

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：84406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460818

研究課題名(和文) アニサキス抗原の経口摂取とそれによるIgE抗体の産生はアレルギーに関与するのか？

研究課題名(英文) Production of specific IgE antibody associated with oral ingestion of Anisakis antigens is involved in Anisakis allergy?

研究代表者

阿部 仁一郎 (Abe, Niichiro)

大阪市立環境科学研究所・調査研究課微生物保健グループ・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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：海産魚摂取に伴う蕁麻疹等のアレルギー症状は、アニサキス(海産魚に寄生する線虫)がその一因と考えられている。アニサキス感作動物にそのホモジネートを投与した場合に抗体反応を増強させる抗原分画のうち、熱処理に耐性な約35kDaと14kDa分画の同定を試みた。35kDa分画はアニサキスアレルギーの一つであるヘモグロビンであり、他方は同アレルギーのAni s 9またはミオフィリンと考えられた。国内アニサキス症の主要原因Anisakis simplex sensu strictoのヘモグロビンmRNAの塩基配列およびアミノ酸配列を同定し、同胞種(A. pegreffii)間の変異を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Allergic symptoms such as urticaria following ingestion of marine fish has been thought to be caused by Anisakis simplex (nematode parasitizing in marine fish). We tried to identify approximately 35 kDa and 14 kDa fractions from this larval nematode, being resistant to heating among antigenic fractions which enhance antibody reaction when homogenate was administered to Anisakis sensitized animals. The 35 kDa fraction was identified as haemoglobin which is one of Anisakis allergens, and the other was thought to be Anisakis allergen Ani s 9 or myophylline. The amino acid sequence of haemoglobin of Anisakis simplex sensu stricto, the main cause of domestic Anisakis disease, was identified, and its variation between sibling species (A. pegreffii) was revealed.

研究分野：寄生虫学

キーワード：食品衛生 食中毒 寄生虫 アニサキス

1. 研究開始当初の背景

アニサキス症は、海産魚の刺身等に紛れた生きたアニサキス幼虫を摂取後に、幼虫が消化管粘膜に侵入し激しい腹痛等を惹起する寄生虫性食中毒で、日本国内の症例数は世界で最も多く、年間少なくとも千例以上と見積もられている。感染歴のある患者では死滅幼虫の摂取でもアレルギー（蕁麻疹等）が惹起されると推測されているが未だ証明されていない。我々のこれまでの研究において、アニサキス感作動物に同幼虫のホモジネートを経口投与すると、アニサキス特異抗体の産生が再び増強される現象を確認していたが、その特異抗体がアニサキス幼虫のどのような抗原を認識しているかについては不明であった。アニサキス症患者の初感染、再感染後の血清を用いた抗原解析は実際には困難であり、そのような実験報告もなく、さらに、動物実験においても同様の解析がなされていないことから、アニサキス症における初感染、再感染時の特異抗体による抗原認識の挙動も不明であった。

2. 研究の目的

前述した研究背景のもと、本研究では2つの内容に焦点をあてた。(1) アニサキス幼虫の初感染後、再感染後および同幼虫ホモジネートの投与後に経時的に採血し、幼虫抗原を認識する特異抗体の経時的な挙動をイムノブロット法で確認することで、どの抗原分画が特異抗体の産生を再誘導させているのかを明らかにできるのではないかと。(2) 再感染後に特異抗体が強く認識する抗原分画を同定できれば、既知抗原との照合でその抗原のアレルゲンとしての可能性を探ることが可能で、さらに、アニサキス感作動物にそれら抗原分画を接種した場合、何らかのアレルギー症状が引き起こされるのではないだろうか？この2点を解明する手掛かりをつかむため、以下の実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 抗原調整・アニサキス幼虫等の感染・ELISA法による抗体OD値の測定

