

コトナラットフィラリア *Litomosoides carinii* の排泄・分泌抗原に関する研究

高岡正敏* 田中寛

東京大学医科学研究所寄生虫研究部

(昭和50年3月17日 受領)

はじめに

寄生虫の排泄・分泌抗原 (ES 抗原) について、従来いくつかの報告がある。Campbell (1955) は旋毛虫の ES 物質が虫の発育抑制に重要な役割をはたしていることを発見した。Kagan & Oliver-Gonzalez (1958) は住血吸虫について間接赤血球凝集反応を行ない、Oliver-Gonzalez & Levine (1962) は旋毛虫に関してゲル内沈降反応、Anderson *et al.* (1962) は広東住血線虫について補体結合反応を、Jacobs *et al.* (1965) は赤血球凝集反応を、Yogore *et al.* (1965) は Ouchterlony 法、電気泳動法を使つて肺吸虫で抗原性を認め、小林ら (1968) はアニサキスの ES 抗原を、細井 (1968) は犬回虫の ES 抗原について興味深い報告を行なっている。最近では Ozerol & Silverman (1970) が *Haemonchus contortus* で ES 抗原について報告している。

本研究では、実験的に感染させたコトナラットの胸腔から得た *Litomosoides carinii* (Lc) 成熟成虫より得た ES 物質を用いて Ouchterlony 法、免疫電気泳動法によるゲル内沈降反応および補体結合反応、間接赤血球凝集反応を試み、その抗原性の存在を調べ、従来使用されている虫体抽出抗原 (SM 抗原) と比較検討した。

材料と方法

I. 抗原作製

1. ES 抗原

実験的感染後 13~20 週のコトナラット (*Sigmodon hispidus*) の胸腔より無菌的に *Litomosoides carinii* (Lc) 成虫を取り出し、生理食塩水で洗滌後、pH 7.2 の無蛋白培養液 RPMI 1640 (日水薬品) 10 ml に雄 5、雌 5 を入れ、37°C で約 24 時間放置し、虫を除いて培養液を集めた。虫は 24 時間後も培養液中で活発に生きてい

た。

この培養液を 2,500 rpm, 5 分間遠心し、その上清をロージョンバッグ (Sartorius) で濃縮し、pH 7.2 の磷酸緩衝生食水 (PBS) で置換し、元の培養液の 1/200 に濃縮し、それを原液として -20°C に保存した。原液の蛋白量は吸光度測定による Warburg & Christian (1941) の方法で算出して、0.34mg/ml であつた。また感染後 4, 7, 13~15 週の Lc 成虫からも上記の方法で ES 物質を採取した。

雌雄各々からの ES 物質の採取には、培養液 10ml あたり、雄ならば 10 匹、雌ならば 5 匹を入れた。Ouchterlony 法、IEP に用いた抗原は感染後 13~15 週の成虫より採取した。

2. SM 抗原

ゲル内沈降反応に用いた抗原は、感染後 13~20 週の雌雄成虫を凍結乾燥し、虫体重量の 10 倍量の PBS-7.2 を加え、ガラスホモジナイザーで 2 分間磨砕し、のち 2 分休止し、この操作を 5 回くりかえし、-4°C で 24 時間抽出し、遠心分離後 -20°C に保存した。使用の際、Ouchterlony 法では、抗原を虫体乾燥重量の 40 倍に希釈したものを用い、IEP では 10 倍希釈のものを用いた。

CF 反応に用いた抗原の作製は虫体を凍結乾燥し、エーテルで脱脂したのち、ガラスホモジナイザーで 10 分間、テフロンホモジナイザーで 5 分間磨砕し、Coca 液で 24 時間抽出した (Chaffee *et al.*, 1954, Chaffee 抗原)。抽出液を 13,000 G で 30 分間遠心分離し、上清を -20°C に保存して使用した。

II. ゲル内沈降反応

1. Ouchterlony 法

Kamiya *et al.* (1973) の方法に準じて行なつた。バルビタール緩衝液 pH 8.6, $\mu=0.05$ を使用し、1.0% 寒天 (Difco Agar Noble) をあらかじめ十分溶解し、冷

