体が産生されるか否かを調査した。未感作ラットに0.5%CMC(カルボキシメチルセルロース)溶液に懸濁させたアスピリンを経口投与後、幼虫10隻分のホモジネートを投与し、4週目まで採血しELISA法により特異IgE抗体を測定した。

(3)(2)の実験より、未感作ラットでもアスピリン前投与後に幼虫ホモジネートを投与した場合、特異IgE抗体の産生を認めたので、感作個体においても同様の現象が認められることを確認するため、生きた幼虫を経口投与したラット(感作個体)の特異抗体OD値の下降期にアスピリンを投与し、その後に幼虫ホモジネートを投与して特異IgE抗体値の上昇を調査した。

(4)(3)の実験により、感作個体ではアスピリン投与の有無に関らず、幼虫ホモジネートを投与した場合、特異IgE抗体が産生される可能性のあることが示されたので、感作個体にアスピリンを前投与することなく幼虫ホモジネートを投与した場合に、特異抗体(IgG、IgM、IgE)OD値が再上昇するか否かについて調査した。実験には生きた幼虫を2回経口投与した個体群を用い、2回目の投与後、特異抗体OD値の下降時期に20隻分の幼虫ホモジネートを投与した。

(5)幼虫ホモジネート投与後に再上昇した特異IgE抗体が認識する幼虫の抗原局在を調べるため、幼虫虫体の輪切り標本を用いて免疫組織染色を行った。また、幼虫のESおよびsomatic抗原を用いたイムノプロットにより、抗原分画の同定を試みた。

(6)感作ラットの血中からの幼虫抗原の検出には、サンドイッチELISA法を用いた。すなわち、幼虫ホモジネートで免疫したウサギ血清から免疫グロブリン分画を分取精製し、固相抗体として用いた。また、capture抗体は、同ポリクローナル抗体からIgG分画を分取精製しビオチン標識した。サンドイッチELISA法は、ポリクローナル抗体をコートリングしたウェルをブロッキング後、ラット血清を加えて反応させた。その後、capture抗体とHRP標識アビジンを加えた後に発色基質

を加え OD 値を定量した。

#### 4. 研究成果

(1) 死滅幼虫 (加熱 HL3 と略、凍結 FL3、切断 CL3、ホモジネート HML3) を投与した個体群では、特異抗体の産生を認めなかった。しかし、生きた幼虫を投与した個体群では、投与後 1 週目から幼虫特異抗体の産生を認めた (図 1)。一方、感作個体群に生きた幼虫を再投与した場合、特異抗体値は再上昇したが、凍結死滅幼虫を投与した場合はその上昇を認めなかった (図 2)。このことから、アニサキスの感染既往歴がない未感作ラットおよび感染既往歴がある感作ラットでは、死滅幼虫を少なくとも 1 回経口投与した場合に、特異抗体の産生は誘導されない可能性がある。今回は 1 回の投与実験ではあるが、食材に紛れる可能性がある幾つかの死滅パターンの幼虫を投与しても特異抗体の産生を認めなかったことから、初感作および再感作個体が死滅幼虫を摂取しても感作されない可能性があることを示した。

