

〔原 著〕

Enzyme Linked Immunosorbent Assay による アニサキス幼虫粗抗原特異 IgE 抗体の検出

広島大学医学部寄生虫学教室

竹本裕美 辻 守康

Key words: anaphylaxis — anisakiasis — *Anisakis* larvae specific IgE —
antigen determinant fraction — ELISA

(受付: 4月23日, 1985)

はじめに

アニサキス症の発症に IgE 抗体が関与することは、動物実験¹⁾や症例報告²⁾³⁾からも十分想定されている。著者らは、IgG に比べ血中量が微量であるために高感度分析を必要とする IgE 抗体を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) で分析することを試みた。定量性と特異性を確かめた系で寄生虫症患者血清値を求めて、アニサキス症におけるアニサキス幼虫粗抗原特異 IgE 抗体の関与を検討した。また、作製した系を用いてアニサキス症患者 5 人の血清のアニサキス幼虫分画抗原に対する挙動を調べ、系で用いる粗抗原の意義について考察をした。

材料および方法

1) 粗抗原の作製

アニサキス幼虫粗抗原は、市販のサバより得られた幼虫を東儀⁴⁾と同様な方法で作製した。すなわち、サバ腹腔から収集したアニサキス幼虫の凍結乾燥虫体を 0.1% 食塩水中で磨砕後、凍結融解を 5-6 回繰り返しながら磨砕抽出し、8000×g 1 時間遠沈しその上清をビスキングチューブで透析後凍結乾燥した。

2) 標識抗体

蛋白濃度は goat serum protein で 5.0mg/ml に調製してあり、マイクロプレートによる直接法 ELISA

でウシ、ウサギ、ウマ、モルモット、マウス、ラットの免疫交叉性が 1.0% 以下で、ヒト IgG, ヒト IgA, ヒト IgM, 正常人ヒト血清との免疫交叉性が 5.3% 以下のデータが付加された TAGO 社の goat anti-human IgE-HRPO (Lot. 94-07-01) を用いた。

3) ELISA

シオノギチューブ (13×72mm) を抗原吸着体とした。抗原をコーティングしたチューブに希釈した患者血清 0.5ml を加え、37℃ で 2 時間保温して血清を洗浄除去後、希釈した標識抗体 0.5ml と更に 37℃ で 2 時間反応させた後洗浄した (Chart)。基質として用時調製した O-phenylenediamine (OPD) 溶液 0.5ml を加えて暗所、37℃ で 30 分間反応後 3.67N H₂SO₄ 0.5ml 加えて反応を停止させ、直ちに 492nm における吸光度 (OD₄₉₂) を測定した。

特異的 IgE 抗体値は、血清のかわりに洗浄液 (0.02 M PBS pH 7.3/0.5% BSA/0.05% Tween 20) を加えて反応させたブランクの OD₄₉₂ (B) を各検体の OD₄₉₂ の平均値 ($\bar{x}$) より減じて、同一患者血清による基準血清の OD₄₉₂ (Sn) で補正した値に 1000 を乗じて表示した。

特異的 IgE 抗体値 = $(\bar{x} - B) \times \frac{0.229}{\text{Sn} - B} \times 1000$ Sn : n
回目の測定における基準血清の OD₄₉₂, 0.229 : 1 回目の測定における S₁ - B による値

4) オクテロニー法

辻の方法⁵⁾に準じた。すなわち、0.9% のアガロース液を支持体として、抗体はアニサキス幼虫 0.1% 食塩水抽出乾燥抗原 20mg を 0.1ml の蒸留水に溶解したものを使用した。

Abbreviations: ELISA enzyme linked immunosorbent assay; OD₄₉₂ optical density at 492nm; OPD O-phenylenediamine

5) 対象

対象には、全国から寄生虫症診断のために寄せられた血清を用いた。使用した血清は、虫体が確認された症例、生鮮魚介類を摂取後腹痛を訴え内視鏡およびレ線所見で臨床的にアニサキス症が疑われた症例、およびいずれかの蠕虫抗原におけるオクテロニー法で陽性を示した症例の計147例154検体である。また、アニサキス幼虫特異 IgE 抗体が測定されているのを確認するために、オクテロニー法でアニサキス抗原に陰性で総 IgE 値のみ高値を示した血清25検体も用いた。コントロールには、白血球及び好酸球増多などを示さず、また、いずれの蠕虫抗原でもオクテロニー法による反応が陰性であった29例を用いた。

6) データの統計処理

F検定で母分散が等しいデータは student's test で、異なるデータは Aspin-Welch 法で有意差を調べた。

成績

1) コーティング条件

粗抗原をローリー法⁶⁾による蛋白量で320 μ g/ml から1.25 μ g/ml まで順次希釈してコーティング後、chart に準じた予備実験で高い OD₄₉₂ の得られたアニサキス症患者プール血清の30倍希釈溶液で反応を行っ