* 現所属 東京医科歯科大学医動物学教室

蔵庫に保存した。使用毎にゲルを溶かし、76×27mmのスライドグラスに2mlの寒天液をのせた。直径3mmの孔を直径15mmの円周上に6個、中心に1個あけた。この孔に抗原、血清を滴下し、4°Cで3日間反応させ、0.85%の生食水で3日間洗滌し、37°Cで乾燥させた。この標本をCoomassie brilliant blueで1晩染色し、のち24時間脱染色し、乾燥後沈降線を観察した。

2. 免疫電気泳動法 (IEP)

寒天ゲルはOuchterlony法で用いたものを使用した。110×80mmのガラス板に8.5mlの寒天液をのせ、抗原孔の直径は3mm、血清溝は短辺に平行に幅1mmとし、抗原孔と血清溝の間隔を5mmとした。先ず抗原孔を作り、1.5mA/cmの定電流で泳動し、示標として血清に混じたAmido black 10Bが陽極側に20mm移動した時に泳動を終了した。のち血清溝を作り、血清を入れて4°Cで3日間反応させ、Ouchterlony法と同様に染色して観察した。

III. 補体結合反応 (CF)

Tanaka *et al.* (1970)のマイクロタイター法で行なった。本法はKolmer法で、3単位の補体を使用するが、感作血球作製、補体力価測定には正確をきずるために50%溶血法の手段によつた。

Lc虫体で免疫した兔血清を標準血清として用いた。免疫には生食水にLc乾燥虫体を重量で10%入れた磨砕液を用いた。磨砕液とフロインドアジュバントを等量に加え、懸濁液にした後1mlを2週間間隔で2回足掌に皮下注射し、さらに2週後に磨砕液を1ml皮下注射し、10日後に全採血を行なった。

標準兔血清 (R 072) およびコトナラット血清は生食水で10倍希釈し、65°C、20分加温して、非働化と抗補体作用の除去を行なつて、反応に用いた。Chaffee抗原と標準血清間でボックスタイトレーションを行つた結果、抗原価は1:64,000、抗体価は1:1,920であつた。

CF反応の希釈液はゼラチン加パルビタール生食水 (BGS) を用い、羊血球はAlsever液保存の市販品を用いた。羊血球をBGSで洗滌し、血球濃度を10⁹/mlに調整した。溶血素は100倍希釈にして冷蔵庫に保存し、使用毎に最適濃度に調整し、等量の血球液と37°Cで30分反応させて感作した。補体は乾燥補体 (東芝化学) をグリーン氏液で溶解して用いた。適当に希釈した補体の0.2, 0.25, 0.3, 0.4mlを用いた時の溶血量からグラフ法により補体力価を算定した。

血清の検査にはマイクロタイターの1孔に血清1滴

(0.025ml) を入れ、1:8より1:250まで2倍希釈した。各孔に抗原の最適濃度の液を1滴 (0.025ml) と補体を2滴 (0.05ml, 3単位) を加えて冷蔵庫内で一晚反応させた。翌朝3.5倍に希釈した感作血球1滴 (0.025ml) を加え、37°Cの孵卵器内で1時間保温し、室温に2時間放置後に判定した。反応は孔の底に生じた血球沈渣の大きさと溶血度により、0~4に分け、完全溶血と非溶血の中間の反応2を終末点とした。

IV. 間接赤血球凝集反応 (HA)

方法はJacobs & Lunde (1957), Kamiya & Tanaka (1969) に準じ、マイクロタイター法によつたが、羊血球はCsizmas (1960) の方法によりホルマリン固定したものを使用した。

固定羊血球をPBS-7.2で40倍の浮遊液とし、1:60,000のタンニン酸溶液と37°C、15分反応させ、生食水におきかえた後、抗原と27°C、15分間反応させ、0.6%の正常家兔血清に浮遊させた。

免疫兔血清 (R 072) を用いてボックスタイトレーションを行ない、抗原の最適濃度を求めた。反応はプレートの孔の底の血球の凝集の程度により0~4の5段階に分類し、血球が底一ぱいに広がり、沈渣の外縁に不鮮明な円を作つたものを反応3として終末点とした。

結 果

I. ゲル内沈降反応

1. Ouchterlony 法

ES抗原の保存原液で反応を行なつた結果Lc感染コトナラット血清70検体中56 (80%) に陽性反応がみられ1~3本の沈降線を認めた。保存原液の1:20希釈のSM抗原では陽性60 (85.7%) で、1~4本の沈降線を認めた。正常コトナラット血清29検体はすべて陰性を示した。

