

Anisakis 関連疾患における特異 IgE 測定の意義

岐阜大学医学部寄生虫学教室

粕谷志郎 古賀香理

海産魚介類に寄生するアニサキス幼虫はアニサキス症の原因のみならず、その抗原は蕁麻疹などのアレルギー反応の原因にもなり得る。そこで、アニサキス幼虫の分泌抗原にて **AlaSTAT** を作成し、以下の患者群のアニサキス特異 **IgE** を測定した。

アニサキス症の87.5%、確診できなかった腹痛症の66.7%が **AlaSTAT** 陽性を示した。近縁種の回虫胆道迷入症では0%であった。一方、アニサキスに対するアレルギー反応と考えられるいわゆるサバ蕁麻疹群では75.0%が陽性を示したのに対し、原因の特定できなかった蕁麻疹群では8.3%、正常対照群では10.0%と低かった。

以上より、**AlaSTAT** によるアニサキス特異 **IgE** の測定は、アニサキス症の診断のみならず、蕁麻疹、腹痛などの原因としてアニサキスが関与するか否かの決め手としても重要な意義を持つものと思われた。

Key words: AlaSTAT — anisakiasis — *Anisakis simplex* — IgE — urticaria

はじめに

アニサキス(*Anisakis*)はイルカやクジラなど海獣を終宿主とする線虫である。幼虫はイワシ、アジ、スルメイカ、サンマなど多くの回遊魚に寄生し、さらにこれらを餌とするサバ、タラなどにも高頻度で集積する¹⁾。アニサキス幼虫の寄生した魚介類を生食すると同幼虫が胃や腸の粘膜に穿入し、アニサキス症を引き起こすことがある。

一方、海産魚介類による蕁麻疹は昔から知られており、「サバ」、「光りもの」、「背の青い魚」が直接原因と考えられてきた。しかし、最近これら蕁麻疹においてアニサキス幼虫の抗原に起因するアレルギー反応が関与している可能性が指摘された²⁾。そこで、アニサキス症とともにアニサキスアレルギーによるアレルギー反応も包括して「アニサキス関連疾患」として捉え、これら疾患群における特異 **IgE** 測定の診断的価値を **AlaSTAT** を用いて検討する。

材料と方法

1. 抗原

スケトウダラ (*Theragra chalcogramma*) 内臓を人工胃液(ペプシン1g, 濃塩酸7ml/l)にて消化しアニサキス幼虫 (*Anisakis simplex*, 3rd stage) を採集した³⁾。無菌の生理食塩水(0.9%)にて幼虫をよく洗い魚の内臓残渣を取り除き、4℃の無菌生理食塩水中で4~5時間静置し、再び洗浄した後、生理食塩水30~50mlに対し100匹に調整し、37℃にて無菌的に培養した。生理食塩水は12~24時間ごとに交換し凍結保存した。培養上清はポアサイズ0.45μmのメンブランフィルターを通過させ、遠心分離方式の限外濾過(セントリカット; クラボウ, 大阪)にて分子量20000以下の分画を集めた。これを凍結乾燥し、初めの容量の1/20~50の蒸留水で再溶解後、生理食塩水で透析し、濃縮した。これを分泌(ES)抗原とした。なお、熱に対する安定性は100℃、15分間加熱後、陽性患者にスクラッチテストを行い確認した。

スクラッチテスト用の虫体抗原はアニサキス幼虫を凍結乾燥し、エーテルで脱脂後 VBS (NaCl 42g, NaHCO₃ 1.3g, sodium 5.5-diethyl barbiturate 1.5g, 5.5-diethyl barbituric acid 2.3g/l) にて抽出、透析して得た⁴⁾。蛋白量2.8mg/mlにて使用し、膨疹5mm以上、もしくは発赤15mm以上を陽性とした。

2. 対象

胃アニサキス症(虫体摘出例)32例、胃内視鏡検査を行うも虫体を確認できなかった海産魚の生食による腹痛症9例、回虫胆道迷入症3例、いわゆるサバ蕁麻疹

Received: August 8, 1991

Accepted: November 6, 1991

疹12例, 原因を特定できなかった蕁麻疹24例, の各患者群および, アニサキス症も蕁麻疹の経験もない健康対照群20例についてアニサキス特異 IgE の測定と, 一部にスクラッチテストを実施した。