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、ラット (Wistar ♂) 1頭あたり15~20匹経口投与し(初感染)、その8週後に再度同幼虫を同数経口投与した(再感染)。再感染後12週目に幼虫ホモジネート(幼虫15匹分)を経口投与し、その2週目に供試ラットを安楽死させた。採血は初感染~ホモジネート投与後2週目まで毎週行い、特異抗体OD値の挙動をELISA法で測定した。ELISA法およびイムノブロット法の血清はプール血清として用いた。抗原には幼虫をペッスルで処理した破砕物を超音波処理し、遠心後の上清を用いた(虫体抽出抗原)。ELISA法では、抗原コーティング~ブロッキング後に、一次抗体(ラット血清)をプレートウェルに添加し、さら

にHRP標識抗ラットIgG、IgM二次抗体を添加後に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、二次抗体にマウス抗ラットIgEモノクローナル抗体(MARE-1)を用い、三次抗体にHRP標識抗マウスIgG抗体を添加して同様にOD値を測定した。

(2) イムノブロット法

虫体抽出抗原にLaemmliバッファーと2メルカプトエタノールを加えて5分間沸騰浴中で加熱した後に、4~20%のgradientゲルを用いてSDS-PAGEを行った。泳動後のゲル中のタンパク質をPVDF膜に転写し、ブロッキング後に12レーンのスクリーナブロッターにセットして各レーンに希釈血清サンプルを添加し、4℃一晩振盪反応させた。その後各レーンを洗浄してメンブレンを取り外し再度十分に洗浄した後に、前述同様の二次抗体および三次抗体をトレイに添加して1時間室温で振盪反応させた。反応後にDAB染色メタルエンハンサーを用いて、抗体が認識する抗原分画を可視化した。

(3) 抗原の熱耐性試験

虫体抽出抗原の加熱処理は、沸騰浴中30分、90℃15分、121℃20分で行った。加熱処理後、前述同様にSDS-PAGE~ブロッキングを行い、感染ラットの免疫血清を用いてIgG、IgE抗体によるイムノブロットを行った。

(4) 虫体抽出抗原の二次元電気泳動とイムノブロット法

虫体抽出抗原を等電点電気泳動用試薬で前処理した後に、アガロースゲルを用いて二次元電気泳動を行った。泳動後にゲルの固定、洗浄、平衡化を行い、5~20%のgradientゲルに密着させSDS-PAGEを行った。PAGE後のゲルはCBB染色で抗原のスポットを確認するとともに、同様に泳動した他のゲルについてはPVDF膜に転写後CBB染色しスポットを確認後に脱染色し、前述同様のイムノブロットを行った。

(5) 質量分析による抗原分画タンパク質の同定

SDS-PAGEで分離された虫体抽出抗原の中で、幼虫ホモジネート投与後の血清を用いたイムノブロットで特異抗体の反応性が増強した抗原スポットの特定を二次元電気泳動~イムノブロット法で試み、当該スポットを切り出した後にNano LC-MS/MS分析を行い、Mascot searchにより有意なタンパク質の検索を行った。

(6) アニサキスヘモグロビンアミノ酸配列の塩同定

日本海産(石川県沖)マサバより分離し、形態学的に *Anisakis simplex* と同定した同幼虫10隻について、各々をPBSで複数回洗

浄した後、幼虫ごとにその尾末端少量を切り出し、DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した。それ以外の虫体部分は、キットを用いた虫体 RNA の抽出に供した。抽出した DNA は、アニサキス同胞種を同定するための PCR および PCR-RFLP に供し、各々の虫体を遺伝子レベルで同定した。RNA については、同胞種ごとにその濃度が最も高かった RNA を用いて、SMARTer RACE 5' / 3' キットおよび新たに合成した gene specific primer (GSP) を用いてアニサキスヘモグロビン mRNA の塩基配列を同定するとともに、アミノ酸配列に変換して既知アニサキスヘモグロビンのそれらと比較した。

