

平成14年度

寄生虫アニサキスに起因する食物アレルギーに関する基礎的検討

川中正憲・杉山広

(国立感染症研究所寄生動物部)

1. はじめに

食事をとることでアレルギー症状が引き起こされる「食物アレルギー」は、近年患者が増加の傾向にあり大きな社会問題になってきた。その原因食物としては、卵、牛乳、大豆などの農畜産物が有名であるが、我が国では魚介類の消費量が多いことから魚介類が卵に次ぐ主要な食物アレルギーの原因となっている。しかし、この魚介類アレルギーは、魚介類そのものがアレルゲンになっているのではなく、魚介類に寄生するアニサキス幼虫を原因とする場合が圧倒的に多いということが最近の研究結果から分かってきた^{1,2)}。

生きたアニサキスが関与するアニサキス症は、海産魚介類を食材の中心とする寿司、刺身といった日本人の日常食に起因しており、我が国では、年間に少なくとも2,000~3,000名のアニサキス幼虫による急性胃腸炎患者が出ていると推定されている³⁾。しかしながら、生きた虫体が直接的には関与しないアニサキス・アレルギー症の実態に関しては、必ずしも研究が進展していない。粕谷らはアニサキスのアレルゲンを、加熱によって不活化されるものと耐熱性(100℃, 15分)のものに分けているが⁴⁾、後者についてはShimakuraらが分子量21,000のタンパク質として精製し、DNAの塩基配列をも決定したのはごく最近である⁵⁾。そこで我々は、このアレルゲンにつきマルトース結合性タンパク質とのリコンビナントタンパク質として大腸菌で多量に産生させ、診断用の試薬として

利用する事を試みた。

ところで、海産魚介類の生食といった食習慣が我国ほど盛んではないと見られるスペインにおいて、1995年以後150例以上ものアニサキス・アレルギーが報告されている⁶⁾。これらの症例報告の特徴は、加熱や冷凍による寄生虫の殺滅処理を施された海産魚の摂食や取り扱い作業によってアニサキス・アレルギー症が発生していることである。しかも、スペインで報告されている症例には関節炎、皮膚炎、喘息あるいは結膜炎といったわが国では報告されていない様々な病態のものがある。この彼我の相違は、一体何に基づくものなのか、極めて興味ある問題であると思われる。そこで我々は、この原因が「アニサキス」そのものの相違にある可能性を想定し、分子生物学的な手法でスペイン産と日本産との虫体の比較を試みた。

実施した実験の報告に入る前に、アニサキスとそれが引き起こす病気について若干の解説を述べる。

1.1 アニサキスとは

アニサキスは本来ヒトの寄生虫ではなく、その成虫がクジラなどの海産哺乳類の胃に寄生する回虫の仲間である。成虫によって生み出された虫卵は、糞便とともに海中に放出されて孵化幼虫となり、オキアミなどの甲殻類に捕食されて第三期幼虫に発育する。オキアミと共に体内に潜む幼虫が小魚に摂食されると、新しい宿主の体内で同じ第三期幼虫のまま留まって寄生を続ける。こうして自然界の「食う・食われる」という関係で、イワ

シなどの小魚からタラやサケなどの大きな魚やイカなどへと伝播してゆく。このときの第三期幼虫は十分に肉眼で見える大きさ(10 - 40mm)であり、わが国の近海産の魚とイカを調査したところ、165種以上のものから実際に見出されている。そして、これらのオキアミ類と魚介類(運搬宿主という)が、幼虫とともに本来の終宿主であるクジラなどに摂食されると、幼虫は発育して胃の中で成虫となって虫卵を生み出すようになり生活環は完結する。ところが図1で示すように、ヒトがこれらの海産魚やイカを生食すると、幼虫は通常とは違った運命をたどることになる。ヒトは本来の終宿主でも運搬宿主でもないのに、ヒトの体内で成虫にまで発育したり、幼虫が長期間発育せずに生き続けるということはない。生きた幼虫が摂取されると胃壁や腸壁に迷入し、ときに激しい腹痛などを引き起こして死滅することになる。