た結果、OD₄₉₂は5.0 μ g/ml で飽和値に達したので20 μ g/ml をコーティング濃度とした。

また、4℃と37℃におけるチューブへの粗抗原(20 μ g/ml) コーティングの経時的変化を同プール血清の30倍希釈液を用いた ELISA で調べた結果、37℃では1時間後に飽和値に達し、18時間後にも OD₄₉₂ の低下がみられなかった(Fig. 1)ので、37℃で2時間保温後4℃で一昼夜保存して使用した。

2) 非特異的吸着の検討

シオノギチューブへの非特異的吸着の関与を調べるために、アニサキス幼虫抗原、著者血清及び標識抗体を用い chart に準じて ELISA を行った結果、Table 1 に示すように著者血清のみ加えなかった case 7 で大

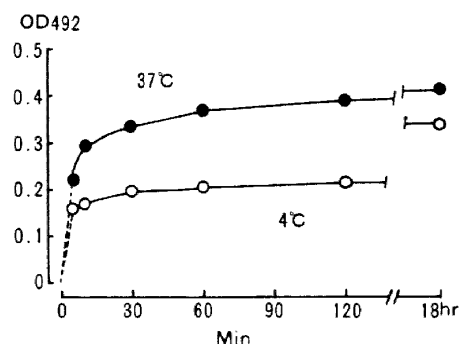


Fig. 1. Time course of coating.

Sera : diluted sera (1:30) from patients. Antigen : 20 μ g/ml.

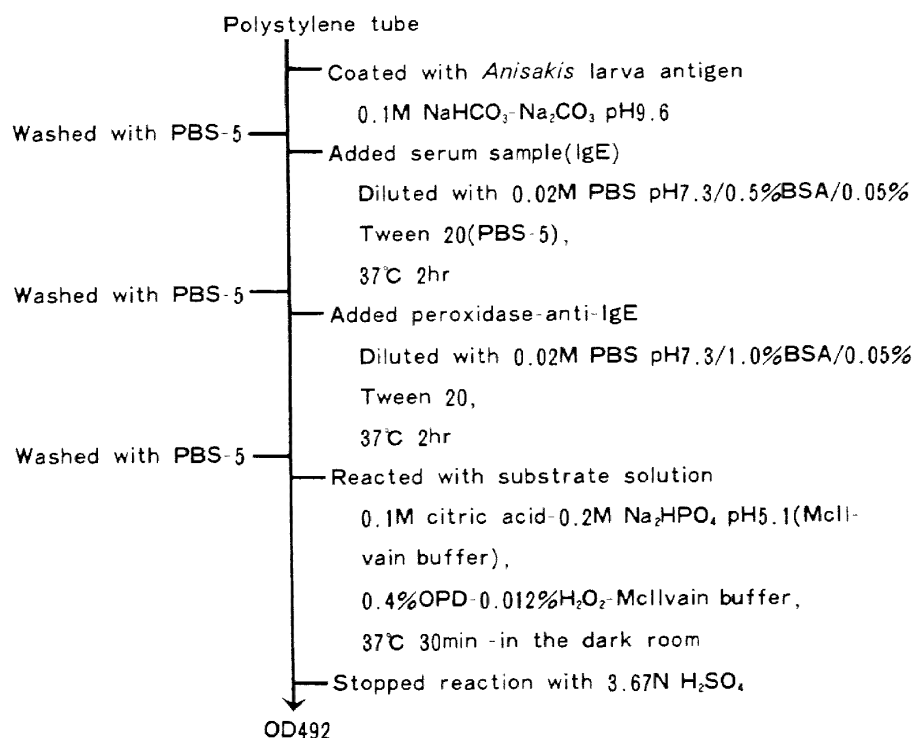


Chart. Procedure of ELISA.

Table 1 Non-specific adsorption on polystyrene tube

Case No.	<i>Anisakis</i> larvae (20 μ g/ml)	Author's serum (1:10)	Peroxidase-conjugate (1:500)	OD492 (N=5) mean $\pm$ S.E.	Adsorption
1	—	—*	—*	0.04 $\pm$ 0.005	—
2	—	—*	+	0.06 $\pm$ 0.007	±
3	—	+	—*	0.04 $\pm$ 0.003	—
4	—	+	+	0.07 $\pm$ 0.006	±
5	+	—*	—*	0.05 $\pm$ 0.009	±
6	+	+	—*	0.04 $\pm$ 0.004	—
7	+	—*	+	0.11 $\pm$ 0.006	+
8	+	+	+	0.32 $\pm$ 0.020	+

*: Buffers for each dilution(See chart.)