(7) 感作ラットへの抗原分画抽出物の接種試験

アニサキス虫体抽出抗原で免疫し、ELISA 法でその特異抗体上昇を確認したラットに、SDS-PAGE で分離した約 35kDa および 14kDa 分画を切り出し、同ゲル片を電気溶出後に脱 SDS 処理等を行い、その精製物をラットの尾静脈に接種し行動の変化を観察した。対照には抗原を含まないゲル片からの抽出物を接種した。

4. 研究成果

(1) アニサキス幼虫感染後の IgG 抗体の挙動については、初感染後その OD 値は上昇し、再感染後にも再上昇した。再感染後に幼虫ホモジネートを投与した場合、OD 値の再上昇を認められた (Fig. 1)。

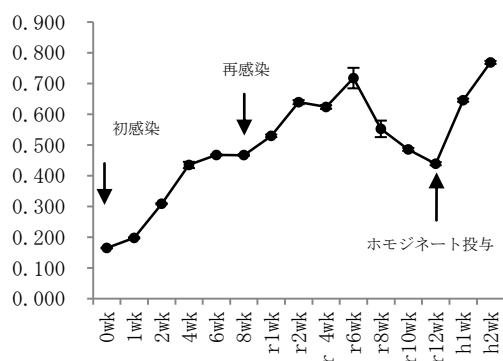


Figure 1 アニサキス幼虫の初感染、再感染およびそのホモジネート投与後の ELISA IgG OD 値の推移。r:再感染後、h:ホモジネート投与後

IgM についても OD 値は初感染後に急上昇し、2 週目のピークに達した後で急激に低下し、再感染後には再び急上昇した。再感染後にホモジネートを投与した場合、OD 値の再上昇が認められた (Fig. 2)。このことから、IgM 抗体の OD 値の挙動はアニサキス幼虫感染の急性経過を反映するものと考えられる。

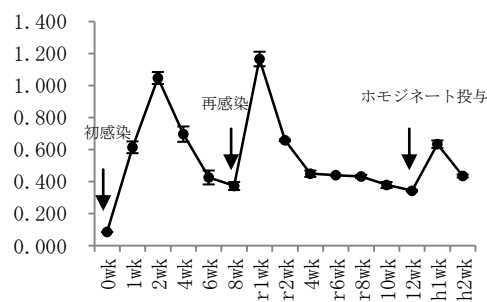


Figure 2 アニサキス幼虫の初感染、再感染およびそのホモジネート投与後の ELISA IgM OD 値の推移。r:再感染後、h:ホモジネート投与後

一方、IgE 抗体の OD 値についても、IgG、IgM 同様に初感染後上昇を認め、再感染後にも再上昇を認めた。また、ホモジネート投与後にもその再上昇が認められた (Fig. 3)。

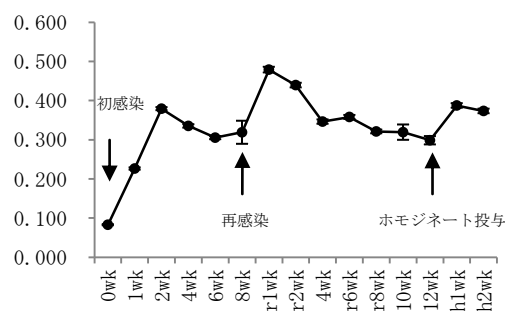


Figure 3 アニサキス幼虫の初感染、再感染およびそのホモジネート投与後の ELISA IgE OD 値の推移。r:再感染後、h:ホモジネート投与後

以上のことから、アニサキス幼虫をラットに初感染、再感染させた場合に、各特異抗体 OD 値はその感染により (再) 上昇することが確認され、さらに、幼虫ホモジネートを投与した場合でも、特異抗体 OD 値が程度の差はあれ再上昇したことから、感作ラットでは幼虫ホモジネートを摂取した場合に、その消化管内でアニサキス抗原に対する何らかの免疫応答が起こっているものと推測された。

