

アニサキス症の組織診断における蛍光抗体法の応用

1. 抗-粗抗原 IgG および抗-精製抗原 IgG の反応性

白 木 公 鈴 木 俊 夫 大 鶴 正 満
佐 藤 良 也 監 物 実

新潟大学医学部医動物学教室

浅 石 和 昭

札幌医科大学第1外科学教室

(昭和48年4月6日 受領)

はじめに

アニサキス症は特有な臨床症状、検査所見に乏しいため一般にその術前診断は必ずしも容易でない。最近、並木ら(1970)、Kagei *et al.* (1972)、河内ら(1973)、長野ら(1973)等により胃アニサキス症のファイバースコープによる診断が報告されたが、従来多くの症例は急性虫垂炎、腸閉塞症あるいは胃癌、胃潰瘍等の疑いで開腹され、切除病巣部の病理組織学的検索により診断されている。皮内反応、血清反応等の免疫学的診断法の研究も進められている(鈴木1968、鈴木ら1969、1970、白木ら1970a、1971)が目下のところ確定診断は病巣中からの虫体の検出に待たねばならない。さきに著者(白木1969)は胃および腸管の好酸性球性蜂窩織炎、膿瘍あるいは肉芽腫等とされる56症例の手術材料を組織学的に検索して、48例に虫体もしくはその残存物を認めた。これらは孤虫症(sparganosis)の1例を除くと、大部分が *Anisakis* 幼虫によると推定された。しかし変性・崩壊のため同定の困難な例もあり、特に胃の症例では比較的長い経過の後に手術されたものが多いため大部分がこうした例であった。

消化管に好蜂球形膿瘍あるいは肉芽腫等の変化をもたらす寄生虫としては *Anisakis* 幼虫以外にもイヌあるいはネコ回虫幼虫、糞線虫幼虫、顎口虫幼虫、孤虫(*Sparganum*)等いわゆる larva migrans (Beaver 1969)のカテゴリーに属するもの、さらに蛭虫、鞭虫、住血吸虫等も知られ、組織診断に際して鑑別が必要である。また *Anisakis* 幼虫と同様に海産魚類を中間宿主とし、こ

本研究は文部省科学研究費の援助によった。

れと近縁とみられる *Terranova* 幼虫、*Contracaecum* 型幼虫等も実験的にウサギの消化管壁に穿入することが知られ(大鶴ら1968、1969、白木・大鶴1968)、特に前者については北海道方面での人体症例の報告がなされた(Suzuki *et al.* 1972、長野ら1973)。さらに最近著者らの一人、大鶴ら(1972)により旋尾線虫目(Spiruridea)に属するある種の幼線虫による消化管移行症の2例が報告された。これらの近縁幼線虫は形態的に類似するため相互の鑑別は困難を伴うことが多いと考えられる。著者ら(白木ら1969、1970b、浅石ら1970)はアニサキス症の組織診断、特に変性・崩壊のため形態的に鑑別困難な虫体の同定に蛍光抗体法を応用する目的で実験を行ってきた。

本報では 1) 虫体横断切片あるいは組織内穿入虫体切片の反応性、2) 固定による反応性の変化 3) 変性・崩壊虫体の反応性 4) 特異性 5) 難溶性抗原を用いた蛍光抗体の反応性などについて検討したで、それらの成績を報告したい。

材料・方法

1) 抗原および免疫方法

免疫抗原としては *Anisakis* 幼虫および比較として豚回虫(*Ascaris lumbricoides suum*)成虫を使用した。*Anisakis* 幼虫は日本海産のスケトウダラから、いわゆるI型を採集、豚回虫は屠畜場で処理された豚の腸管から集めた。

粗抗原：虫体を十分に水洗した後、凍結乾燥し、 -20°C に保存、要に臨み虫体を磨砕し、生理食塩水で抽出し、6,000rpmで30分遠心沈澱し、その上清を使用し

た。

Anisakis 幼虫精製抗原: *Anisakis* 幼虫を数ヶ所で切断後、遠心沈澱して体液を集め、これを硫酸塩析および DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーにより精製した *Anisakis* 幼虫ヘモグロビン (Hb) である (鈴木 1968, 鈴木ら 1969)。

難溶性抗原: 陳旧症例にみられる変性の進んだ虫体の検出に用いるため虫体の体壁成分の難溶性成分の抽出を試みた。すなわち、*Anisakis* 幼虫を数ヶ所で切断して乳鉢で磨砕し、48,000rpm 30分遠心して沈澱を採り、これに約2倍量の生理食塩水を加えて再度磨砕後遠心沈澱して上清を棄てる。これを2回繰り返して易溶性成分を除いた。得られた白色の沈澱に対して、ドライアイス・アセトンにより -70°C に凍結後乳鉢で磨砕しながら室温で徐々に融解するという操作を5回繰り返し、これに生理食塩水を加え 20KC の超音波振動を 200W で30分間与え、25,000rpm 30分遠心して得られた上清である。