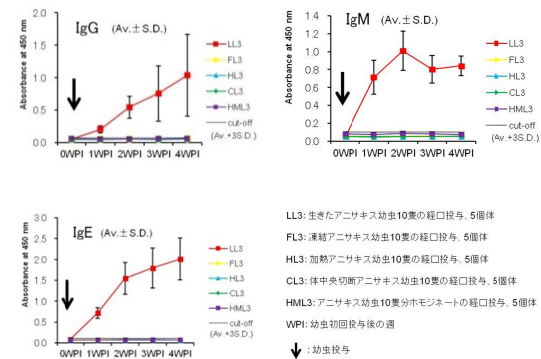


図 1. 未感作のラットに凍結、加熱、切断、ホモジナイズ処理で死滅させた幼虫を 1 回経口投与したラットにおける特異抗体産生の有無

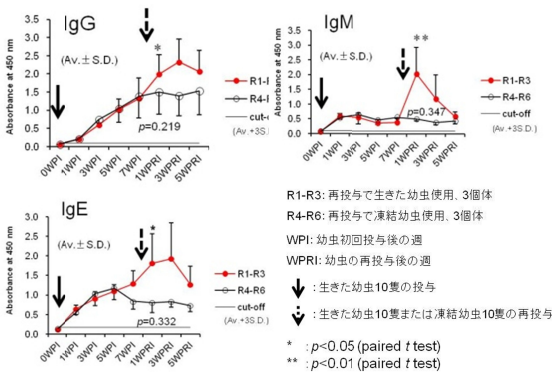


図 2. 初感作後のラットに再び生きた幼虫または凍結幼虫を投与した場合の特異抗体上昇の有無

(2) PBS、0.5% CMC 溶液のみ前投与後に幼虫ホモジネートを投与した個体群では、特異 IgE 抗体の産生を認めなかったが、アスピリ

ン投与群では OD 値にばらつきがあるものの、全個体で投与後 1 週目から特異 IgE 抗体の産生を認めた (図 3)。また、アスピリン投与後の個体の胃粘膜病理組織観察では、胃腺上皮において被蓋上皮細胞の変性、壊死像を部

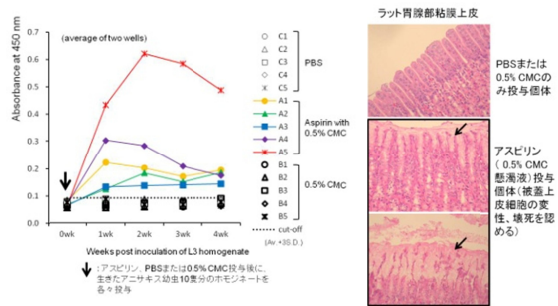


図 3. 未感作ラットにアスピリン投与後、幼虫ホモジネートを投与した場合の特異 IgE 抗体の産生

分的に認めた (図 3)。この結果は、未感作ラットでも胃粘膜に傷害があれば、ホモジナイズされた死滅幼虫を摂取した場合に感作されることを示している。また、胃の病理組織学的検索から、アスピリンによる胃腺上皮の変性・壊死がその一因として考えられた。

(3) アスピリン前投与群 (11 頭) では多くの個体で特異 IgE 抗体の再上昇を認め、ホモジネート投与後の平均 OD 値は投与前のそれより有意に上昇した (図 4)。一方、アスピリン未投与群 (11 頭) ではホモジネート投与前後の平均 OD 値に有意差を認めなかった (図 4)。そのほぼ半数の個体で特異 IgE 抗体の上昇を認めた。このことから、感作個体はアスピリン前投与の有無に関らず、幼虫ホモジネートを投与した場合に再感作される可能性があると考えられた。

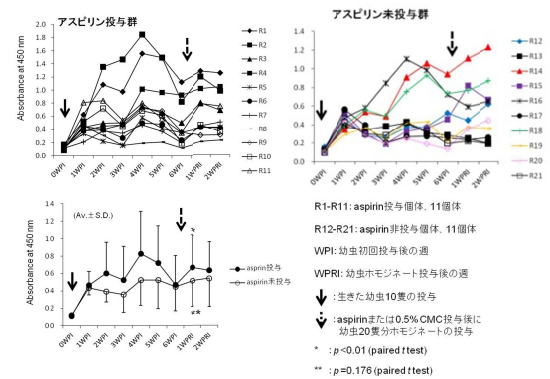


図 4. 感作ラットにアスピリン投与後、幼虫ホモジネートを投与した場合の特異 IgE 抗体の産生

(4) 既報でも知られているように、初感作ラットに生きた幼虫を再感作させると特異抗体が再上昇した (図 5)。さらに、その値が下降した時期にホモジネートを投与するとその 1 週間後には特異 IgE 抗体の OD 値のみ

有意な上昇を認めた。このことから、感作個

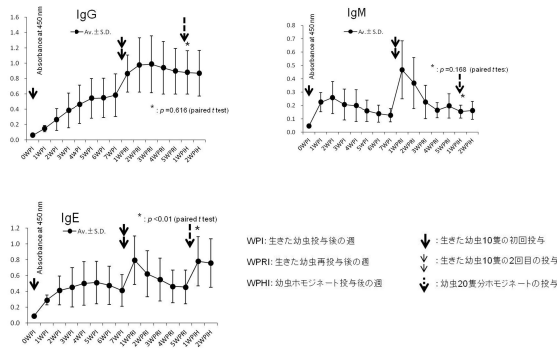


図 5. 生きたアニサキス幼虫を 2 回投与したラットに幼虫ホモジネートを投与した場合の特異抗体の産生

体では、ホモジネート投与前にアスピリンを前投与しなくとも、特異 IgE 抗体値は再上昇する（再感作）ことが明らかとなった。IgE 抗体のみ上昇した免疫機序の解明は今後の課題である。