(2) イムノプロット法により特異抗体が認識する虫体抽出抗原分画の経時的な変化を調べたところ、IgG においては、初感染後 6 週目から 130kDa、50kDa、35kDa (矢印)、100kDa、15kDa (矢頭) 付近の複数の分画を認識した。再感染後は 50kDa、35kDa 付近の分画に対する反応が強くなった。ホモジネート投与個体群では、50kDa、35kDa、15kDa 付近の分画に対する反応がより強まる傾向が認められた (Fig. 4)。

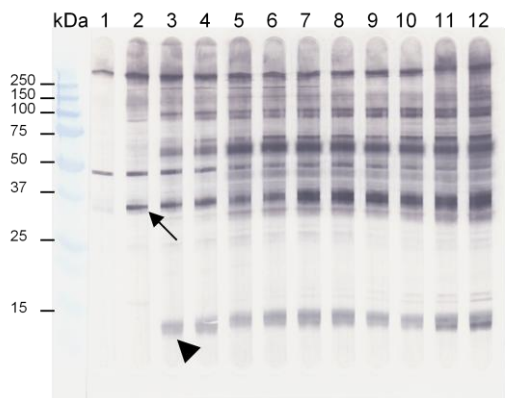


Figure 4 アニサキス幼虫の初感染、再感染およびそのホモジネート投与後のイムノプロット (IgG)。1: 0wk、2: 2wk、3: 6wk、4: 8wk、5: r1wk、6: r4wk、7: r6wk、8: r8wk、9: r10wk、10: r12wk、11: h1wk、12: h2wk

IgMにおいては、初感染後2週目から50kDa、35kDa (矢印) 付近の複数の分画と、130kDa (矢頭) 付近のスメア状分画に対する反応が認められ8週目にはその反応は大きく減退していた。再感染後には50kDa、130kDa 付近に対する反応が強くなり、それ以降徐々に反応は減退していった。ホモジネート投与後では、50kDa、130kDa 付近の分画に対する反応が強くなる傾向が認められた (Fig. 5)。

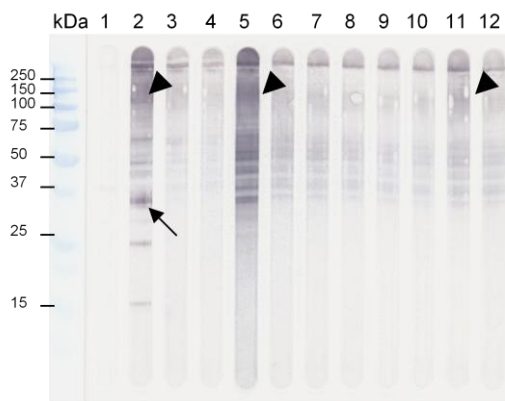


Figure 5 アニサキス幼虫の初感染、再感染およびそのホモジネート投与後のイムノプロット (IgM)。1: 0wk、2: 2wk、3: 6wk、4: 8wk、5: r1wk、6: r4wk、7: r6wk、8: r8wk、9: r10wk、10: r12wk、11: h1wk、12: h2wk

IgE 抗体においては、初感染後2週目から250kDa、50kDa、35kDa (矢印) 付近の複数の分画を認識した。6週目頃から15kDa (矢頭) 付近の分画に対する反応も認められた。8週目にはそれらの反応性は減退した。再感染後は250kDa、130kDa、50kDa、35kDa、15kDa 付近の分画に対する反応が強くなった。ホモジネート投与後では、50kDa、35kDa、15kDa 付近の分画に対する反応がより強まる傾向が認められた (Fig. 6)。