3. 特異 IgE の測定 (AlaSTAT)

特異 IgE の測定は AlaSTAT (日本 DPC 社, 東京) を用いて行った. ES 抗原を Shami ら⁵⁾の方法で AlaSTAT 用液相アレルゲンとした後, 型どおりの方法にて測定した⁶⁾. 結果は IU/ml もしくはクラス (0~4) で表し, 0.35IU/ml (クラス 1) 以上を陽性と判定した。

4. 希釈, 抑制試験および非特異的吸着の検討

予備検査で陽性であった 4 検体および陰性であった 3 検体をそれぞれ混合し, 陽性プール血清, 陰性プール血清とし, 希釈試験, 抑制試験に使用した. 希釈試験は, 検体の 2 倍希釈系列をウマ血清にて 1:16 まで作成し, AlaSTAT で測定して行った. 抑制試験は, 検体 40 μ l に, インヒビターとして 5 倍希釈系列とした ES 抗原 10 μ l を添加し, 室温で 1 時間反応させた後同様に測定して行った. また, 非特異的吸着を調べるために, IgE 骨髄腫患者血清を総 IgE 量 10000IU/ml に調整して用いた。

成績

1. 分泌 (ES) 抗原の性状

アニサキス幼虫 ES 抗原は分子量 2 万以下の分画にも十分なアレルゲン活性が認められた. またこの分画は熱により有意な皮膚反応惹起能の低下が認められた

Table 1 Effects of heat on each fraction of excretory/secretory antigen of *Anisakis* larvae

Fraction	Heat treatment	Size of erythema in scratch test (mm)
Crude	—	34.3 $\pm$ 2.3 ^a
MW $\leq$ 20000 ^b	—	34.3 $\pm$ 3.0
MW>20000 ^c	—	32.7 $\pm$ 3.8
MW $\leq$ 20000	+	24.3 $\pm$ 2.3
MW>20000	+	20.3 $\pm$ 2.9

a Size of erythema $\pm$ standard error, p-values were calculated by Student's t-test.

NS; not significant

b Molecular-sieve (20000) passed fraction

c Sieve retained and reconstituted to the original volume

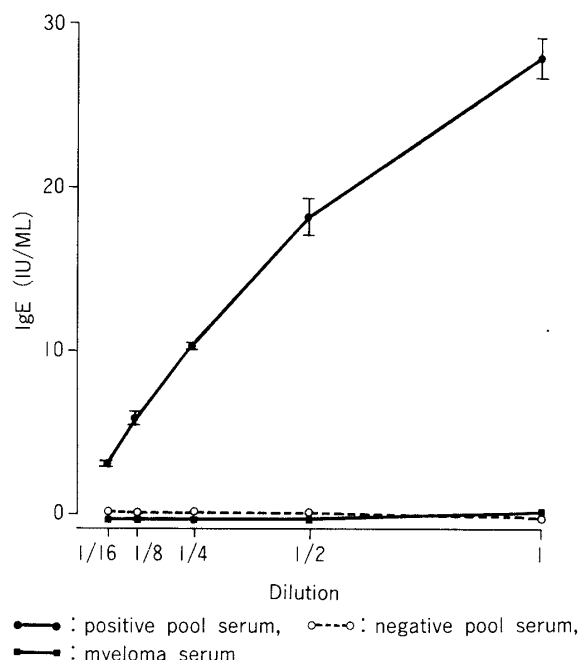


Fig. 1. Influence of dilution of sample.