1.2 アニサキス症とアニサキス・アレルギー症

ヒトに生きたまま摂取されたアニサキス幼虫が、胃や腸から組織に侵入した時にアニサキス症が起きる。しかし、その後の経過は必ずしも一様ではなく、その症状の強さによって激症型と軽症型がある。殆ど症状示さない軽症で終るものと極めて激しい症状を引き起こすものとの相違は、型アレルギー(即時型過敏症)を伴うものであるかどうかで説明される。つまり、激症型と呼ばれ

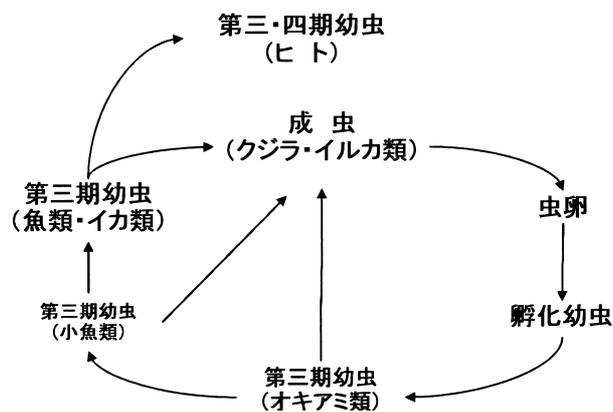


図1 アニサキスの生活環

るものは、特異的IgEの上昇と局所の高度な好酸球の浸潤を特徴とするアレルギー症を意味している。ここで、我が国における典型的な激症型のアニサキス症患者の例を紹介する。彼女は自ら調理した酢サバを食べ、2時間後に寒気、四肢の脱力、咳、呼吸困難、心悸亢進などアナフィラキシー様症状を示した後、全身の蕁麻疹を経験した。その後受診してアニサキス症が疑われ、胃の内視鏡検査が実施されて虫体が摘出され急性腹症は治まった。後日、この患者の血清からは高いレベルのアニサキスに対する特異的IgEが検出されたが、サバなど当夜食された食品に対するIgEは陰性であった。この我が国での典型的な症例は、アニサキス幼虫が胃に侵入することによって、疼痛や悪心、嘔吐といった消化器症状を起こすのみならず、アナフィラキシーや蕁麻疹といった激しいアレルギー症状を引き起こす事を示している。

他方で、スペインで報告されているアニサキス・アレルギーの症例には、関節炎、皮膚炎、喘息あるいは結膜炎といったわが国では報告されていないものが多くある。まず、1995年にスペイン北部において、ヘイク(タラ的一种)を加熱調理した料理で、アナフィラキシーを繰り返す患者が出た⁷⁾。また、「アニサキスの耐熱性アレルギー」に起因すると思われる蕁麻疹や血管性浮腫といった症状を起こした多くの患者が見出され⁸⁾、海産魚の加熱調理や冷凍処理ではアニサキス・アレルギーを防ぐ事が出来ないことが示された⁹⁾。更には、海産魚との接触によるアニサキス・アレルギーとしての皮膚炎、魚粉工場におけるアニサキス・アレルギーとしての喘息や、冷凍魚を取り扱ったことを原因とする蕁麻疹と喘息の発生などが次々と報告された。他に、結膜炎や関節痛/関節炎などもアニサキス・アレルギーの具体的な症状として示されている。このように、アレルギーとしての病態が異なるように見える日本とスペイン

の「アニサキス」は、本当に同一のものなのか、という疑問がわいてくる。

2. 実験方法

2.1 アニサキス幼虫

アニサキス幼虫を入手するために、その宿主であることが知られていて、かつ日本の市場で、欧米産のものが入手可能な魚種としてアンコウを選択しその胃から虫体を採取した。日本産、スペイン産と米国産（大西洋）の3つの産地由来のアンコウの内臓からアニサキス虫体が採取された。採取虫体はその形態を光学顕微鏡で詳細に観察し、いずれもアニサキス 型（広義の*Anisakis simplex*）の特徴を持つことを確認した。