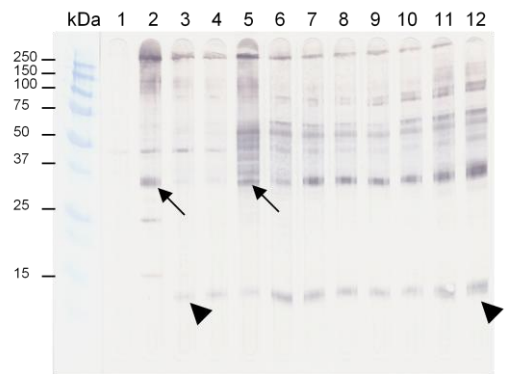


Figure 6 アニサキス幼虫の初感染、再感染およびそのホモジネート投与後のイムノプロット (IgE)。1: 0wk、2: 2wk、3: 6wk、4: 8wk、5: r1wk、6: r4wk、7: r6wk、8: r8wk、9: r10wk、10: r12wk、11: h1wk、12: h2wk

以上のことから、幼虫感染後の経時的なELISA OD値とイムノプロットによる抗原分画に対する反応の強弱の挙動はリンクしている傾向が認められた。また、その傾向はホモジネート投与後でも同様と推測された。特にイムノプロットで約35kDa、15kDaの分画に対するIgG、IgEの反応性が強まっていることから、両分画に含まれる抗原はホモジネート投与後の抗体OD値の上昇に関与した抗原の一部であると推測された。

(3) 加熱処理した虫体抽出抗原についてイムノプロットを行ったところ、沸騰浴中で30分処理した場合、15~200kDa前後まで幅広い分画に対する抗体反応を認めた (Fig. 7、レーン1)。特に、15kDa (矢頭)、35kDa (矢印) に対して強い反応を認めた。115°Cで90分処理した場合、15kDaと200kDa付近に陽性反応を認め (レーン2)、他の分画に対する反応性は前処理の場合と比較してかなり減弱していた。121°C20分処理した場合は、115°Cで90分処理した場合とほぼ同様であったが、その反応性は115°C90分処理の場合よりも強く認められた。

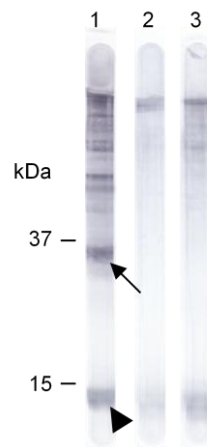


Figure 7 虫体抽出抗原の加熱処理後のイムノプロット (IgG)。レーン1: 沸騰浴中30分、レーン2: 115°C90分、レーン3: 121°C20分

以上のことから、アニサキス幼虫の初感染、再感染およびそのホモジネートを投与した後で抗体反応性が増強する抗原分画である約 35kDa と 15kDa の分画に含まれる抗原は、耐熱性があると考えられ、特に国内の海産物缶詰商品の加熱処理 (115°C90 分) でもその抗原性が保持されていることから、両抗原分画は海産物加工食品摂取後のアニサキスアレルギーに関与する可能性があると推測された。

(4) アニサキス幼虫の再感染および幼虫ホモジネート投与後に、イムノブロットで抗体反応が増強し、熱耐性を示した約 35kDa 付近の分画を同定するため、二次元電気泳動で抗原分画を展開して調べたところ、約 35kDa 付近の分画は、CBB 染色像で見る限り少なくとも 2 つのスポット (矢印、破線矢印) で構成されていた (Fig. 8)。

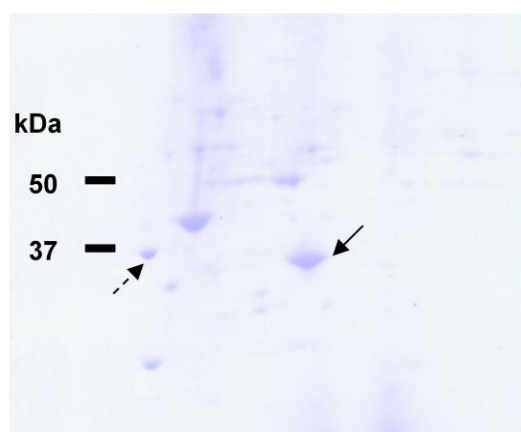


Figure 8 虫体抽出抗原の二次元電気泳動とその CBB 染色像。約 35kDa 付近の抗原分画には少なくとも 2 つの分画 (破線矢印と矢印) が含まれている。