きな吸着がみられた。

3) 標識抗体の使用濃度

微量であると予想される特異 IgE 抗体を検出するために、chart に準じた方法で予備実験を行った際、血清のかわりに PBS-5 を加えた場合よりも高い吸光度の得られた著者自身の血清を用いて条件検討を行った。なお、著者血清はオクテロニー法で蠕虫抗原に対しては陰性であった。この著者血清を順次 3 倍希釈して各濃度の標識抗体で反応を行ったところ、OD₄₉₂ は血清濃度に依存して高値を示した (Fig. 2)。標識抗体の至適濃度は、著者自身をアニサキス不顕感染者とした場合も考慮に入れて、1:1000 (5 μ g/ml) の希釈濃度とした。

4) 特異性の検討

アニサキス幼虫粗抗原特異 IgE 抗体測定の特異性を検討するために、アニサキス症患者血清の 10 倍希釈液 (最終濃度) とアニサキス幼虫粗抗原の 20 μ g/ml から 2×10^{-3} μ g/ml (最終濃度) の 10^6 倍希釈溶液を 37°C で 30 分間 preincubation 後、ELISA を行った。アニサキス幼虫粗抗原 20 μ g/ml および 2 μ g/ml との preincubation では 80%、 2×10^{-1} μ g/ml では 20% の阻害がみられた (Fig. 3)。

5) 定量性の検討

アニサキス症患者血清の 3 倍系列希釈液で検量線を作製し、定量性を検討した (Fig. 4) 結果、1:3 から 1:243 の間で相関係数 $r=0.979$ という良好な直線関係を示したので、作製した系では定量性があると判断した。また、定量性のある範囲のはば中央値であることより、患者血清の希釈は 1:30 とした。

6) 総 IgE 値が高値を示した血清 25 例のアニサキス幼虫特異 IgE 抗体値

総 IgE 値が 1000-23000 IU/ml を示し、オクテロニー

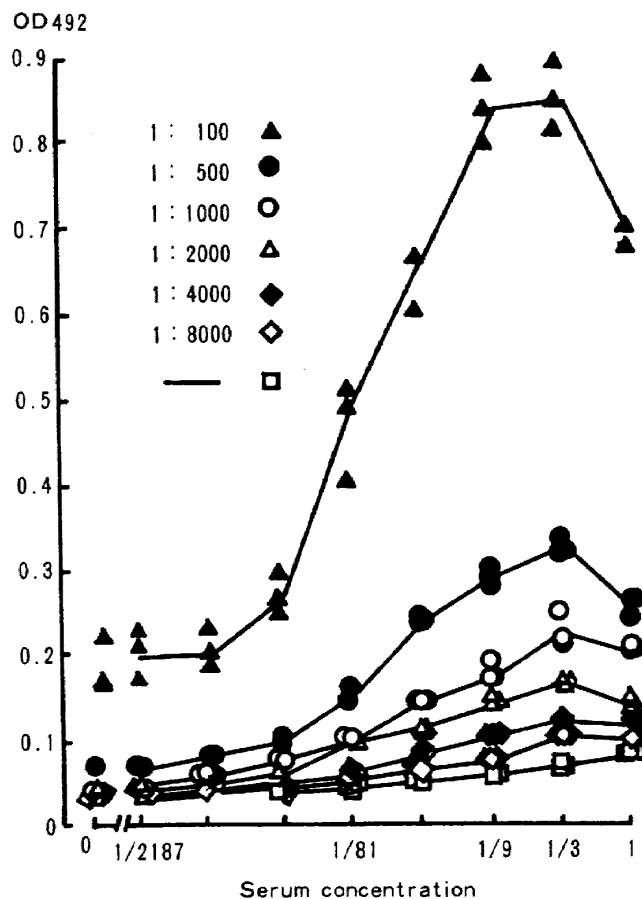


Fig. 2. Dilutions of conjugate.

1: X(100-8000): dilutions of conjugate (Peroxidase-anti-IgE). — is 0.02M PBS pH 7.3/1.0% BSA/0.05% Tween 20 without conjugate. Serum: author's serum.