2.2 遺伝子解析

アニサキス虫体からDNAを抽出し、PCR法でリボゾームDNAのITS領域を増幅させ、塩基配列を決定した。まずアニサキス虫体からDNeasy Tissue Kit（キアゲン）を用いてDNAを抽出し、PCR用のテンプレートとした。ITS-1領域の増幅にはNC5（フォワード、5'-GTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATT-3'）およびNC13R（リバーズ、5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT-3'）を、ITS-2領域の増幅にはNC13（フォワード、5'-ATCGATGAGAACGCAGC-3'）およびNC2（リバーズ、5'-TTAGTTTCTTTTCCCTCCGCT-3'）を各々使い、DNAポリメラーゼにはZ-taq（宝酒造）を選んだ。得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した。その後ゲルからターゲットとなるバンドを切出して精製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit（アプライド・バイオ・システムズ）を用いて、前述の各プライマーとシーケンス反応させた。配列はABI自動シーケンサー・モデル310（アプライド・バイオ・システムズ）で解読し、主にFastaを用いて解析した。

2.3 リコンビナント・タンパク質の作製

アニサキスの21kDaアレルギー（Shimakura *et al.*）を大腸菌で産生した。まずアニサキス虫体からMicro-FastTrack（インビトロジェン）を用いてPoly(A)⁺RNAを抽出し、One Step RNA PCR Kit（宝酒造）でPCR産物を得た。プライマーには、アニサキスの21kDaアレルギーの配列（嶋倉ら、2004）を参照して作製した21AlgFEco（フォワード、5'-TTGA[GAATTC]TCAACAATGGCTTC AATGC-3'）および21AlgRXba（リバーズ、5'-CCG[TCTAGA]TTTGGCATCTTCAGGG-3'）を用いた。これらプライマーは、その配列を少し改変させて、EcoRI（[GAATTC]）あるいはXbaI（[TCTAGA]）のサイトを夫々挿入し、プラスミド・ベクター（pMal-c2, NEB）への強制クローニングが可能となるように工夫した。次に、遺伝子断片が挿入されたベクターを大腸菌（JB109）にトランスフェクションさせ、IPTGでインダクションをかけて、マルトース結合性蛋白とのリコンビナントの形で21kDaのアレルギーを産生した。更にリコンビナント蛋白をFactorXaで切断し、アニサキスの21kDaアレルギーだけをクロマトグラフィーで精製することにより回収した。

2.4 ウェスタン・ブロット（WB）によるアレルギー患者血清との反応

ウェスタン・ブロット法は常法に準拠して実施した。得られたリコンビナント・タンパク質を2-ME存在下で煮沸還元し、SDS存在下、25mAの条件で12.5%ポリアクリルアミド中を泳動させた。泳動終了後、ニトロセルロース膜に40mAで90分転写し、得られた転写膜を3mm幅のスリットとして抗原抗体反応に用いた。反応条件は、各々45分間の被検血清との一次反応、ならびに二次反応（抗ヒトIgG [H+L] HRP Conjugate [Cappel] 或いは抗ヒトIgE HRP Conjugate [Biosource]）の後、DABで5分間発色を行った。

3. 結果と考察

3.1 アニサキス・アレルゲンの発現と性状解析・診断への応用

リコンビナント・タンパク質から調整されるアレルゲンは、アニサキス・アレルギー患者の血清診断への応用が期待されることから、精製アレルゲンの大量生産を試みた。既に何種類かのタンパク質がアレルゲンの候補として報告されているが、本研究では、日本産の *A. simplex* からクローニングされた「21kDaのアレルゲン」(いわゆる Ani s 1 famiy, Shimakura *et al.*, 2004)⁵⁾ をターゲットとした。

日本産虫体が発現するアレルゲンを、マルトース結合性タンパク質とのリコンビナントの形で、大腸菌で産生させ、更にリコンビナント・タンパク質からアレルゲンを切り出した後に精製し、診断用「21kDaのアレルゲン」とした。

アレルギー患者血清13検体を用いて、WB法により「21kDaのアレルゲン」との反応性を見た。その結果、IgEとIgGが共にアニサキス・アレルゲンと反応する血清が1検体、IgEのみが反応する血清が1検体、いずれにも反応しない血清が11検体であった。この陽性パターンを、**図2**に示す。