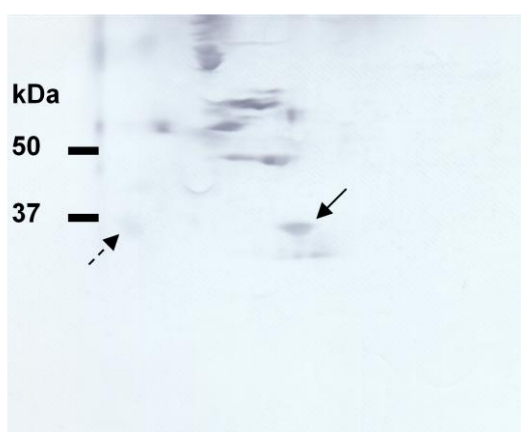


Figure 9 二次元電気泳動後のイムノブロット像。約 35kDa 付近の抗原分画で矢印部分のスポットに対する抗体の反応性が強い。

さらに、同二次元電気泳動のイムノブロットでは、矢印で示したスポットに対する抗体反応がより強く認められた (Fig. 9、矢印)。

一方、35kDa と同様にイムノブロットで強い反応性を認め、熱耐性を有した 15kDa 付近の分画については、二次元電気泳動後のイムノブロットで複数のスポットを確認したが、それらを泳動後の染色ゲルで確認し切り出すことは困難であった。このため、後述するように、SDS-PAGE で抗原分画した後に、当該サイズを切り出し質量分析に供した。

以上のことから、約 35kDa の分画には少なくとも 2 つの等電点の異なる分画が存在し、より強い抗体反応を示した一方の分画が再感染、ホモジネート投与後の抗体反応の増強に関与しているものと考えられた。

(5) 二次元電気泳動後のイムノブロットで特定した、抗体反応を増強させる可能性のある約 35kDa スポットについて、質量分析ならびに Mascot Search でその同定を試みた。その結果、当該スポットは 2015 年に 13 番目のアニサキスアレルギーとして報告されたアニサキスヘモグロビンであることが判明した。消化管アニサキス症患者の約 8 割がこのアレルギーに抗体陽性を示すことから、アニサキスヘモグロビンは主要アレルギーとして知られている。さらに、アニサキス感染後に蕁麻疹等のアレルギー症状を呈した患者の約 6 割でも陽性との報告がある。一方、約 15kDa 付近の分画については、前述したように、二次元電気泳動像でスポットの特定が困難だったため、ゲル濃度を変更した PAGE ゲルを用いて SDS-PAGE とイムノブロットを行い、当該分画を切出した後で、その質量分析を行った。その結果、過去に報告されていた熱耐性のアニサキスアレルギー (Ani s 9) およびアニサキス線虫と近縁なブタ回虫等で報告のあるミオフィリンタンパク質が有意にヒットし、少なくともこれらのタンパク質が約 15kDa 分画に含まれ、それらの何れかまたは両方に抗原性があるものと考えられた。

(6) アニサキス亜科線虫において、ヘモグロビン mRNA の塩基配列は *Pseudoterranova decipiens* と *Anisakis simplex* の同胞種の一つ *A. pegreffii* のみで報告されていた。今回の調査において、既知 GSP プライマーを用いて RACE-PCR を行っても増幅産物を得ることはできなかったが、新規に設計した GSP プライマーにより、日本においてアニサキス症の主原因である *A. simplex sensu stricto* の同配列を初めて明らかにするとともに、日本近海に分布する *A. pegreffii* のその配列も明らかにした (Fig. 10)。その結果、異なる同胞種間のみならず、同じ同胞種間においてもそのアミノ酸配列に変異を認めた。*Anisakis pegreffii* のヘモグロビンには抗原エピトープが 5 部位存在すると報告されてい