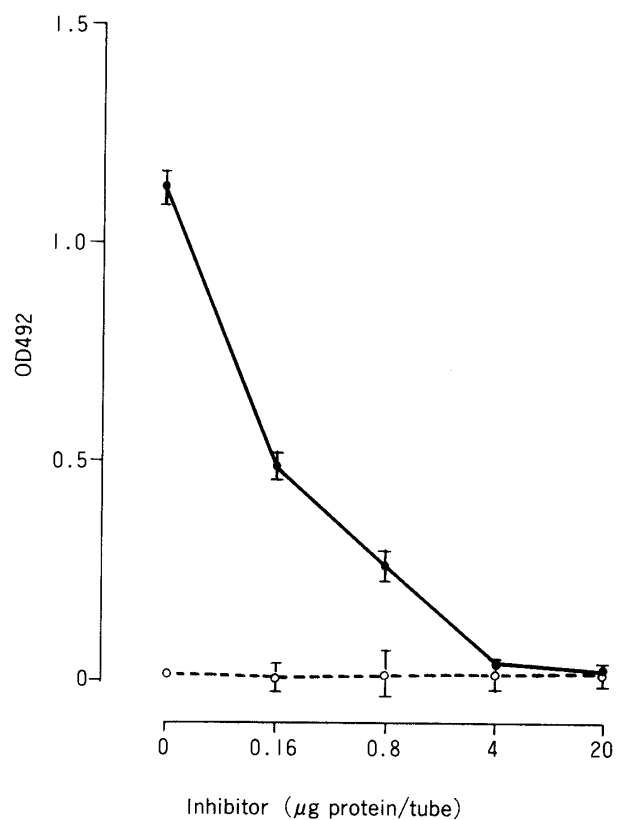


Fig. 2. Competitive inhibition by adding excretory/secretory antigen.

ものの、依然活性を失なわなかった (Table 1).

2. ES 抗原を用いた AlaSTAT による特異 IgE の測定では非特異的な吸着もほとんどみられず、特異 IgE 量にほぼ比例した値を得ると同時に (Fig. 1), ES 抗原の添加により容量依存的に抑制された (Fig. 2).

3. AlaSTAT とスクラッチテストの相関

幼虫体抗原によるスクラッチテストとの一致率は 85.7% と高かった (Table 2).

4. 各種寄生虫患者血清の反応性

胃アニサキス症患者血清では 32 例中 28 例 (87.5%) が AlaSTAT 陽性であった (Table 3). 初診時と感染 10 日以上経過した時期とのペア血清による検査が可能であった 4 例においては抗体価の上昇が明らかとなった. うち 2 例は初診時にすでに陽性であった (Fig. 3). 回虫の胆道迷入症の 3 例はすべて陰性であった. アニサキス症を疑われた腹痛症例では 9 名中 6 名 (66.7%) が AlaSTAT 陽性を示した (Table 3).

4. 蕁麻疹患者血清の反応性

いわゆるサバ蕁麻疹患者群では AlaSTAT 陽性が 75.0% と、蕁麻疹の原因が特定できなかった患者群の

Table 2 Correlation between the scratch test and AlaSTAT

AlaSTAT	Scratch test	
	Negative	Positive
Positive	1	13
Negative	17	4

Correspondent = $(13 + 17) / (1 + 13 + 17 + 4) \times 100 = 85.7 (\%)$

Sensitivity = $13 / (13 + 4) \times 100 = 76.5 (\%)$

Specificity = $17 / (1 + 17) \times 100 = 94.4 (\%)$

Table 3 Percent positive of Ala STAT in each group

Group	Percent positive
Anisakiasis (n=32)	87.5
Undiagnosed abdominal pain (n=9)	66.7
Mackerel-induced urticaria (n=12)	75.0
Unknown urticaria (n=24)	8.3
Ascariasis (n=3)	0
Control (n=20)	10.0