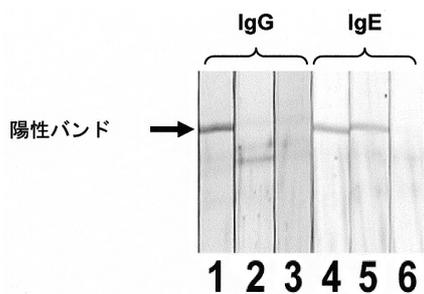


図2 リコンビナントアレルゲンを用いたWB反応
症例A : 1,4 IgGとIgEが陽性反応
症例B : 2,5 IgEのみが陽性
症例C : 3,6 IgGとIgEが陰性

3.2 アレルゲン遺伝子の配列に基づく種の比較・解析の試み

アニサキス・アレルギーの病態像がスペインとわが国で大きく異なるのは、両国産のアニサキス (*A. simplex*) の産生アレルゲンが異なることによる可能性が考えられる。

そこで、まず「21kDaのアレルゲン」遺伝子に着目し、その遺伝子配列を解読して比較検討する事にした。日本産の虫体からは3クローン(鎖長1,598~1,609bp)を得てそれらのシーケンスを解読したが、いずれも相互に僅かに違う配列を持つ事が確認された。さらにスペイン産の虫体から1クローン(1,584bp)、米国産の虫体からも1クローン(1,599bp)が得られたので、これらを日本産虫体由来の3クローンの配列と比較した。その結果、日本産とスペイン産との虫体由来のクローンの相同性は95.9~96.7%、日本産と米国産とは96.1~97.3%と高い値を示した。しかし、スペイン産と米国産の相同性は98.0%となり、日本産との相同性よりもさらに高い値を示した。

以上の解析結果から、日本、スペイン、米国の3つの産地由来の虫体から得られた「21kDaのアレルゲン」の遺伝子配列は、産地ごとの相同性は高いものの、各々わずかに異なる事が示された。この違いが、タンパク質としてのアレルゲンに反映されることが示されれば、アニサキス・アレルギーの病態像の違いを解明する糸口となりうると考え、この点を明らかにする為に、メッセンジャーRNA (mRNA) を出発材料として以下の検討を進めた。

3.3 配列に基づくアニサキス・アレルゲンの比較・解析

保存条件が悪くスペイン産虫体からのRNA抽出が困難であったため、スペイン産虫体の代替として、アレルゲン遺伝子のゲノム配列が最も近似する米国産虫体を用いて、以下の検討を進めた。

日本産と米国産の虫体からmRNAを調整し、「21kDaのアレルゲン」の為のプライマー・セットを用いて、RT-PCRにより増幅産物を得た。この産物をベクターにクローニングし、配列を解読した。

その結果、日本産虫体から得られた4クローン(517bp)は、3クローンが同一配列であり、残り1クローンは1塩基だけが異なることを確認した。これら4クローンについて、塩基配列をアミノ酸に置換して比較しところ、いずれも172アミノ酸残基から成る同一のタンパク質をコードする事が分かった。

米国産虫体からは3クローン(517bp)が得られ、このうち1クローンが日本産虫体由来のクローンと同一の塩基配列を示し、コードするタンパク質のアミノ酸配列も同一であった。以上の結果から、日本産虫体と米国産虫体とが、同一のアレルゲンを発現している事が確認された。

更に、日本産虫体に由来する配列を用いて、「21kDaアレルゲン」遺伝子のゲノム配列とmRNAの配列との比較を行った。その結果、5個のエクソンがスプライシングを受けてメッセージとなり、タンパク質発現する事が示された。

以上の結果から、産地の異なるアニサキスにおいては「21kDaアレルゲン」遺伝子の配列にわずかな違いが認められたものの、コードするタンパク質は同一であることが確認された。したがって「21kDaアレルゲン」遺伝子の相違は、アニサキス・アレルギーの病態の相違とは関連しないことが示された。

3.4 リボソームDNAの配列に基づく種の比較・解析

日本産、スペイン産、米国産(大西洋)の3つの産地のアンコウ由来のアニサキスは、何れも*A. simplex* complexと同定され、形態学的手法によっては別種であることを証明し得なかった。しか

し、幼虫では形態学的な特徴に乏しく別種としての区分ができないものであっても、遺伝子配列の相違から分別される同胞種(sibling species)の関係にある可能性も考えられる。そこで各グループの虫体を出発材料とし、リボソームDNAのITS-1領域とITS-2領域の配列を解読・比較した。この2つの領域は、寄生蠕虫を遺伝子分類する際に、しばしば用いられている重要なマーカー配列である。