るが、その中で最も重要とされる IgE 結合とその特異性に関与するエピートープ 2 と 5 のアミノ酸配列は、今回解析した *A. simplex sensu stricto* および *A. pegreffii* において変異を認めなかったが、他のエピートープ 1、3、4 において複数の変異が認められた。

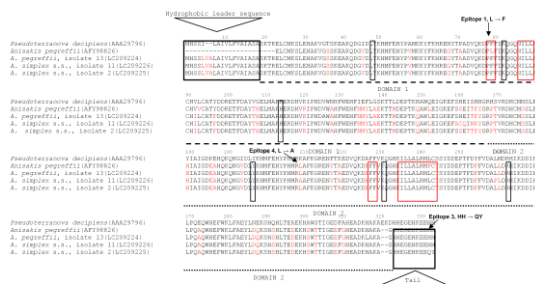


Figure 10 今回の調査で明らかにした *Anisakis simplex sensu stricto* と *A. pegreffii* のヘモグロビンのアミノ酸配列。

(7) 約 35kDa の抗原抽出物を接種したアニサキス感作ラット 4 個体は、個体差はあるが、接種後に沈鬱、顔擦り、体舐め、ふるえ等の行動が認められた。また、15kDa の抽出物を接種した 4 個体においても同様の行動が認められ、特に 15kDa 抽出物の接種個体群でその行動はより多く観察された。また、抗原を含まないゲル片からの抽出物を接種した対照 2 個体については、一方の個体で顔擦り、体舐めの行動が少し認められたが、沈鬱は認められず活発に行動していた。この実験では、実験前に準備したマサバにおいてアニサキス幼虫の寄生数が少なかったために、虫体抽出抗原を皮下に免疫することで感作個体とした。虫体感染と抗原の皮下免疫において、幼虫抗原に対する免疫応答に差がある可能性もあるが、免疫感作ラットに約 35kDa、15kDa 抗原の虫体抽出物を接種した場合、前述したアレルギー様症状が発現している可能性は否定できないと考えられる。今後はラット好塩基球腫瘍化細胞 (RBL-2H3) を用いた脱顆粒試験においても、アニサキスヘモグロビンおよび約 15kDa 分画に含まれる抗原と特異 IgE 抗体との反応性を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Niichiro Abe, Isao Teramoto. *Anisakis haemoglobin is a main antigen inducing strong and prolonged immunoreactions in rats*. Parasitology Research, 査読有, 116, 2035-2039, 2017.
- ② Kayoko Matsuo, Junji Moribe, Niichiro Abe. Molecular detection and characterization of *Anaplasma* species in wild deer and boars in Gifu Prefecture, Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases, 査読有, 70, 354-356, 2017.
- ③ 松尾加代子、上津ひろな、高島康弘、阿

部仁一郎. ホンシュウジカ *Cervus nippon centralis* およびニホンイノシシ *Sus scrofa leucomystax* における住肉胞子虫の高寄生率とそれらの筋肉より分離された *Sarcocystis* spp. と *Hepatozoon* sp. の遺伝子解析. 日本野生動物医学雑誌、査読有、21、35-40、2016.

- ④ Niichiro Abe, Mitsuru Okamoto. Molecular characterization of muscle-parasitizing didymozoid from a chub mackerel, *Scomber japonicus*. Acta Parasitologica, 査読有, 60, 557-562, 2015.
- ⑤ 阿部仁一郎. 日本における寄生虫性食中毒の最近の話題と今後の課題. 日本食品微生物学会雑誌、査読有、31、2014、129-137.

〔学会発表〕 (計 1 件)

- ① 阿部仁一郎, 寺本 勲. アニサキス感作ラットにおいて同幼虫ホモジネートの経口投与後に特異抗体反応を増強する可能性があるアニサキス抗原. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 宮崎市. (2016. 3. 19-20)

〔図書〕 (計 1 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 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 1 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・調査研究課微生物保健グループ・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：