（ 5 ）免疫組織学的検索では、ホモジネート投与後は投与前と比較して、虫体レネット細胞とクチクラにやや強い反応が認められ（図 6）ホモジネートに含まれたこれら両組織に由来する抗原が特異 IgE 抗体 OD 値の再上昇に関与していたのではないかと推測された。

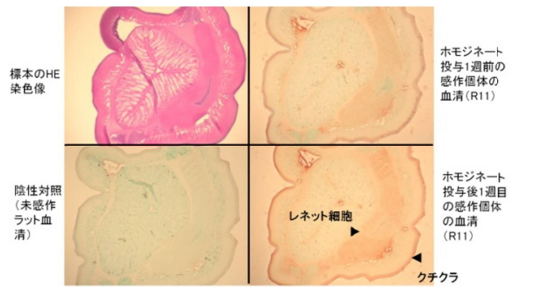


図 6 . 幼虫ホモジネート投与後に特異 IgE 抗体 OD 値の再上昇を認めた感作個体の特異 IgE 抗体と虫体組織との免疫組織学的検索

一方、イムノプロット検索では、ホモジネート投与後に強く反応した抗原分画は、1 個体において somatic 抗原の約 37kDa 付近に認められた（図 7）。しかし、他の個体では、ES または somatic 抗原においてホモジネート投与前後でその反応性に変化はほとんど認められないか、むしろ反応が弱い傾向も認められた（図 7）。ELISA で明瞭な違いが認められ、また、免疫組織学的検索でもわずかであるがホモジネート投与後の反応性が強くなる傾向を認めたが、イムノプロットでは同様の結果が得られなかった。その一因として、イムノプロット操作過程において抗原の変性分解が生じているため（SDS 処理、還元剤の添加、加熱処理）特異 IgE 抗体により認識される抗原エピトープの構造変化が考えられ

た。

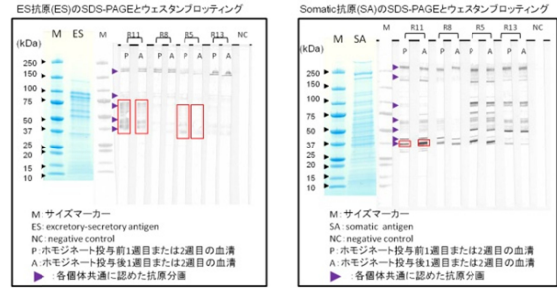


図 7 . 幼虫ホモジネート投与後に特異 IgE 抗体 OD 値の再上昇を認めた感作個体の特異 IgE 抗体と幼虫抗原とのイムノプロット

（ 6 ）血中抗原は生きた幼虫を投与した初感作後において、投与後 4 日～1 週目にそのピークを認め、その後特異抗体（IgG、IgE）の上昇とともに低下した（図 8）。生きた幼虫を再び投与した再感作時においても一部の個体で血中抗原は検出されたが、他個体の血中抗原はカットオフ以下で推移した。また、ホモジネート投与後は、2 個体で再び血中抗原を認めた。今回初感染後に認めた血中抗原の検出パターンは、既報の結果と類似するものであった。

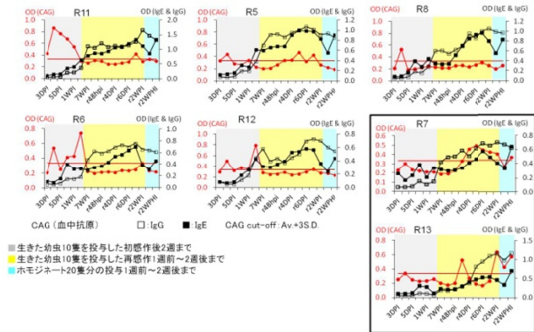


図 8 . 幼虫ホモジネート投与後に特異 IgE 抗体 OD 値の再上昇を認めた 7 個体の初感作、再感作、ホモジネート投与後における血中抗原の変動

しかし、再感作以降の血中抗原や、また、ホモジネートなど死滅幼虫を投与した際の血中抗原の挙動は全く明らかではなかったが、今回の結果から、生きた幼虫による再感作時には、初感作時と比較して血中抗原は陰性またはカットオフを下回る抗原量で推移するものと考えられた。この原因としては、再感作時に虫体が早期に排出されるか、上昇した特異抗体との間で免疫複合体が形成されるためなのか明らかではないが、おそらく虫体と宿主とのそのような作用によって引き起こされたものと推測された。また、ホモジネート投与後にも一部の個体で血中抗原を認めたことから、死滅幼虫の投与でも抗原が血中へ移行する可能性のあることが明らかとなった。