上記の *Anisakis* 幼虫および豚回虫の粗抗原、*Anisakis* 幼虫精製抗原 (*Anisakis* Hb) および難溶性抗原 (somatic antigen) のそれぞれ約 1 ml に Freund の完全アジュバントを等量加え良く混和してウサギの足趾皮下に接種、2週間隔で3回追加免疫し、最後の注射から1週間後、2重拡散法により抗体の産生を確かめ、頸動脈から全採血した。

2) 抗血清の精製および蛍光標識

前記の免疫血清を中性40%飽和硫酸で塩析して得た分画を 0.005M 磷酸緩衝液 (PB), PH 7.8で平衡にした EAE-cellulose カラムによりクロマトグラフィーを行ない IgG を得た。かくして精製した IgG を生理食塩水で透析後、蛋白濃度 1~2% に調整し、これに抗体液の $1/10$ 量の炭酸緩衝液 PH 9.0に蛋白量の $1/60$ 量の fluores-

cein isothiocyanate を溶解したものをゆつくり加え、 4°C , 6時間混和した後 0.005M PB (PH 7.0) に 0.1M NaCl で飽和した Sephadex G-25 のカラムで同緩衝液を用いてゲル濾過を行ない遊離色素を除去し、さらに同緩衝液で平衡にした DEAE-cellulose カラムによりクロマトグラフィーを行ない精製した。

3) 被検組織切片の作製

組織切片はクリオスタットおよびパラフィン包埋によって作製した。被検組織切片として用いた虫体は豚回虫、ネコ回虫 (*Toxocara cati*) 成虫, *Contracaecum* 型幼虫 (A) (大鶴1969), *Terranova decipience* 幼虫 (白木・大鶴1968), *Anisakis*, 幼虫 I, II および III 型 (大鶴ら 1969) である。新鮮虫体の凍結切片は土井ら (1968) の方法により卵白アラビアゴムに包埋し、ドライアイス・アセトンで凍結し、クリオスタットにより $4\sim 6\mu$ の切片とした。また虫体穿入組織の切片は主として液化炭酸ガスにより凍結し同様に切片を作製した。

固定液の反応性に及ぼす影響をみるため、モルモットおよびウサギに *Anisakis* 幼虫を経口投与し、24時間後に剖検、虫体穿入部を中心に約 1 cm^2 の大きさの組織片を作り、フォルマリンおよびエタノールで固定した。これを一定期間後にとり出し、凍結切片あるいはパラフィン切片とし蛍光抗体染色を行ない、反応性の変化を調べた。また、宿主体内で変性・崩壊過程にある虫体の反応性をみるために、*Anisakis* 幼虫をウサギの皮下に埋没、あるいは磨砕した虫体をウサギの胃壁の漿膜下に注入し、1週ないし4週間後にとり出して反応性の変化を調べた。

4) 染色および鏡検

凍結切片はエタノールで5分間固定した後磷酸緩衝食塩水 (PBS) PH 7.2 に2~3分間ひたし、切片周囲を濾紙でふきとつてから2~3滴の蛍光抗体で切片をおお

Table 1 Procedure of paraffine embedding technique (after G. Sainte-Marie, 1962, with some modifications)

Fixation	:	95% Ethanol	4°C	24hrs	
Dehydration	:	100% "	"	1~2hrs	(4 Times)
Clearing	:	Xylene	"	"	(3 Times)
Embedding	:	Xyloparaffine	56°C	30min	
	:	Paraffine	56°C	1hr	(3 Times)
Deparaffization of Section	:	Xylene	4°C	15sec	(2 Times)
	:	100% Ethanol	"	"	(")
	:	90% "	"	"	
	:	70% "	"	"	
	:	Staining buffer	"	1min	(2 Times)

い湿潤函に入れ、暗室で30°C、45分間反応させた。パラフィン切片は Sainte-Marie (1962) の方法を参考にして Table 1 の手順で行なった後同様に 蛍光抗体液と反応させた。染色後は余分の蛍光抗体を PBS で十分に洗い流し、緩衝グリセリン (PH 9.1) で包埋し、カバーガラスでおおい鏡検した。蛍光顕微鏡は Karl Zeiss 社の Ultra Photo II を使用、励起フィルターは BG 12 あるいは UG 5 を、吸収フィルターは淡黄色 (No. 47) あるいは淡青色 (No. 60) をそれぞれ用い、暗視野下で観察した。顕微鏡写真は Kodak Tri-X (ASA 200) フィルムを使用、2~3分間露出した。