また *Dirofilaria immitis* (Di) 感染犬血清60検体中Lc ES抗原で6例 (10%)、Lc SM抗原で4例 (6.7%) の陽性反応を認めた。

Lc感染血清に対するES抗原とSM抗原の反応陽性率の差を検定すると、 $\chi^2=0.452$, $0.7 > Pr > 0.5$ で有意な差は認められなかつた。またDi感染血清に対するESとSM抗原の反応陽性率の差の検定でも $Pr.=0.372$ で有意な差は認められなかつた (Tab. 1)。

Lc感染血清に対して、SM抗原では4本、ES抗原では2本の沈降線がみられ、この2本の沈降線はSM抗原の沈降線と結合がみられた (Fig. 1)。Di感染血

Table 1 Double diffusion test in sera from cotton rat infected with *Litomosoides carinii* and from dogs infected with *Dirofilaria immitis*. Antigen is the incubate of adult *Litomosoides* condensed to 1/200

Serum	ES antigen		SM antigen		Total
	+	-	+	-	
Lito-infected cotton rat (% positive)	56 (80%)	14	60 (85.7%)	10	70
Non-infected cotton rat	0 (0%)	29	0 (0%)	29	29
Diro-infected dog	6 (10%)	54	4 (6.7%)	56	60

Lito; *Litomosoides carinii*

Diro; *Dirofilaria immitis*

ES; Excretory and secretory

SM; Somatic

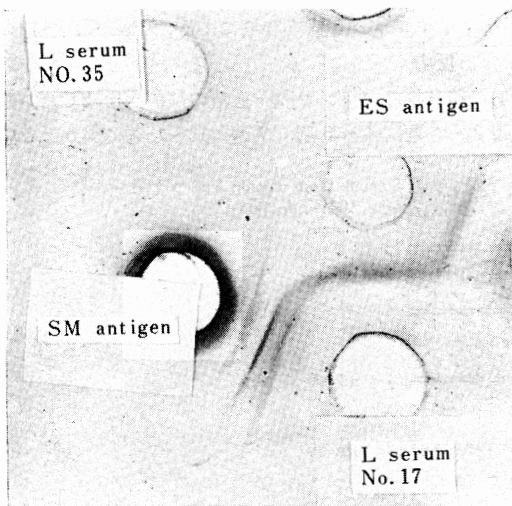


Fig. 1 The precipitin bands between ES antigen and sera from infected cotton rats show coalescence to those with SM antigen

L serum: Serum from *Litomosoides* infection (No. 17, 35)

ES antigen: Excretory and secretory antigen of *Litomosoides*.

SM antigen: Somatic antigen of *Litomosoides*.

清と Lc ES 抗原および Lc SM 抗原それぞれの間に出現した沈降線も結合がみられた。しかし、Lc 感染血清、Di 感染血清の各々に出現する沈降線は、ES 抗原でも SM 抗原でも交叉を示し、異質であつた (Fig. 2, 3).

Lc 感染血清を SM 抗原で吸収すると SM 抗原, ES

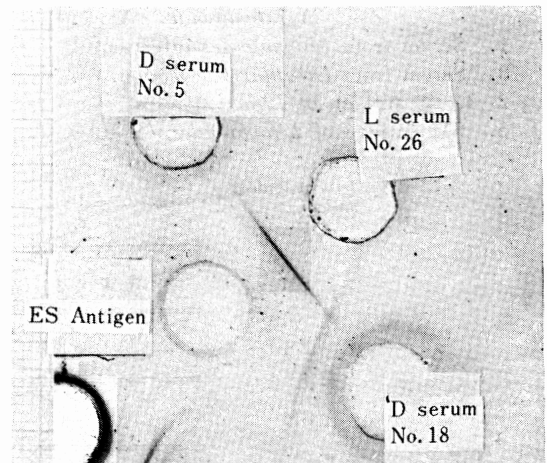


Fig. 2 The precipitin bands between ES antigen of *Litomosoides* and dog serum show crossing to the bands between ES antigen and serum from *Litomosoides* infection

D serum: Serum from *Dirofilaria immitis* infection (No. 5, 18)

L serum: Serum from *Litomosoides carinii* infection (No. 26)

ES antigen: Excretory and secretory antigen of *Litomosoides*.