法でいずれの蠕虫抗原にも陰性であった血清 25 例の特異 IgE 抗体は 69 ± 9 (mean $\pm$ standard error) でコントロール血清の 64 ± 6 との間に有意差は認められなかった。この結果からも、アニサキス幼虫粗抗原に特異的な IgE 抗体を測定していることが確認された (Table 2)。

7) 各種蠕虫症患者血清中のアニサキス幼虫特異 IgE 抗体値

Table 3 に本法による各種蠕虫症患者血清中のアニサキス幼虫特異 IgE 抗体値を示した。各種蠕虫症患者血清はオクテロニー法で対応する蠕虫抗原にのみ沈降線を作った。顎口虫、日本住血吸虫、肝蛭およびウエステルマン肺吸虫抗原と沈降線を作った患者血清はコントロール群との間に有意差を示さなかったが、イヌ蛔虫抗原と沈降線を作った血清 6 検体ではコントロール群との間に有意差を示し、低値であった。イヌ蛔虫患者血清の各特異 IgE 抗体値は 44, 107, 39, 65, 56 およ

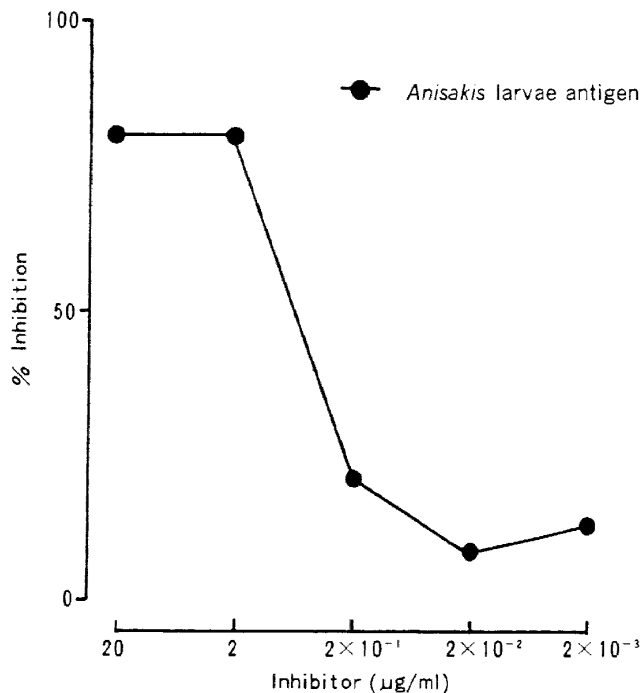


Fig. 3. Competitive inhibition ELISA.
Preincubation: 37°C, 30min. Sera: diluted sera
(1:10) from patients.

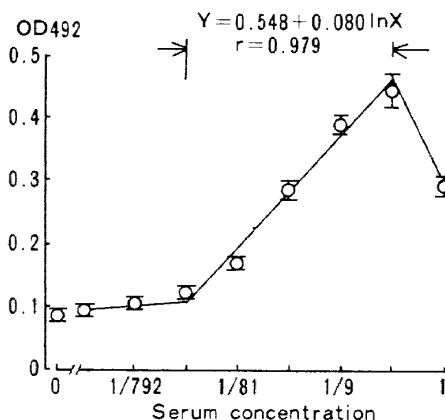


Fig. 4. Calibration curve with diluted sera from patients.

Each point is the mean $\pm$ S.E. of three determinations.

び38であった。糞線虫、瓜実条虫抗原にオクテロニー法で陽性であった患者血清の特異 IgE 抗体値はコントロールより低値であった。

8) アニサキス症患者血清中のアニサキス幼虫特異 IgE 抗体値

アニサキス症患者血清中のアニサキス幼虫特異 IgE 抗体値を Table 4に示した。生鮮魚介類を食べて腹痛を訴えた患者血清66検体のうち、オクテロニー法でアニサキス幼虫抗原に陽性の41検体は、コントロールに

Table 2 The values of *Anisakis* specific IgE in sera with high total IgE

No. of sera	Total IgE (IU/ml)	Specific IgE	No. of sera	Total IgE (IU/ml)	Specific IgE
1	23184	30	14	2800	71
2	17952	61	15	2685	38
3	12000	93	16	2600	95
4	6500	137	17	2263	170
5	5535	82	18	2251	44
6	5150	0	19	2000	50
7	4500	117	20	1770	30
8	4300	30	21	1664	83
9	4000	185	22	1400	39
10	3467	6	23	1300	62
11	3000	111	24	1000-2000	15
12	2950	65	25	1700-1900	65
13	2950	38	control(n**=29)		64 $\pm$ 6

* All cases show negative results with helminthic antigen by means of Ouchterlony. **:Number.

Table 3 The values of *Anisakis* specific IgE in sera from several Helminthiasis patients

Sera: Ouch(+) of	Number of cases	M $\pm$ SE
Control(Ouch(-))	29	64 $\pm$ 6
Antigen:		
<i>Toxocara canis</i>	6	58* $\pm$ 11
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	16
<i>Gnathostoma spinigerum</i>	7	77 $\pm$ 9
<i>Schistosoma japonicum</i>	3	84 $\pm$ 70
<i>Schistosoma mansoni</i>	2	87
<i>Fasciola hepatica</i>	3	85 $\pm$ 19
<i>Paragonimus westermani</i>	9	84 $\pm$ 22
<i>Dipylidium caninum</i>	1	25

M $\pm$ SE: Mean $\pm$ standard error. *Significantly different from control ($p < 0.05$).