成績・考按

1) *Anisakis* 幼虫、新鮮虫体の染色性

蛍光色素標識の抗-*Anisakis* 幼虫粗抗原ウサギ IgG により新鮮虫体の凍結切片を染色すると、角皮層を除き虫体全組織が良好に染色された。一般に細胞原形質は淡く染まり、細胞隔壁が濃厚に染まった。中腸上皮、体壁の筋組織 (髄胞部、筋紡錘) (小泉丹1944) などが強く染まり、排泄腺、側線の染まりは概して弱かった (Fig. 5)。

Jackson (1959) は旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) 感染幼虫の経口投与により感作したラットの血清に蛍光色素を標識して観察を行なったが、それによれば成虫の切片は中腸上皮が常に染まり、ときには生殖器も染まり、まれに角皮を除く全組織が染色されたとし、抗血清の Lot により差がみられたとしている。

スケソウダラの腹腔内にみられた、いわゆる被囊 *Anisakis* 幼虫を囊のまま凍結切片とし染色すると、虫体は同様に反応したが、囊壁は青白色の強い自己蛍光を発生し、特異蛍光の結合は認められなかった (Fig. 1)。虫体をおおっているこの囊の由来は虫体でなく宿主側ににあると考えられた。Jackson (1959) も筋肉内の旋毛虫被囊幼虫で同様の知見を得たとしている。

組織内に穿入した虫体についてみると、ウサギに経口投与して24時間を経た胃壁内の虫体は全く同様に反応した (Fig. 2)。また虫体の頭部をおおつてみられる PAS 陽性に染まるいわゆる均質物質も弱いながら緑色蛍光を認めた (Fig. 3)。経口投与後1週目のウサギの胃壁内の虫体は脱皮を経っていたが虫体の反応性に変化はなかった。この際、脱皮角皮の周囲にも明瞭な特異蛍光が認められた (Fig. 4)。虫体周囲に浸潤している好酸球の顆粒に一致して緑色蛍光を認めることがあつたが、これは

蛍光標識正常ウサギ血清でも同様に染まることから非特異的に結合するものと考えられた。

Andrade *et al.* (1961) は住血吸虫症患者血清に蛍光色素を標識してマウスの肝内の虫体を染色し、卵内のミラシジウムや成虫の反応を観察した。彼らは虫卵周囲にみられる PAS 陽性の物質が酸性処理により IgG を洗い流した後にのみ標識患者血清と反応したとし、この物質が抗原抗体結合物であろうと推定した。

Anisakis の頭部にみられる類似の均質物質は酸性処理のいかんにかかわらず反応することから、虫体の分泌物に由来するもので抗体とは直接関係ないと考えられた。また彼らは住血吸虫寄生肝病巣の組織球内あるいは細胞外に顆粒状の抗原物質がみられたとしたが *Anisakis* 幼虫穿入組織内ではそのような所見は認め得なかつた。

2) 固定による反応性的変化

虫体の穿入したウサギの胃組織をエタノール (70%、90%および 100%) あるいはホルマリン (35%ホルムアルデヒドの3%、5%および10%溶液) に6時間ないし30日間固定した後にとり出し、冷 PBS に1~2時間ひたして固定液を除き、これを凍結切片とし蛍光抗体との反応をみた。

Table 2 の如く、エタノール固定ではいずれの濃度でも1ヶ月まではほとんど反応性の低下がみられなかつた。温度は室温 (10~25°C)、4°C および -20°C について比較したが少なくとも1ヶ月以内では温度の影響はなかつた。一方、ホルマリン固定では速やかに反応性が低下し、特に濃度の高い場合に顕著であつた。5%中性ホルマリンはやや反応性の低下が軽度であつたが、2週間後ではやはり蛍光が極めて微弱であつた。

95%エタノールで固定した組織内の虫体を Sainte-Marie (1962) の方法でパラフィン包埋 (融点56°C) し切片を作製、蛍光抗体染色を行なった。エタノール固定により組織の自己蛍光が強くなる傾向があつたが、反応性は良好であつた。凍結切片では一般染色の染色性が不良な上に細胞の形態も明瞭さを欠くので、H・E 染色と比較する場合はパラフィン包埋切片で良い結果が得られた。

3) 変性・崩壊虫体の反応性

ウサギの皮下に生虫体を埋没、磨砕した虫体を胃の漿膜下および皮下に注入し、1~4週後にとり出し、凍結切片あるいはパラフィン切片とし、抗-粗抗原 IgG により蛍光抗体染色を行なった。

Table 2 Effect of fixation on reactivity of *Anisakis* larva

Fixatives	Term of Fixation				
	6 hrs	24 hrs	7 days	2 weeks	4 weeks
Ethanol 70%		+++	+++	++	++
" 90%		+++	+++	++	++
" 100%		+++	+++	++	++
Formol 3%	++	+	-		
" 5%	++	+	-		
" 10%	+	+	-		
5% formol in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2)	++	++	+	-	