抗原共に沈降線が出現しないので、ES 抗原は SM 抗原に含まれていると判定された。

2. IEP

i. SM 抗原と ES 抗原による沈降線の比較。

Lc 感染血清と SM 抗原との間に 9本の沈降線を認め、便宜的に a-i と記号をつけた (Fig. 4)。このうち

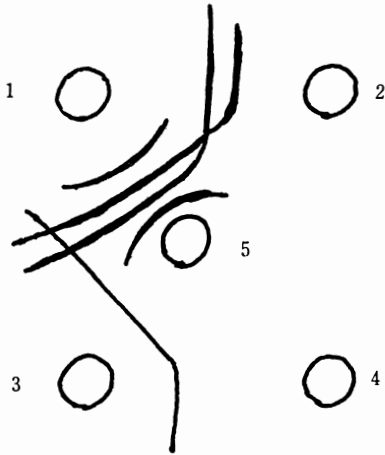


Fig. 3 Analysis of antibody in cotton rat infected with *Litomosoides* and dogs with *Dirofilaria* against ES and SM antigens of *Litomosoides*

1. Serum from *Litomosoides* infection.
3. Serum from *Dirofilaria* infection.
2. 4. ES antigen of *Litomosoides*.
5. SM antigen of *Litomosoides*.

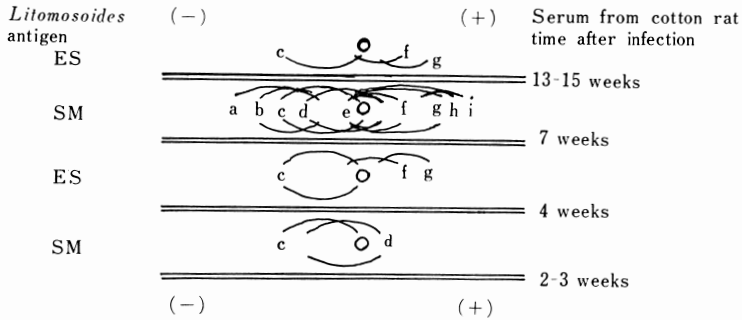


Fig. 4 Sequential development of precipitin bands to ES and SM antigens in sera of cotton rats after infection with *Litomosoides*

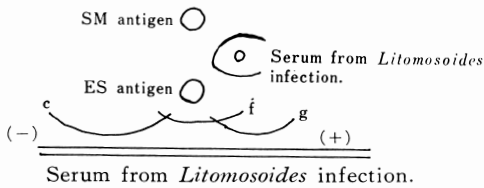


Fig. 5 Identification of band by ES antigen of *Litomosoides* in comparison with SM antigen by IEP

dはほとんどの感染血清にみられ、次に c, f, g が多くみられたが、その他の沈降線はまれに認められた。また感染血清と ES 抗原との間には3本の線を認め、陰極

側に1本、陽極側に2本みられ、SM 抗原との間の沈降線 c, f, g に相当した。この3本のうち c, g がよく出現し、感染血清20検体中、各々50%の出現率を示し、f は20%にみられた。ES 抗原と SM 抗原の沈降線の同定のため、Fig. 5 に示すごとく、SM 抗原と ES 抗原を同条件下で泳動し、陽極側の沈降線が出現する抗原孔より5 mm の所に直径1 mm の孔をあけ、抗体を入れて反応させたところ、ES 抗原による沈降線は SM 抗原で出現する沈降線 g と結合した。ES 抗原による他の沈降線はその位置により同定した。

ii. 虫体の発育期と ES 抗原

感染後4週の幼若虫より得た ES 物質に対する感染血清の反応は認められなかつた。感染後7週、13~15週の虫体から得た ES 物質では Fig. 6 に示す様に3本の沈降線が認められた。

iii. コトナラット感染時期による ES, SM 抗原の反応

感染後各期のコトナラット血清の反応を比較した。感染後2~3週、4~5週、7週、13~15週に得た Lc 感

染血清に対し、ES 抗原、SM 抗原で反応を行なつた (Fig. 4)。ES 抗原を使用した場合、感染後4週血清では、沈降線 c 1本が出現し、7週血清ではさらに f, g が出現した。