Table 4 The values of *Anisakis* specific IgE in sera from patients

Sera	N	M $\pm$ SE
Control	29	64 $\pm$ 6
Ouch(+) of <i>Anisakis</i> larvae antigen	97	98* $\pm$ 14
Group I: Patients with abdominal pain after taken raw fish	66	89* $\pm$ 7
Ouch(+) of <i>Anisakis</i> larvae antigen	41	93* $\pm$ 9
Ouch(-) of <i>Anisakis</i> larvae antigen	25	82 $\pm$ 10
Group II**: Patients detected larvae	28	97* $\pm$ 9
Ouch(+) of <i>Anisakis</i> larvae antigen	15	110* $\pm$ 15
Ouch(-) of <i>Anisakis</i> larvae antigen	13	81 $\pm$ 11

N: number of cases. M $\pm$ SE and *: See Table 3. **All cases of Group II are included in Group I.

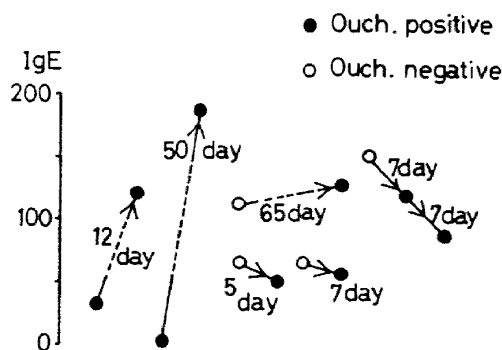


Fig. 5. Change of *Anisakis* specific IgE values in sera of anisakiasis.

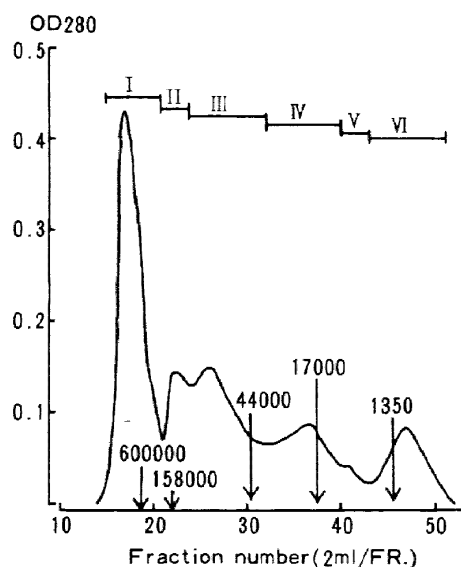


Fig. 6. Sephadex G-200 column chromatogram of *Anisakis* larve antigen.

Column size: 1.1φ×105cm, flow rate: 2.9ml/hr., OD280: optical density at 280nm. Standards eluted in the position of arrows with each molecular weight. Each fraction (I-VI) was pooled.

対して有意に高値であった。さらに、これら66検体のなかで虫体が確認された28検体のうち、オクテロニー法でアニサキス幼虫抗原に陽性の15検体でも同様にコントロールに対して有意に高値であった。アニサキス幼虫沈降抗体をもつ患者血清を他の蠕虫に感染している場合も含めて一つの群にした97検体と、コントロールとの間にも有意差が認められた。最も高い平均値は虫体確認され、オクテロニー法陽性のアニサキス症患者血清に認められた。

虫体が確認されたアニサキス症のうち、経時採血の行われた6例について、特異IgE抗体値と沈降抗体の有無を示した(Fig. 5)。2例は発症時すでに沈降抗体を有していたにもかかわらず特異IgE抗体値が低

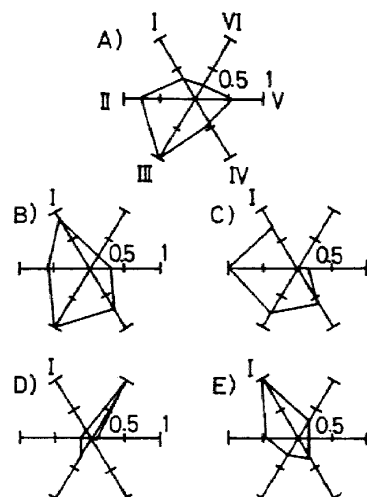


Fig. 7. Rader charts of fractionated *Anisakis* larve specific IgE components in sera from patients of anisakiasis.

A, B, C, D and E are sera from patients of anisakiasis. I, II, III, IV, V and VI show fraction number of Fig. 6.