皮下に埋没した虫体は4週後には高度に変性していたが Table 3 の如く充分に反応性を保持していた。磨砕虫体は皮下、胃壁とも生虫体に比べ反応性の低下が速やかであった。磨砕虫体胃壁注入後2週目の胃粘膜下の膿瘍内にみられた虫体の筋肉質の断片に蛍光抗体の結合がみられた。同時に排泄腺細胞も形を保つて残っていたが、これは青白色の自己蛍光が強く、特異蛍光の結合は認められなかった。

Table 3 Preservation of reactivity of *Anisakis* larva in host tissues

Way of inoculation	Term between inoculation and desection		
	1 week	2 weeks	4 weeks
Whole worm in hypoderm	+++	++	++
Ground worm in hypoderm	++	+	+
Ground worm in stomach wall	++	+	+

Table 4 Fluorescent antibody reactivity against homologous and heterologous antigens

FITC-labeled Antibodies	Antigens (transverse sections of)				
	<i>Anisakis</i>	<i>Terranova</i>	<i>Contracaecum</i>	<i>Toxocara</i>	<i>Ascaris</i>
Anti- <i>Anisakis</i> (Crude)	+++	++	+	+	+
Anti- <i>Anisakis</i> (Hb)	++	+	-	-	-
Anti- <i>Ascaris</i> (Crude)	+	+	+	++	+++

4) 特異性

近縁線虫との交叉反応をみると Table 4 の如く、抗 *Anisakis* 幼虫粗抗原 IgG は豚回虫、ネコ回虫、*Contracaecum* 型幼虫、*Terranova* 幼虫、*Anisakis* 幼虫 II 型および III 型のいずれをも交叉反応があつた (Fig. 7, 9)。抗-豚回虫粗抗原 IgG も同様にいずれの線虫とも交叉反応した。一方、*Anisakis* 幼虫 Hb で感作したウサギの IgG は *Terranova* 幼虫、*Anisakis* 幼虫 II 型、III 型と交叉反応したが *Contracaecum* 型幼虫、ネコ回虫、豚回虫とは全く反応しなかつた (Fig. 8, 10)。形態的に *Anisakis* に極めて類似する *Terranova* は抗原性の上でも近縁で、少なくとも類似の Hb を有することが推定された。

抗-*Anisakis* 幼虫 Hb-IgG の虫体切片における反応の局在は抗-粗抗原 IgG のそれとは異なり、擬体腔 (perienteric cavity) および角皮下層 (hypodermal la-

yer) であつた。

抗-*Anisakis* 幼虫 Hb 抗体の変性虫体に対する反応は著しく弱く、皮下埋没後2週目の虫体はほとんど反応性を失なつていた。

Anisakis 幼虫 Hb は虫体死滅後比較的速やかに分解あるいは吸収され抗原性を失うものと考えられた。

5) *Anisakis* 幼虫難溶性抗原を用いた蛍光抗体の反応性

超音波処理により抽出した難溶性抗原に対応する蛍光抗体液により *Anisakis* 幼虫凍結切片を染色すると、中腸、側線、筋組織、角皮等全組織が染まつた。排泄腺の染まりは抗粗抗原 IgG の場合と同様弱かつたが、その他の組織は抗-粗抗原 IgG の場合と異なり細胞の原形質が濃厚に染色された (Fig. 13)。

豚回虫、ネコ回虫、*Contracaecum*、*Terranova* 等いずれとも交叉反応し特異性は欠いたが、変性虫体との反

応性が極めて良好で、40日を経た胃壁内の磨砕虫体の角皮や体壁の筋線維(筋紡錘部)の断片が明瞭に染色された(Fig. 11, 12).

陳旧症例では角皮、筋線維(筋紡錘部)、排泄腺細胞等が比較的長期間にわたり形を保つて病巣内に残ることから、この蛍光標識抗-難溶性抗原 IgG は角皮、筋肉組織等の検出に役立つと考えられた。

まとめ

アニサキス症の組織診断に資するため、蛍光抗体直接法による実験を行なった。すなわち、*Anisakis* 幼虫から抽出した種々の抗原成分によりウサギを感作し、得られた抗体に蛍光色素を標識し、これと種々の条件下における虫体との反応性を観察した。得られた知見は次の通りである。

1) 蛍光標識抗-粗抗原 IgG は *Anisakis* 幼虫横断切片と良く反応した。中腸上皮細胞、筋組織が特に良好に染まつたが、角皮層とは反応しなかつた。抗-*Anisakis* 幼虫ヘモグロビン(Hb)は虫体の擬体腔および角皮下層と反応し、Hbの局在がこれら部にあることが知られた。抗-難溶性抗原 IgG は角皮層も含めた虫体の全組織と強く反応した。