SM 抗原を用いた場合、ES 抗原では反応がみられなかつた感染後2~3週血清で沈降線 d を認め、4週で c が出現し、6週までこの状態が続いた。7週では沈降線は3~6本と増加し、13~15週では3~9本となつた (Tab. 2)。

iv. 雌雄成虫別の ES 抗原

雄から ES 物質についてゲル内沈降反応を行なつたが、陽性反応は認められなかつた。一方雌からの ES 物

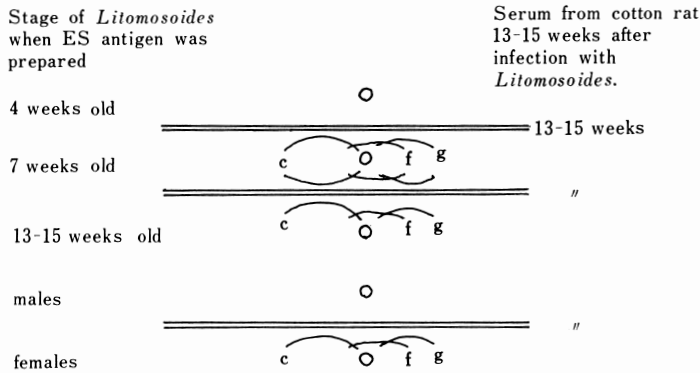


Fig. 6 Production of ES antigen by various developmental stages of *Litomosoides*

Table 2 Reactions of ES materials from different stages of *Litomosoides* with sera from cotton rats at various intervals after infection by immunoelectrophoresis

Antigen	Stage of worms after infection	Sera from cotton rat infected with <i>Litomosoides</i>			
		3 weeks	4-5 weeks	7 weeks	13-15 weeks
ES	4 weeks	-	-	-	-
ES	7	-	+(1)	+(1-3)	+(2-3)
SM	"	+(1)	+(2)	+(3-7)	+(2-9)
ES	13-15	-	+(1)	+(1-3)	+(2-3)
SM	" "	+(1)	+(2)	+(3-7)	+(3-9)
ES	Male	-	-	-	-
SM	"	+(1)	+(2)	+(3-5)	+(3-7)
ES	Female	-	+(1)	+(1-3)	+(2-3)
SM	"	+(1)	+(2)	+(3-6)	+(3-9)

ES; Excretory and secretory

SM; Somatic

(); The number of bands by immunoelectrophoresis

質では3本の沈降線が認められた (Tab. 2, Fig. 6).

II CF 反応

感染後13~15週の Lc 成虫より得た ES 抗原と Lc 感染血清 (no. 33) および Lc 虫体で免疫した兎血清 (R 072) の間でブロックタイトレーションを行ない、高い抗原性を認めた。

感染血清では抗体価 1 : 160, 抗原の最少必要濃度は 1 : 16で, 元の培養液の1/3の濃縮に相当した。免疫血清の抗体価は 1 : 480で, 抗原の力価は感染血清に対する価と同じであった (Tab. 3)。

最適濃度の ES 抗原を用いて, コトンラットの血清反応を行なった。正常血清の反応の結果, 抗体価の陽性限界を 1 : 12とした (Tab. 4)。ES 抗原を用いた場合, Lc 感染血清26の中, 抗体価 1 : 12以上が23, 1 : 8以下が3となり, 陽性率は88.5%であった。SM 抗原

では感染血清16中陽性率は87.5%であった。

感染後4週の幼若虫の ES 物質を用い, 感染後4週, および15週の血清でブロックタイトレーションを行なったが, 抗原活性は認められなかった。

雌および雄成虫の各々からの ES 物質と Lc 感染血清あるいは免疫兎血清の間でブロックタイトレーションを行ない, 抗原性を調べた (Tab. 5, 6)。雌 ES 物質では強い抗原性を示し, 雄 ES 物質も雌からのもの程強力ではなかったが, 抗原性が認められた。

III HA 反応

ES 抗原中の HA 反応に対する抗原性を調べたが, かりうじて免疫兎血清 (R 072) の間で抗原性が認められた (Tab. 7)。実際にES 抗原を HA 反応に利用するのは, CF 反応に比べ多量の虫体培養液を必要とするので困難を感じる。

Table 3 Block titration of complement fixation test with ES antigen to immunized rabbit serum and serum from an infected cotton rat. Antigen is the incubate of *Lito mosoides* condensed to 1/50