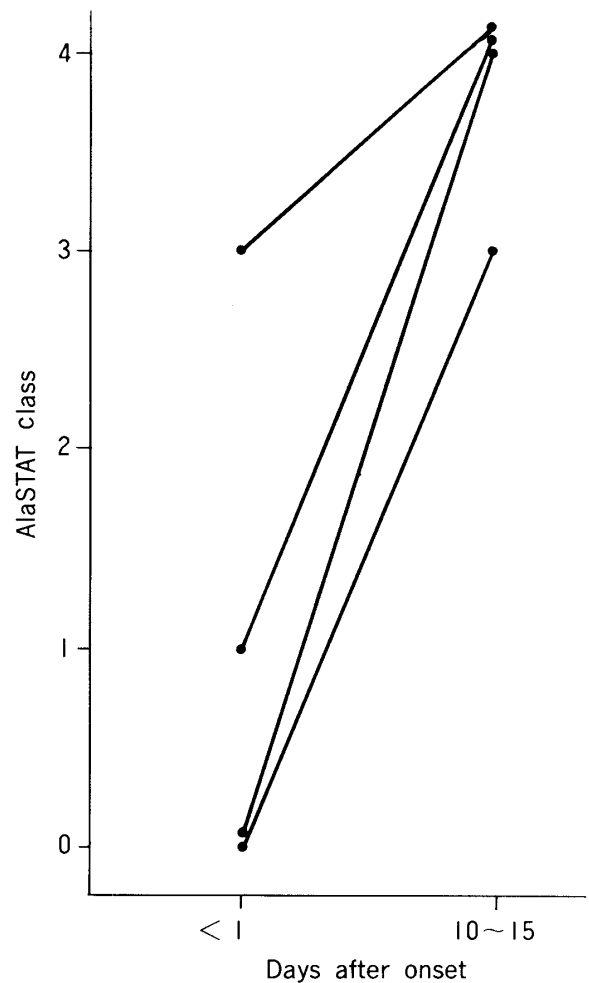


Fig. 3. AlaSTAT classes among paired samples from gastric anisakiasis.

8.3%, 対照群の 10.0% に比べ極めて高い陽性率となった. さらに, AlaSTAT 陽性率の高い群ではすべて特異 IgE 値も有意に高かった (Fig. 4).

考 察

アニサキス症の血清学的検査法は未だに確立されていない. その理由は第一に, アニサキス症患者が医療機関を受診するのは大半が発症後 24 時間以内であり⁷⁾, この時点で抗体を検出することが難しい. 第二に, 極めて安定した角皮 (cuticle) に覆われた直径 0.2 mm からせいぜい 1 mm 程度の幼虫が 2~3 mm ほど穿入するだけで, 抗体産生に十分な量の抗原が注入されるか疑問である. 第三に, 日本人の食習慣から, すでに不顕性の感染, 感作を受けている人も多く, 抗体が検出されても診断的意義が薄い. 今回, 私達が初めて

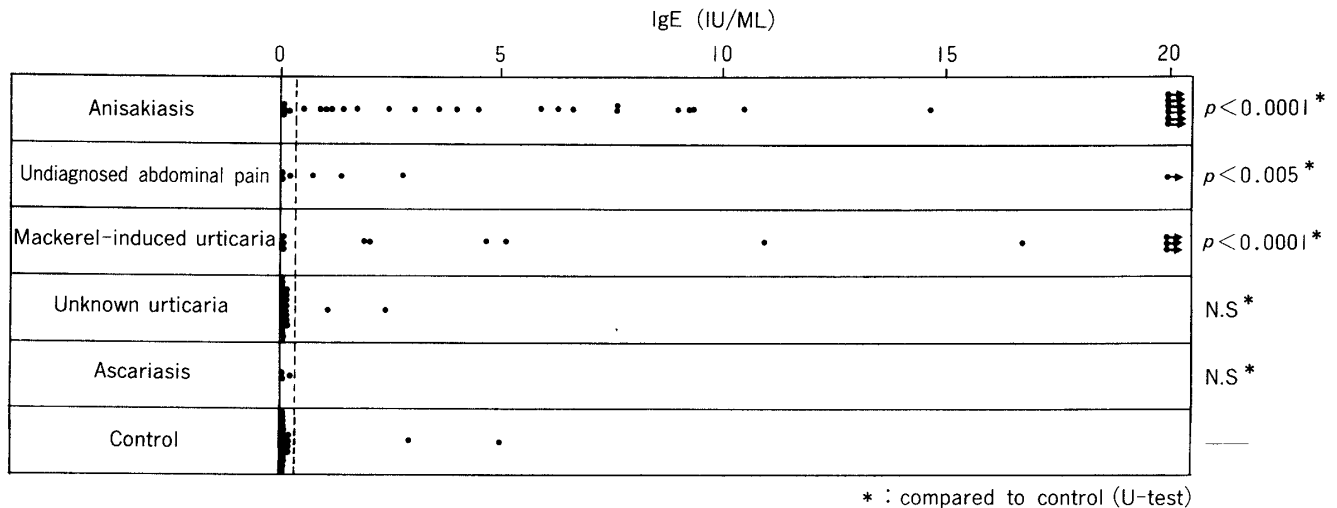


Fig. 4. AlaSTAT IgE value in each group.