かったが、それぞれ12日後、50日後には上昇していた。また、4例は発症後の検査で沈降抗体は陽転したが、特異IgE抗体値に著明な変化がみられなかった。

9) アニサキス幼虫分画抗原によるアニサキス症患者血清のELISA

アニサキス幼虫粗抗原をSephadex G-200カラムクロマトグラフィーで溶出し、280nmの吸収に基づくピークに従って6分画した(Fig. 6)。それぞれの画分をローリー法で蛋白定量し、20μg/mlとなるように希釈後0.5mlずつを常法に従ってコーティングして、高特異IgE抗体値を示したアニサキス症患者5人の血清でELISAを行った。最高値を示した画分のOD₄₉₂を1として各画分の吸光度の割合を示した(Fig. 7)。患者Eは抗原画分IによるELISAで高値を示し、患者Dは抗原画分IVに著しく高値を示した。また、患者A, BおよびCも各画分に対して異なる値を示し、ある画分のみが血清中特異IgE抗体に対し結合しているという結果は得られなかった。

考 察

アニサキス症は激しい腹部疼痛および幼虫穿入部位の好酸球性肉芽腫形成を特徴とする寄生虫症で、発症機序にはアニサキス幼虫の消化管への穿入による機械

的刺激⁷⁾⁸⁾や、幼虫の反復摂取によるアレルギー反応^{9)~12)}などが挙げられている。内視鏡で虫体を摘出除去した患者では、激しい疼痛が治まるものの腹部不快感は数日間続き、総 IgE 値が虫体穿入後 2 時間で著しく上昇する症例が知られている²⁾³⁾。アレルギー反応に関しては、従来より病理組織像から Arthus 型が想定されていたが、佐藤らはモルモットを用いた実験で I 型アレルギーの可能性も示した¹⁾。虫体の反復感作を受けているヒトにおいても同様に I 型アレルギー反応が起きていることは充分考えられる。そこで著者らは幾つかの発症因子のうちの 1 つとして I 型アレルギーに着目し、アニサキス症患者血清中のアニサキス幼虫粗抗原特異 IgE 抗体を定量して、非感染血清の値と比較した。IgE は IgG に比べてはるかに微量¹³⁾で測定が困難であると推察されたので、ELISA を用いた高感度定量法を検討した。Arthus 型反応を担っていると考えられる IgG を検出した ELISA では、比較的感度の低い¹⁴⁾ 5-aminosalicylic acid を基質としている⁹⁾が、本法ではより高感度¹⁴⁾の OPD を用いることにより、アニサキス症患者血清中の特異 IgE 抗体を測定することができた (Fig. 3)。またアニサキス症患者血清を用いた検量線でも、希釈率 1 : 3 から 1 : 243 の間に $r = 0.979$ という良好な直線性が得られ (Fig. 4)、本測定系が定量性のある系であり、アニサキス特異 IgE 抗体を精製単離すれば、血中の特異抗体の絶対値も求められることが示唆された。現段階では高抗体価をもつ患者血清を必要量得るのがむずかしいので、個々の検体測定値を補正して $OD_{492} \times 1000$ のままで表示した。ポリスチレンスピッツへの非特異的吸着は、血清のかわりに血清希釈用 PBS-5 を加えて操作した場合が一番大であった (Table 1) ので、個々の測定値よりブランクとして減じた。また、OPD は感光性であり、他の試薬も経時的に変化して毎回の測定値にずれが生じるのを補正するために、同一患者血清を基準 IgE 抗体血清として用いたので、測定値の信頼性は大きいと思われる。

本系では測定値が血清量に依存しており、定量性の確認はできたものの、アニサキス幼虫特異 IgE 抗体に特異的に結合しているか否か懸念されたので、阻害テストを行い、さらに入手し得た高 total IgE 血清を用いて検討した。阻害テストでは、アニサキス幼虫粗抗原の濃度に依存して、阻害された (Fig. 3)。このことは、本測定系がアニサキス幼虫 IgE 抗体を特異的に検出していることを示している。また、高 total IgE 血清中の特異 IgE 抗体の測定値もコントロールとの間に

有意差を示さず、アニサキス幼虫に特異的な IgE 抗体が測定されていることが確認された (Table 2)。

著者らは、定量性・特異性を充分検討したうえで、ELISA を用いて患者血清中の特異 IgE 抗体を測定した。内視鏡で虫体摘出直後すでにオクテロニー法でアニサキス幼虫抗原に陽性であった 15 例は虫体を反復摂取した患者と考えられ¹⁵⁾、特異 IgE 抗体値も高値であったことより、虫体の反復感作によるアレルギー反応にレアギン抗体が関与しているものと思われる。また、生鮮魚介類を食べて腹痛を訴えた患者においても、反復感作を受けた 41 例では特異 IgE 抗体が高く虫体が未確認であっても I 型アレルギー反応が関与していることが窺われる。