Antigen dilution 1 :	Cotton rat serum. Dilution 1 :							
	10	20	40	80	160	320	640	cont
1	4	4	4	3	2	1	0	0
2	4	4	4	3	2	1	0	0
4	4	4	4	3	2	1	0	0
8	4	4	4	3	2	1	0	0
16	4	4	4	3	2	1	0	0
32	4	3	2	1	0	0	0	0
cont	0	0	0	0	0	0	0	0

Antigen dilution 1 :	Immune rabbit serum. Dilution 1 :							
	10	20	40	40	160	320	640	cont
1	4	4	4	4	4	3 X	1	0
2	4	4	4	4	4	3 X	1	0
4	4	4	4	4	4	3 X	1	0
8	4	4	4	4	4	3 X	1	0
16	4	4	4	4	4	3 X	1	0
32	4	4	4	4	3 X	1	0	0
cont	0	0	0	0	0	0	0	0

Degree of reaction is classified into 5 classes, from 0 to 4. End point of reaction is 2 or mark X

Table 4 Complement fixation test in the infected and non-infected cotton rats using ES and SM antigens of *Litomosoides*

CF titer 1 :	Infected		Non-infected
	ES Ag	SM Ag	ES Ag
4>	0	0	6
4	1	1	15
6	1	0	1
8	1 3	1 2	3 25
12	4	3	0
16	2	2	0
24	6	4	0
32	4	2	0
48	4	1	0
64	1	1	0
96	1	1	0
128	1 23	0 14	0 0
Total	26	16	25

ES Ag : Antigen at 10 fold concentration of the incubate

SM Ag : Somatic antigen at 1 : 32,000 dilution

考 察

Litomosoides carinii を実験的にコトナラットに感染させ、Tanaka *et al.* (1968) は虫体抽出抗原を使つて HA 反応を行ない、90%を越える陽性率を得た。また、Tanaka *et al.* (1969) は抽出抗原を用いた CF 反応で、感染動物中95%を越える陽性成績を報告している。さらに神谷ら (1973) は Lc SM 抗原を用い、Lc 感染コトナラット血清のゲル内沈降線反応を行ない、98%近い反応の一致をみている。

フィラリアの ES 抗原に関しては、Ishii (1970) が *Litomosoides* からの ES 物質の抗原性を、HA、CF 反応を用いて検討し、Lc 成虫が寄生するコトナラットの胸腔液に抗原性を認めている。

本研究では、感染後4週の幼若虫からの ES 物質にはゲル内沈降反応、CF 反応共に抗原性が認められなかったが、7週以降の成虫からの ES 物質には抗原性を認めた。

Yogore *et al.* (1965) は本研究の結果と同様に、肺吸虫の ES 物質は虫体抽出物質と免疫学的に同質のも

Table 5 Block titration of complement fixation test with ES antigens from both sexes of *Litomosoides* and immunized rabbit serum. Antigen is the incubate of worms condensed to 1/50

ES antigen from females

Antigen dilution 1 :	Serum dilution 1 :							
	10	20	40	80	160	320	640	cont
1	4	4	4	4	4	4 X	0	0
2	4	4	4	4	4	4 X	0	0
4	4	4	4	4	4	4 X	0	0
8	4	4	4	4	4	4 X	0	0
16	4	4	4	4	4	4 X	0	0
32	4	4	4	4	2	0	0	0
cont	0	0	0	0	0	0	0	0

ES antigen from males

Antigen dilution 1 :	Serum dilution 1 :							
	10	20	40	80	160	320	640	cont
1	4	4	4	4	4	4 X	1	0
2	4	4	4	4	4	2	1	0
4	4	4	4	4	3 X	1	0	0
8	4	4	4	3 X	1	0	0	0
16	4	4	2	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0
cont	0	0	0	0	0	0	0	0

End point ; 2 or mark X

のであることを報じている。しかし、Oliver-Gonzalez & Levine (1962) は施毛虫で、小林ら (1968) はアニサキスで、細井 (1968) は犬回虫で、Ozerol & Silverman (1970) は *Haemonchus contortus* で ES 抗原は抗原と異なる免疫学的特性を有していることを報じている。

石井ら (1968) は感染コトラットの試験で、HA、CF 反応を行ない、感染後 6 ~ 9 週で抗体が検出されることを報じ、Fujita & Kobayashi (1969) は HA 反応において、7 週以降の γ G、 γ M の推移を追跡している。また本研究でも、Lc SM 抗原を用いた IEP で、4 週の血清にわずか 2 本の沈降線が認められるだけであるのが、7 週頃より沈降線が急増してくることなどから、この時期に成虫より放出される ES 物質が抗体産生を刺激する重要な役割を荷つていることがうかがえる。