2) 抗-粗抗原 IgG および抗-難溶性抗原 IgG は豚回虫、ネコ回虫、*Contracaecum* 型幼虫(A)、*Terranova decipiens* 幼虫のいずれとも交叉反応があつた。しかし抗-*Anisakis* 幼虫 Hb・IgG は *Terranova* 幼虫、*Anisakis* 幼虫Ⅱ型およびⅢ型とは交叉反応したが、その他の虫体とは全く反応せず、かなり特異性が高いことが知られた。

3) ウサギの組織内で変性・崩壊した陳旧虫体との反応をみると、抗-*Anisakis* 幼虫 Hb・IgG は2週後の虫体とはほとんど反応しなかつたが、抗-粗抗原 IgG では4週後の虫体とも反応した。さらに抗-難溶性抗原 IgG では6週後も反応の低下がほとんどなく、蛍光の強さは新鮮虫体と変らなかつた。

4) 魚体内にみられる *Anisakis* 幼虫の嚢は抗-粗抗原 IgG と反応しないことから、宿主側の産物と推定された。幼虫の穿入部組織内に虫体の頭部を囲んでしばしばみられる APS 陽性に染まるる均質物質は蛍光抗体と反応することから虫体の分泌物に由来すると考えられた。

5) 固定による反応性の変化をみると、ホルマリン固定は速やかに反応性を失なわせたがエタノールでは室

温で30日間固定した後でも十分に反応した。Sainte-Marie (1962) の方法によるパラフィン包埋切片でも凍結切片と比較して反応性は劣らなかつた。

文 献

- 1) Andrade, Z. A., Paronetto, F. & Popper, H. (1961): Immunocytochemical studies in schistosomiasis. *Am. J. Path.*, 39, 589-598.
- 2) 浅石和昭・石倉肇・早坂滉・白木公・鈴木俊夫・大鶴正満(1970): アニサキス症の組織診断における蛍光抗体法の応用(II). *寄生虫誌*, 19, 340.
- 3) Beaver, P. C. (1969): The nature of visceral larva migrans. *J. Parasitol.*, 55, 3-12.
- 4) 土井陸雄・石井明・佐々学(1968): 蛍光抗体法による抗原の追索—衛生昆虫、寄生虫領域における—。化学と生物, 6, 572-576.
- 5) Jackson, G. J. (1959): Fluorescent antibody studies of *Trichinella spiralis* infections. *J. Inf. Dis.*, 105, 97-117.
- 6) Kagei, N., Yamakawa, I., Nagano, K. & Oishi, K. (1972): A larva of *Terranova* sp. causing acute abdominal syndrome in a woman. *Jap. J. Parasit.*, 21, 262-265.
- 7) 河内秀希・並木正義・諸岡忠夫・中川健一・太黒崇(1973): 急性症状を呈する胃アニサキス症。胃と腸, 8, 31-38.
- 8) 小泉丹(1944): 蛔虫の研究。25頁, 大日本出版株式会社, 東京。
- 9) 長野一雄・高木皇輝・柳川一成・大石圭一・影井昇(1973): 急性ヘテロケイルス症。胃と腸, 8, 81-85.
- 10) 並木正義・諸岡忠夫・河内秀希・上田則行・関谷千尋・中川健一・古田豊治・太黒崇・鎌田等(1970): 急性胃アニサキス症の診断。胃と腸, 5, 107-110.
- 11) 大鶴正満・白木公・初鹿野高好・監物実(1968): 北海道近海にみられる *Anisakinae* 幼虫の形態観察および感染実験, 特に *Terranova* 幼虫について。寄生虫誌, 17, 167.
- 12) 大鶴正満(1969): 海産魚介類からの寄生虫症, 主としてアニサキス症について。食品衛生誌, 10, 1-13.
- 13) 大鶴正満・白木公・監物実(1969): 北日本近海産の魚介類における *Anisakinae* 幼虫の分類, 形態および感染実験。寄生虫誌, 18, 417.
- 14) 大鶴正満・白木公・監物実(1972): 不明幼線虫による消化管移行症。寄生虫誌, 21, 増刊号, 55.
- 15) Sainte-Marie, G. (1962): A paraffine embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. and Cytochem.*, 10, 250-256.