これらの領域をダイレクト・シーケンシングにより解読した結果、ITS-2領域(465bp)の配列は、3つのグループで完全に一致した。一方、ITS-1領域(421bp)は、日本産以外の2つのグループで完全に一致し、日本産のみが他のグループと2塩基異なった。このITS-1領域の配列に認められた塩基の相違を、当初我々は種内の変異と捉えていたが、その後、この多型の内の一箇所が、制限酵素(*Hinf* I)による切断部位に相当する事が判明した。D'Amelio(2000)ら¹⁰⁾によれば、この制限酵素による切断の可否により、従来*A. simplex*と一括されていた虫体を「*A. pegreffii*」と「狭義の*A. simplex*」とに分類しうるとされており、その説に従えば、今回我々が解析した日本産虫体は「狭義の*A. simplex*」に相当し、他のグループは総て*P. pegreffii*と分類された。このD'Amelioによって提唱されている種分類は、未だ広く受け入れられている訳ではないが、今回の結果から、日本とスペインでの病態像の差異を、種差を以って説明できる可能性が考えられた。今後のアニサキスの分類に関する研究の進展が期待される。

4. ま と め

アニサキス・アレルギーの診断のためにリコンビナント・タンパク質を作製し、アレルギー患者血清との反応性を調べた結果、IgEとIgGが共に反応するもの、IgEだけが反応するもの、反応が

AsJI1	1:	ATCGACCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCCAACGTGCATACCTTCCATTTGCATG	60
AsSI1	1:	ATCGACCGAATCCAAAACGAACGAAAAAGTCTCCCAACGTGCATACCTTCCATTTGCATG	60
AsJI1	61:	TTGTTCTGAGCCACATGGAAACTCGTACACACGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTGCTTTTT	120
AsSI1	61:	TTGTTCTGAGCCACATGGAAACTCGTACACACGTGGTGGCAGCCGTCTGCTGTGCTTTTT	120
AsJI1	121:	TTAGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCCGTGTGCTTGTTGAACAACGGTGACCAATTTGG	180
AsSI1	121:	TTAGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCCGTGTGCTTGTTGAACAACGGTGACCAATTTGG	180
AsJI1	181:	CGTCTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTTGCGATGAAAGATGCGGAGAAA	240
AsSI1	181:	CGTCTACGCCGTATCTAGCTTCTGCCTGGACCGTCAGTTGCGATGAAAGATGCGGAGAAA	240
AsJI1	241:	GTTCCCTTTGTTTTGGCTGCTAATCATCATTTCATGAGCAGTACGCTTAAGGCACAGTTGACG	300
AsSI1	241:	GTTCCCTTTGTTTTGGCTGCTAATCATCATTTCATGAGCAGTACGCTTAAGGCACAGTTGACG	300
AsJI1	301:	AGACTTAATGAGCCACGCTAGGTGGCCGCCAAAACCCAAAACACAACCCGGTCTATTTGAC	360
AsSI1	301:	AGACTTAATGAGCCACGCTAGGTGGCCGCCAAAACCCAAAACACAACCCGGTCTATTTGAC	360
AsJI1	361:	ATTGTTATTTTCATTGTATGTGTGAAAATGTACAAATCTTGCGGTTGGATCACTCGGTTG	420
AsSI1	361:	ATTGTTATTTTCATTGTATGTGTGAAAATGTACAAATCTTGCGGTTGGATCACTCGGTTG	420
AsJI1	421:	GTGG	424
AsSI1	421:	GTGG	424

図3 日本産 (AsJ) とスペイン産 (AsS) のITS1領域塩基配列の比較

確認し難いものに分かれた。今後、反応感度を増強すると共に、このような差を利用することでアニサキス・アレルギー症の解析を進めることが出来ると思われる。

次に、アニサキス・アレルギーの病態の相違を探るために、日本産、米国産、(そして恐らくスペイン産も)のアニサキスに共通のアミノ酸配列を持つ「21kDaのアレルゲン」について配列を確認したところ、遺伝子配列にはわずかな相違が認められたものの、コードされるタンパク質は同一のものであることが確認され、「21kDaのアレルゲン」に関しては病態の相違には関与していない可能性が示唆された。