試みたアニサキス幼虫のES抗原を用いたAlaSTATでは胃アニサキス症の患者で87.5%と極めて高い陽性率を示した (Table 3). ところが, これまでの経験からすると, ゲル内沈降反応や酵素抗体法による特異IgMやIgGの検出は不可能である例も少なくなかった. なお, 今回初診時にすでにAlaSTAT陽性であった患者もいたが, これは感染前からの抗体保有の可能性もあり, この時点での診断的価値は今後検討の必要がある. しかし, ペア血清による判定は十分意義があると思われる (Fig. 3). アニサキス虫体が検出されなかった腹痛症のなかにAlaSTAT陽性者が高率に存在したことは興味深い (Table 3). 内視鏡検査の発達により胃アニサキス症の診断, 治療は容易になったものの, 腸アニサキス症は腸切除によりはじめて発見される例が多いからである⁹⁾.

一般に線虫間での交叉反応性は高く, 本検査の陽性をもってアニサキス症と断定する訳にはいかない場合もある. しかし, 近縁種である回虫症, しかもより感作を受けやすい迷入症例においてもAlaSTATが陰性であったことは興味深い. 他の幼虫移行症における陽性率も今後検討に値する.

いわゆる「サバ蕁麻疹」の直接原因が魚肉そのものではなくアニサキス幼虫抗原である可能性については既に指摘したが, それは次のような根拠である. 1) サバを食べても必ず蕁麻疹が出現するとは限らない. 2) 同一患者でサバ以外にマグロ, イカ, イワシ, サンマ等を食べた場合に蕁麻疹をみることがある. 3) サバ抽出液による皮膚反応が陽性となる例は極めて稀である. 原因を魚肉と考えるとこれらの事実はアレルギー

反応の原理から大きく外れる. アニサキス幼虫抗原を真の原因と考えるなら矛盾は解消される. なお, 生魚を食べて蕁麻疹を引き起こす症例の一部にアニサキス症そのものが含まれていることがある⁹⁾. この場合, 穿入した虫により注入されたES抗原が蕁麻疹の一因となることが考えられる. 焼き魚やフライでは虫は死ぬからアニサキスの感染は起こらない. これらを食べても出現する蕁麻疹は同虫の抗原が消化管より体内に取り込まれて引き起こされるものと推察できる. ES抗原が100℃, 15分程度の熱では完全に失活されることのない低分子物質を含む点はこれを支持する. 「サバ蕁麻疹」の患者は自分の蕁麻疹の原因を相当強く自覚していることが多く, サバは決して食べないという者がほとんどである. 従って, 新たな抗原刺激が全くない状態で永年経過する場合もあり得る. この患者群の中に, 長期間感作され続ける皮膚テストが陽性であっても血清抗体価を反映するAlaSTATが陰性の者がいても論理的矛盾はない (Table 2). 一方, 原因が特定できない蕁麻疹群においてはアニサキスAlaSTATの陽性率は極めて低値であった. しかし, 抗体価の高い患者に関しては「サバ蕁麻疹」を疑ってみる価値はある. 原因魚がその都度異なってもアニサキス幼虫の寄生という共通項が潜んでいる可能性があるからである.

今回, 私達はES抗原の分子量2万以下の分画をAlaSTATに用いた. この分画は皮膚に蕁麻疹反応を引き起こす十分な活性があり (Table 1), AlaSTATにおいては幼虫体抗原による皮膚テストとの高い相関も証明できた (Table 2). この分画は必ずしもアニサキス特異抗原とは言えず, 他の幼虫抗原との交叉反

応も予想される¹⁰⁾。しかし、十分なアレルゲン活性を有した分画であることは間違いない。さらに経口感作アレルゲンとしても興味深い分画である。従って、アレルゲンの検索を目的とする AlaSTAT 用抗原としては、収量も多く申し分ない。