- 16) 白木公・大鶴正満 (1968a): 海産魚類にみられる *Anisakinae* 幼虫の形態, 特に *Terranova* 幼虫および *Contraecum* 型幼虫について. 寄生虫誌, 17, 584.
- 17) 白木公・大鶴正満 (1968b): 北日本方面の海産魚介類にみられる *Anisakis* および近縁属幼虫について. 寄生虫誌, 17, 642.
- 18) 白木公 (1969): 消化管幼線虫移行症 (主としてアニサキス症) の病理組織学的診断について. 最新医学, 24, 378-389.
- 19) 白木公・鈴木俊夫・大鶴正満 (1969): 蛍光抗体法によるアニサキス幼虫の観察. 寄生虫誌, 18, 356.
- 20) 白木公・鈴木俊夫・大鶴正満 (1970a): アニサキス幼虫経口投与後のウサギ血中抗体の変化. 寄生虫誌, 19, 340.
- 21) 白木公・鈴木俊夫・大鶴正満・浅石和昭 (1970b): アニサキス症の組織診断における蛍光抗体法の応用 (II). 寄生虫誌, 20, 16.
- 22) 白木公・鈴木俊夫・大鶴正満 (1971): アニサキス症の免疫学的診断に関する研究 (IV). 寄生虫誌, 20, 279.
- 23) Suzuki, M. Koyama, T., Kumada, M. and Yokogawa, M. (1972): *Terranova* (Nematoda; Anisakinae) infection in man. *Jap. J. Parasit.*, 21, 252-256.
- 24) 鈴木俊夫 (1968): 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.
- 25) 鈴木俊夫・白木公・大鶴正満 (1969): 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, 232-239.
- 26) 鈴木俊夫・白木公・関野敏・大鶴正満・石倉肇 (1970): アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究 3. 精製抗原を用いての皮内反応. 寄生虫誌, 19, 1-9.

Abstract

EXPERIMENTS FOR THE APPLICATION OF FLUORESCENT ANTIBODY METHOD TO HISTOLOGICAL DIAGNOSIS OF ANISAKIASIS

1. REACTIVITIES OF ANTI-ANISAKIS CRUDE ANTIGEN IgG AND ANTI-ANISAKIS PURIFIED ANTIGEN IgG TO THE SECTION OF ANISAKIS LARVA UNDER VARIOUS CONDITIONS

TADASHI SHIRAKI, TOSHIO SUZUKI, MASAMITSU OTSURU,
YOSHIYA SATO AND MINORU KENMOTSU

(Department of Medical Zoology, Niigata University School of
Medicine, Niigata, Japan)

KAZUAKI ASAISHI

(First Department of Surgery, Sapporo Medical College,
Sapporo, Japan)

Fluorescein isothiocyanate (FITC) was labelled to anti-sera of rabbits immunized with several components of *Anisakis* larva, i. e. crude antigen, purified antigen (hemoglobin of *Anisakis* larva) and somatic antigen (extracted from body wall by ultrasonic destruction).

The reactivity of these anti-sera to sections of *Anisakis* larva under various conditions was observed under fluorescent microscope.

Results obtained were as follows.

1) FITC-labeled anti-*Anisakis* crude antigen IgG reacted very well to the section of fresh *Anisakis* larva, especially epithelium of midgut and body muscle were stained clearly but no

specific-fluorescence was detected at cuticular layer. Anti-*Anisakis* Hb IgG stained perienteric cavity and hypodermal layer of the larva. Anti-somatic antigen IgG reacted to the whole tissues of *Anisakis* larva including cuticular layer.

2) Anti-*Anisakis* crude antigen IgG and anti-*Anisakis* somatic antigen IgG showed cross-reaction to all the ascarids examined, i. e. *Ascaris lumbricoides* suum, *Toxocara cati*, *Contra-caecum* type larva (A) and *Terraova decipiens* larva. On the contrary, anti-*Anisakis* Hb IgG cross-reacted to no other ascarids than *Terranova*.

3) As to the degenerate worms at hypoderm or gastric submucosa of rabbits, anti-*Anisakis* Hb IgG had no reactivity to the section of larva inoculated to rabbit subcutaneously before 2 weeks. Anti-*Anisakis* crude antigen IgG stained the larva inoculated to hypoderm before 4 weeks. Moreover, anti-*Anisakis* somatic antigen reacted to the ground *Anisakis* larva which injected to gastric mucosa before 6 weeks.

4) As the cyst-wall of *Anisakis* larva in the intermediate host was not stained by FITC-labelled anti-serum, it was thought to be a products of the intermediate host.