アニサキス幼虫抗原にオクテロニー法で陽性であった血清を無作為に選び、特異 IgE 抗体値を測定した場合も同様に高値を示した。わが国においては生鮮魚介類を食する習慣があることから、この被検者の大半もアニサキス幼虫に何らかの形で暴露されているものと思われる。

対応する他種蠕虫抗原のみに沈降線を生成した患者血清のアニサキス幼虫特異 IgE 抗体値はいずれの平均値も低値であった。各蠕虫疾患のうち、対応蠕虫にのみ感染している患者血清を多数例入手するのは困難なので、各蠕虫抗原をポリスチレンチューブにコーティングして、アニサキス症患者血清との免疫交叉性を調べる実験を進行中である。

本症の確定診断は内視鏡あるいは病理標本で形態学的に虫体を証明することであるが、簡便性に劣っており、迅速な免疫血清学的診断法が望まれている。ELISA は簡便で迅速なうえに検体の微量化も可能な抗体の定量法である。今回、著者らは発症の一因子を担うものとしてアニサキス幼虫特異 IgE 抗体を ELISA で測定した結果、I 型アレルギーの発症への関与が示唆された。しかし、特異 IgE 抗体値の患者によるばらつきが大きいこと、幼虫の不顕感染の可能性があり正常人と感染者の区別が困難であり、さらに初感染と再感染では IgE 抗体の変動の仕方が異なる可能性がある (Fig. 5) などの理由により、現在の系をそのまま免疫学的診断法に応用するには、より詳細な検討が必要と思われる。

ELISA による免疫学的診断法は、吉村¹⁶⁾が虫体摘出をしたアニサキス症患者 8 例の pair 血清による特異 IgG、IgM、IgA および IgE 抗体価の変動を調べることによって試みている。IgA 抗体は 7 例で上昇し、IgE 抗

体は6例で上昇し2例で下降したと報告しており、著者らが得た結果 (Fig. 5) でも同様の傾向が得られた。著者らが入手し得た経時採血例は6例であり、吉村の場合と同様に少数例ではあるが、オクテロニー法による沈降線の生成から初感染と再感染を区別すれば、再感染では速やかにレアギン抗体が作られていることが想定され興味深い。吉村らはIgA抗体の変化を観察することがヒトの臨床例においてはより鋭敏な診断法となり得ると述べており、今後のより多数例の検討が待たれる。

鈴木ら¹⁷⁾は、radioallergosorbent test でアニサキス幼虫ヘモグロビンに反応する特異IgE抗体を測定し、同抗原による皮内反応との間に相関関係が認められなかったと報告している。アニサキス幼虫ヘモグロビンは、免疫したウサギで最も強い沈降反応、凝集反応を示したアニサキス幼虫抗原¹⁸⁾⁻²⁰⁾として単離された。しかし、これらの反応はIgGとIgMが担当しており¹³⁾、ヒトのIgEにも同様に強い抗原性を示すか否かは確かめられていない。著者らは鈴木らと同様に Sephadex G-200カラムクロマトグラフィーでアニサキス幼虫粗抗原を分画して¹⁹⁾、確立したELISAで分画抗原による、高い特異IgE抗体値を示したアニサキス症患者血清の特異IgE抗体に対する抗原性の強さを比較した。アニサキス幼虫ヘモグロビンは著者らの画分Iに相当すると考えられる¹⁹⁾が、アニサキス症患者5人の血清中特異IgE抗体値は、それぞれ異なった抗原性を示し、画分Iに強い抗原性を示した患者は1人だけであった (Fig. 7)。この結果はヒトのIgE抗体産生には個体差があることを示しており、抗原中の1つの物質のみが抗体産生を促しているのではないことが窺える。したがって免疫診断などで多数の患者血清を扱う時は、精製された1つの物質による診断では信頼性が低下する可能性がある。また、免疫診断に用いる寄生虫抗原は、他の寄生虫抗原との免疫交叉性の問題も重要であるが、多数の患者血清の抗原性に対する個体差も考慮することが必要と思われる。