新たに提唱されている *A. simplex* の分類は、ITS-1領域の制限酵素 (*Hinf* I) による切断の可否によって従来 *A. simplex* と一括されていた虫体を2種に分類するものである。これによれば今回分離した日本産の虫体とスペイン産・米国産の虫体は、別種 (タイプ) である可能性が示唆され、その種の違いによる「21kDaのアレルゲン」以外のアレルゲンが病態の違いとなっている更なる可能性

は否定できないと考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団並びに関係各位に心から感謝を申し上げます。それと共に、貴財団の将来にわたる益々のご発展をお祈り申し上げます。

文 献

- 1) Kasuya S, Hamano H, Izumi S: Mackerel-induced urticaria and Anisakis. *Lancet* 335 (8690) 665, 1990.
- 2) 木村 聡, 寄生虫アニサキスとアレルギー, 臨床検査 44, 443-445, 2000.
- 3) 川中正憲, 荒木 潤, アニサキス症 発生状況と予防, 食品衛生研究 56, 17-22, 2006.
- 4) 粕谷志郎, 古賀香理, Anisakis関連疾患における特異IgE測定の意味, アレルギー, 41, 106-110, 1992.
- 5) Shimakura K, Miura H, Ikeda K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shirai T, Kasuya S, Shiomu K. Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol Biochem Parasitol.* May; 135 (1) 69-75. 2004.
- 6) Audicana MT, Ansotegui IJ, Corres, LE, Kennedy MW: *Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive? *Trend in*

- Parasitol. 18, 20-25, 2002.
- 7) Audicana MT, Fernandez de Corres L, Munoz D, Fernandez E, Navarro JA, del Pozo MD.: Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish J Allergy Clin Immunol. 96 (4) 558-60. 1995.
- 8) Fernandez de Corres L, Audicana M, Del Pozo MD, Munoz D, Fernandez E, Navarro JA, Garcia M, Diez J.: *Anisakis simplex* induces not only anisakiasis: report on 28 cases of allergy caused by this nematode. Investig Allergol Clin Immunol. 6 (5) 315-9. 1996.
- 9) Audicana L, Audicana MT, Fernandez de Corres L, Kennedy MW: Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. Vet Rec. 140 (9) 235. 1997.
- 10) D ' Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SO, Picanco M, Paggi L. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain- reaction-based restriction fragment length polymorphism. Int J Parasitol. 30(2)223-6. 2000.

Food allergy induced by the parasite *Anisakis*

Masanori Kawanaka and Hiromu Sugiyama

(Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases)

There has recently been an increase in patients with food allergy, which is becoming a major social problem worldwide. Eggs, milk, and soybeans are the major causes of food allergy. In Japan, fish is the second most important cause of allergy next to eggs because consumption of fish is high. However, recent studies have clarified that most cases of food allergy caused by fish are actually caused by *Anisakis* larvae parasitizing fish, not by fish itself. In this study, we constructed a serodiagnostic method for accurate differentiation of true fish allergy and *Anisakis* allergy, and investigated background factors of the allergy development.

1. Establishment of diagnostic method of *Anisakis* allergy

1) Sera of patients with fish allergy have been obtained, expecting that sera of patients with *Anisakis* allergy were included.

2) Primers have been designed based on the *Anisakis* gene sequences (21kDa allergen by Shimakura *et al.*) registered in the database, and RNA prepared from *Anisakis* larvae were amplified by RT-PCR. The PCR products were inserted into vectors, and expressed as recombinant proteins.

3) Western Blot (WB) have been performed using sera from patients with *Anisakis* allergy, and a recombinant allergen appropriate for diagnosis of *Anisakis* allergy were selected. Using this recombinant allergen, a highly sensitive and specific WB method will be established.

2. Investigation of background factors of allergy development.

1) Many cases of *Anisakis* allergy have reported from Spain. While the main symptom is anaphylaxis and urticaria from Japan, bronchial asthma, arthritis, conjunctivitis, dermatitis and/or conjunctivitis develop from Spain.

2) *Anisakis* larvae obtained from Spain, and the morphology and gene sequences have been extensively investigated to identify the species and compare the findings with *Anisakis* larvae in Japan.