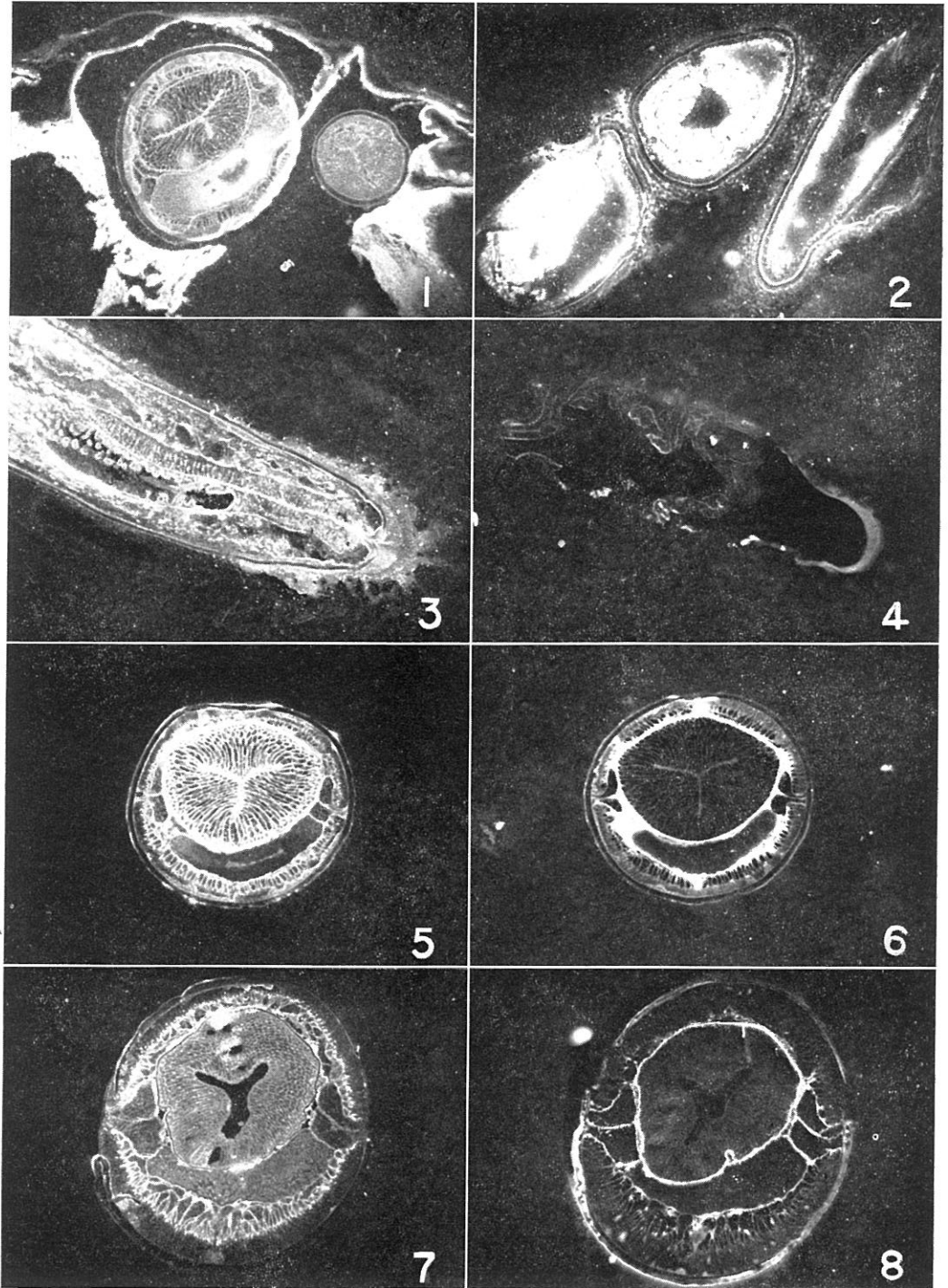
The PAS positive homogenous area which is often found in the host tissue surrounding the anterior extremity of the larva seemed to be a secreted substance of the larva, for it reacted to anti-*Anisakis* crude antigen IgG.

5) As to the effect of fixatives on the reactivity, formol fixation caused diminishing of the reactivity to anti-serum, but ethanol had no harmful effects on reactivity.

Histological sections with paraffine embedding technique of Sainte-Marie (1962) produced a good result as well as cryostat sections.

Explanation of Figures

- Fig. 1 Section of encysted *Anisakis* larva (I) in the peritoneal cavity of intermediate host (*Theragra chalcogramma*).
Cross sections of larva shine in green colour but the external cyst-wall has brilliant pale blue colour of auto-fluorescence. (Fig. 1-5 stained with FITC-labeled anti-*Anisakis* crude antigen IgG)
- Fig. 2 *Anisakis* larva in stomach wall of rabbit 24 hours after per os infection.
Specific green fluorescence is seen also in the host tissue at the vicinity of the larva.
- Fig. 3 Same as Fig. 2.
Surrounding the anterior extremity of the larva, so called homogeneous area is seen having green fluorescence.
- Fig. 4 Moulting cuticle and homogeneous area in the rabbit stomach 7 days after per os infection.
Green fluorescence is observed in the homogeneous area and the surface of the cuticle.
- Fig. 5, 6 Cross section of *Anisakis* larva (I).
Fig. 5 stained with anti-*Anisakis* crude antigen. Fig. 6 stained with anti-*Anisakis* Hb showing specific fluorescence at the perienteric cavity and the hypodermal layer.
- Fig. 7, 8 Cross section of *Terranova decipiens* larva.
Fig. 7 stained with anti-*Anisakis* crude showing distinct cross reaction. Fig. 8 stained with anti-*Anisakis* Hb. Cross reaction is also seen at the perienteric space.