稿を終るにあたり、ポリスチレンチューブを供与頂きましたシオノギ製薬およびアニサキス幼虫粗抗原を供与頂きました当教室東儀博士に深謝致します。

文 献

- 1) 佐藤良也, 山下隆夫, 大鶴正満, 鈴木俊夫, 浅石和昭, 西野千郷: アニサキス症の発症機序の解析. 1. 消化管のアナフィラキシー反応. 寄生虫誌 24, 192-202, 1975.
- 2) 前田 淳, 小沢みや子, 足立ヒトミ, 井口孝伯, 飯田龍一, 永田早苗, 小沢俊総, 小俣好作: 緊急内視鏡検査で診断・治療した胃アニサキス症の1例. 救急医学 7, 111-114, 1983.
- 3) 長嶺敬彦: 急性胃アニサキス症一疼痛におけるアレルギー反応の関与を中心にして. アレルギーの臨床 4, 386-388, 1984.
- 4) 東儀宣哲: アニサキス幼虫抗原を用いた enzyme-linked immunosorbent assay 法によるアニサキス幼虫抗体の検出. 広大医誌 31, 963-970, 1983.
- 5) 辻 守康: 寄生虫蠕虫類の免疫電気泳動法について. 寄生虫誌 23, 335-345, 1974.
- 6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- 7) 河内秀希, 並木正義, 諸岡忠夫, 中川健一, 太黒崇: 急性症状を呈する胃アニサキス症一特に胃壁入穿内幼虫の内視鏡およびレントゲン所見とその臨床. 胃と腸 8, 31-38, 1973.
- 8) 長野一雄, 高木皇輝, 柳川一成, 大石圭一, 影井昇: 急性胃ヘテロケイルス症—Terranova decipiensによる. 胃と腸 8, 81-85, 1973.
- 9) 早坂 滉, 石倉 肇, 水柿 浩, 上野 鉄, 内海昭彦, 佐藤喜三, 佐伯 尚, 浅石利昭, 岩野英明: アニサキス症の実験的研究—とくにその病態の免疫病理学的解析を中心として. 最新医学 26, 1786-1800, 1971.
- 10) 岩永 大: アニサキス虫体成分によって惹起された好酸球増多. 寄生虫誌 19, 207-214, 1970.
- 11) 菊地由生子, 上田峻弘, 吉木 敬, 相沢 幹, 石倉肇: 腸アニサキス症の実験免疫病理学的研究. 医学のあゆみ 62, 731-736, 1967.
- 12) 小柳武久: アニサキス幼虫消化管移行症に関する実験的研究. 寄生虫誌 16, 470-493, 1967.
- 13) 菊地浩吉, 森 道夫, 今村正克, 谷内 昭, 坂岡博, 板倉克明, 石井良丈, 松本脩三, 菊地由生子: 4章 免疫グロブリンと補体. “医科免疫学, 改訂第2版”, 南江堂, 東京, pp.98-98, 1983.
- 14) 中尾 稔, 松田 肇, 田中 寛, 永田 傳: 日本住血吸虫症のELISAプレート法におけるペルオキシダーゼ標識抗体用の三種基質の比較. 寄生虫誌 30, 197-204, 1981.
- 15) 横矢 仁, 大江慶治, 三好秋馬, 日高 徹, 村上義視, 辻 守康: 急性症状を呈した胃アニサキス症の3例—特にその免疫血清学的診断法の意義に

- ついて、胃と腸 15, 1329-1335, 1980.
- 16) 吉村裕之：昭和57年度科学研究費補助金（一般研究 C）研究成果報告書，1983.
 - 17) 鈴木俊夫，石田和人，浅石和昭，西野千郷：アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究，6. radioimmunoassay による皮内反応ならびに間接赤血球凝集反応の再検討，寄生虫誌 25, 17-23, 1976.
 - 18) 鈴木俊夫：アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究，1. 電気泳動法による抗原の分析，寄生虫誌 17, 213-220, 1968.
 - 19) 鈴木俊夫，白木 公，大鶴正満：アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究，2. 抗原の分離，精製，寄生虫誌 18, 232-240, 1969.
 - 20) 鈴木俊夫：アニサキス症の免疫学的診断—特に抗原の分離，精製について，最新医学 24, 375-377, 1969.
 - 21) Hoffman, D.R.: Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for immunoglobulin E and blocking antibodies. *Methods Enzymol.* 73, 656-666, 1981.

DETECTION OF *ANISAKIS* LARVAE CRUDE ANTIGEN SPECIFIC IgE BY MEANS OF ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Yumi Takemoto and Moriyasu Tsuji

Department of Parastiology, School of Medicine, Hiroshima University

Semi-determination of *Anisakis* larvae crude antigen specific IgE in human serum was performed by the method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in order to study the relationship between anisakiasis and anaphylaxis. Using the Ouchterlony method, significantly higher values of specific IgE were obtained from sera with precipitin bands to *Anisakis* larvae crude antigen than from control sera. Especially high values were obtained from sera of anisakiasis.

To study the role of crude antigen for coating in ELISA in immunodiagnosis, crude antigen was fractionated into six parts on Sephadex G-200 column. Antigen determinant fraction of sera from five patients was investigated by ELISA. As a result, the antigen determinant fractions were showed difference with individual sera.