アニサキス抗原に強い好酸球遊出能があることは実験的にも確かめられている。実際、アニサキス症例における周辺組織の好酸球浸潤は極めて著明である。現在、好酸球性胃腸炎は原因不明とされている¹¹⁾。これらの中にはアニサキス特異抗体が検出されることにより病態が明確になる症例が含まれるかもしれない。

以上より、AlaSTAT によるアニサキス特異 IgE の測定は、アニサキス症の診断のみならず、蕁麻疹、腹痛などの原因としてアニサキスが関与するか否かの決め手としても重要な意義を持つものと思われた。

胃アニサキス症患者血清を提供いただいた国立公衆衛生院寄生虫部荒木国興博士、AlaSTAT キットを作成いただいた日本 DPC 社に深謝する。

文 献

- 1) 影井 昇：アニサキス症。感染・炎症・免疫 19, 184-198, 1989.
- 2) Kasuya, S., Hamano, H. and Izumi, S.: Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet* 335(8690), 665, 1990.
- 3) Tanaka, J. and Torisu, M.: *Anisakis* and eosinophil. I. Detection of a soluble factor selectively chemotactic for eosinophils in the extract from *Anisakis* larvae. *J. Immunol.* 120, 745-749, 1978.
- 4) 伊藤洋一：免疫学的検査法。“医寄生虫学”初版(石崎 達 編), 第一出版株式会社, 東京, pp.203-204, 1974.
- 5) El Shami, A.S. and Alaba, O.: Liquid-phase in vitro allergen-specific IgE assay with in situ immobilization. In “Advances in the Biosciences. Vol. 74, Allergy and Molecular Biology” (ed. by A.S. El Shami and T.G. Merrett), Pergamon Press, Oxford, pp.191-201, 1989.
- 6) 伊藤幸治, 宮本昭正, 牧野莊平, 福田 健, 九嶋敦, 他：新しい IgE 抗体測定法, AlaSTAT の有用性の検討。アレルギー 40, 444-453, 1991.
- 7) Ohtaki, H. and Ohtaki, R.: Clinical manifestation of gastric anisakiasis. In “Gastric Anisakiasis in Japan” 1st ed. (ed. by H. Ishikura and M. Namiki), Springer-Verlag, Tokyo, pp.37-46, 1989.
- 8) Ishikura, H.: Clinical features of intestinal anisakiasis. In “Intestinal Anisakiasis in Japan” 1st ed. (ed. by H. Ishikura and K. Kikuchi), Springer-Verlag, Tokyo, pp.89-100, 1990.
- 9) Kasuya, S., Hamano, H. and Izumi, S.: Gastric anisakiasis with anaphylactoid reactions. *ACI News* 1, 140-141, 1989.
- 10) 中田博文, 山本泰朗, 山本泰猛：急性消化アニサキス症における IgE 型および IgG 型アニサキス抗体とその対応抗原の分析。日消誌 87, 762-770, 1990.
- 11) Talley, N.J., Shorter, R.G., Phillips, S.F. and Zinsmeister, A.R.: Eosinophilic gastroenteritis; a clinicopathological study of patients with disease of the mucosa, muscle layer, and subserosal tissues. *Gut* 31, 54-58, 1990.

SIGNIFICANCE OF DETECTION OF SPECIFIC IgE IN ANISAKIS-RELATED DISEASES

Shiro Kasuya and Kaori Koga

Department of Parasitology, Gifu University School of Medicine

Anisakis larvae which parasitize sea fishes sometimes cause not only anisakiasis but also such allergic reactions as mackerel-induced urticaria. We prepared AlaSTAT by using excretory/secretory antigens from *Anisakis* larvae to detect specific IgE in various patients groups.

The AlaSTAT positive rate was 87.5% in gastric anisakiasis patients who were endoscopically diagnosed, while it was 66.7% in patients who had acute abdominal pain but no larva detected. Ascariasis in the common bile duct was 0%. The positive rate in mackerel-induced urticaria patients was 75.0%, while it was 8.3% and 10.0% in patients with urticaria of unknown origin and normal controls, respectively.

Based on these data, the detection of specific IgE using AlaSTAT is useful in elucidating the cause of urticaria or acute abdominal pain, such as *Anisakis*.