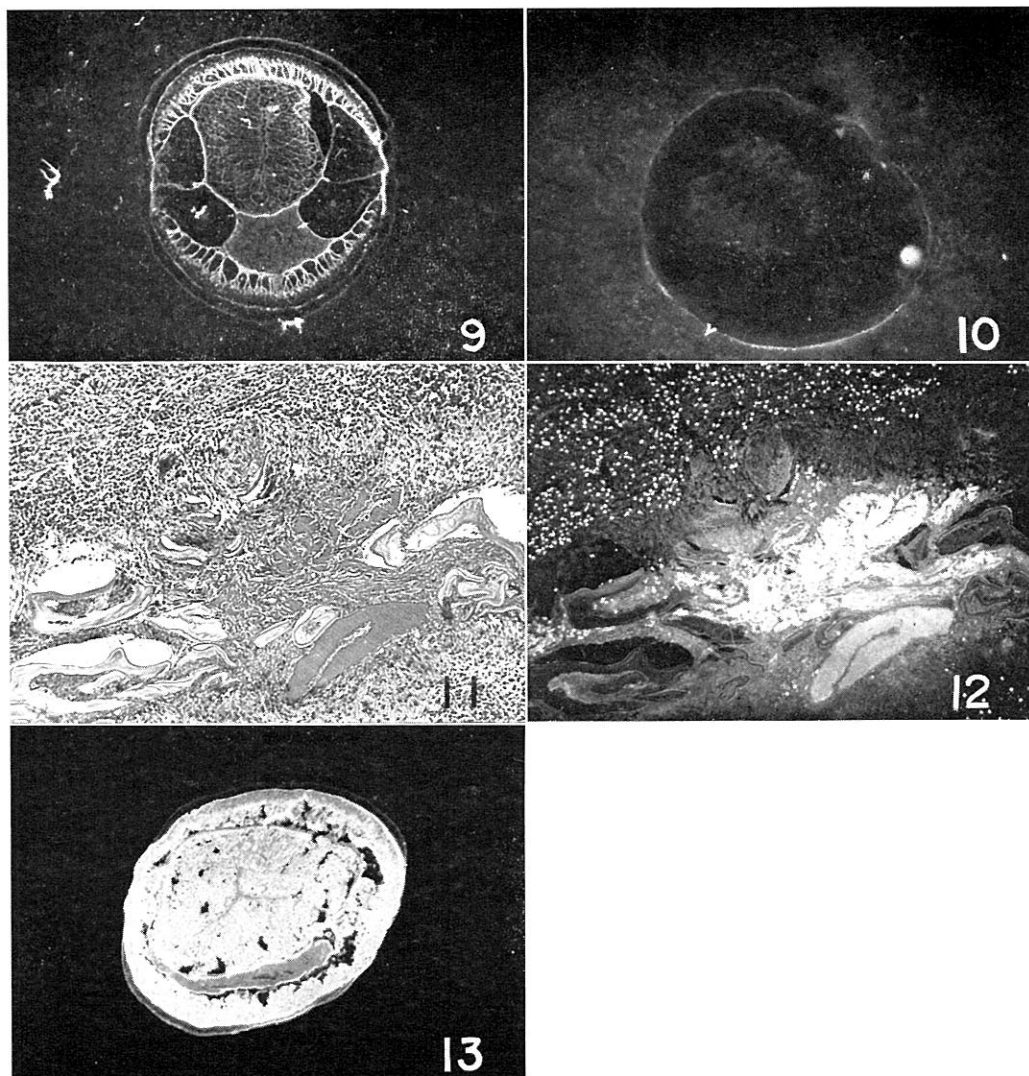


Fig. 9, 10 Cross sections of *Contracaecum*-type larva.

Fig. 9 stained with anti-*Anisakis* crude antigen. Cross reaction is also inevitable here. Fig. 10 stained with anti-*Anisakis* Hb. No specific fluorescence is seen.

Fig. 11, 12 Section of granuloma in the stomach wall of rabbit caused by injection of ground *Anisakis* larva before 40 days.

Fig. 11 H. E. stain. Fig. 12 stained with anti-*Anisakis* somatic antigen. Pieces of larval body muscles (at the center) shine brightly in green and fragments of the cuticle at the circumference were stained in dark green.

Fig. 13 Cross section of *Anistkis* larva stained with anti-*Anisakis* somatic antigen. Cuticular layer is seen in dark green, and the other tissues shine in brilliant green.