以上の結果から、研究当初の目的に対する結論として、未感作個体では、消化管粘膜に傷害があれば、死滅幼虫を摂取した場合でも感作される可能性がある。感作個体では、凍結幼虫 10 隻を投与した場合に再感作が起らず、ホモジネート(20 隻分)を投与した場合に再感作されることから、死滅幼虫の状態、量によっては再感作される可能性がある。

感作個体では、と同様の条件次第では死滅幼虫の抗原が血中へ移行する場合があります、死滅幼虫の摂取後にも蕁麻疹などのアレルギー症状が引き起こされる可能性がある。アニサキスのパンアレルゲン(パラミオシン、トロポミオシン)はエビなどの甲殻類や家ダニなどのそれらと遺伝子レベルでホモロジーが高く、実際に、エビアレルギー患者の抗体はアニサキスパンアレルゲンにも反応することが知られている。このことから、甲殻類などにアレルギーを有する個体が、アニサキス死滅幼虫を摂取した場合に、血中へ移行した幼虫抗原との間で非特異的なアレルギーが引き起こされる可能性がある。アニサキス死滅幼虫の摂取とアレルギーとの関連性を明らかにするためには、今後、抗原の状態、摂取量、個体の免疫状態(特異抗体値の状態)などを考慮し、また、適切なアレルギー発現モデル動物を用いた総合的な解析が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 5 件)

Abe N, Okamoto M, Maehara T. Molecular characterization of muscle-parasitizing didymozoids in marine fishes, *Acta Parasitologica*, 査読有, 59, 2014, in press

Abe N, Teramoto I. Oral inoculation of live or dead third-stage larvae of *Anisakis simplex* in rats suggests that only live larvae induce producing of antibody specific to *A. simplex*, *Acta Parasitologica*, 査読有, 59, 2014, 184-188

Abe N, Maehara T. Molecular characterization of kudoid parasites (Myxozoa: Multivalvulida) from somatic muscles of Pacific bluefin (*Thunnus orientalis*) and yellowfin (*T. albacores*) tuna, *Acta Parasitologica*, 査読有, 58, 2013, 226-230

Abe N, Makino I, Kojima A. Molecular characterization of *Giardia psittaci* by multilocus sequence analysis, *Infection, Genetics and Evolution*, 査読有, 12, 2012, 1710-1716

Abe N, Teramoto I. Molecular evidence for person-to-person transmission of a

novel subtype in *Giardia duodenalis* assemblage B at the rehabilitation institution for developmentally disabled people, *Parasitology Research*, 査読有, 110, 2012, 1025-1028

##### [学会発表](計 4 件)

阿部仁一郎, 寺本 勲. *Anisakis simplex* の死滅幼虫を経口投与したラットにおける幼虫特異 IgE 抗体の産生. 第 83 回日本寄生虫学会大会. 松山市 (2014.3.27-28)  
阿部仁一郎, 岡本 満, 前原智史. 日本近海海産魚の筋肉に寄生するディディモゾイド科吸虫の虫卵の形態と multilocus sequence 解析による比較. 第 82 回日本寄生虫学会大会. 東京. (2013.3.29-31)  
阿部仁一郎, 牧野幾子, 小嶋篤史. インコから検出された *Giardia psittaci* の multilocus sequence 解析. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 盛岡市. (2012.9.14-16)

Abe N, Teramoto I. Molecular evidence for person-to-person transmission of a novel subtype in *Giardia duodenalis* assemblage B at the rehabilitation institution for developmentally disabled people. 17<sup>th</sup> Japanese German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases & Workshop of Gastrointestinal Protozoan Diseases. Nara. (2011.9.15)

##### [図書](計 件)

##### [産業財産権] 出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

##### 取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

##### [その他] ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

阿部 仁一郎 (ABE Niichiro)

大阪市立環境科学研究所・その他部局等・  
研究副主幹  
研究者番号：10321936

(2)研究分担者

寺本(木俣) 勲(Teramoto(Kimata) Isao)  
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・  
講師  
研究者番号：20153174

(3)連携研究者

( )  
研究者番号：