神谷ら (1973) は Lc 感染コトラットにおいて、Lc SM 抗原を用いてゲル内沈降反応を行ない、HA、CF 反応で抗体の検出が出来ない時期、感染後 6 週まで

の血清を調べ、感染後 2 週より抗体を検出している。本研究では、この沈降線は ES 抗原による沈降線とは異なるものであることを認めた。この抗体は、感染後すぐに受けた抗原刺激により産生されたものと考えられ、虫体抗原と共通の感染幼虫からの抗原物質が刺激になったものと考えられる。

ゲル内沈降反応を用いた場合、ES 抗原では感染の検出率は 80% を示したが、CF 反応では 90% 近い陽性率を示した。ES 抗原を用いた CF 反応は SM 抗原を用いた場合と同様に特異的で鋭敏であつた。

感染後 4 週の幼若虫からの ES 物質には CF 反応の抗原性を認めることが出来なかつたが、7 週以降の成虫からの ES 物質には高い抗原性を認めた。またゲル内沈降反応では活性を示さなかつた雄の ES 物質にも CF 反応では抗原性が認められた。CF 反応における ES 抗原は、雌雄成虫各 5 匹を飼育した培養液の $1/3$ 濃縮で抗体検出が可能で、3.3 ml の抗原液が得られた。虫体数に対する抗原液の収量は SM 抗原に比べて多く、また作製も容易であるので、この方法は成虫採取の困難なフ

Table 6 Block titration of complement fixation test with serum from an infected cotton rat and ES antigens from both sexes of *Litomosoides*. Antigen is the incubate of worms condensed to 1/50

ES antigen from females									
Antigen dilution 1 :	Serum dilution 1 :								cont
	10	20	40	80	160	320	640		
1	4	4	4	4	4	3 X	0	0	0
2	4	4	4	4	4	3 X	1	0	0
4	4	4	4	4	4	3 X	1	0	0
8	4	4	4	3	2	0	0	0	0
16	4	3 X	1	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cont	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ES antigen from males

Antigen dilution 1 :	Serum dilution 1 :								cont
	10	20	40	80	160	320	640		
1	4	4	4	4	2	0	0	0	0
2	4	3 X	1	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cont	0	0	0	0	0	0	0	0	0

End point; 2 or mark X

Table 7 Block titration of hemagglutination test with ES antigen from *Litomosoides* and immunized rabbit serum. Antigen is the incubate of worms condensed to 1/50

Antigen dilution 1 :	Serum dilution 1 :									cont
	20	40	80	160	320	640	1280	2560		
1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
8	4	4	4	4	4	3	1	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cont	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

End point; 3

イラリアからの抗原作製にも応用可能と考えられる。

まとめ

コトナラットに感染した *Litomosoides carinii* (Lc) 成虫から得た排泄・分泌物質 (ES) について, Ouchterlony 法, 免疫電気泳動法 (IEP) によるゲル内沈降反応, 補体結合反応 (CF), 間接赤血球凝集反応 (HA) を行ない, 抗原性を認めた。

Ouchterlony 法 ; Lc 感染コトナラット血清70検体中, ES 抗原で陽性56 (80%), SM 抗原では陽性60

(85.7%) であつた。正常コトナラット血清25検体は全て陰性であつた。 *Dirofilaria* 感染犬血清60検体中, ES 抗原で6 (10.0%), SM 抗原では4 (6.7%) の陽性反応を示した。この *Dirofilaria* 感染血清と Lc 感染コトナラット血清に出現する各々の沈降線は交叉を示し, 異質であつた。SM 抗原で吸収した感染血清と ES 抗原の間には反応がみられず, ES 抗原は SM 抗原中の物質と同質であつた。

IEP ; SM 抗原と Lc 感染コトナラット血清間には最大9本 (a-i) の沈降線が認められ, ES 抗原との間には

3本が認められた。その中1本cは陰極側に、2本f、gは陽極側に位置していた。感染後4週の血清では沈降線cがみられ、7週以後にf、gの2本が現れた。SM抗原を用いた場合、ES抗原で反応のみられなかつた感染後3週の血清で、沈降線dが認められ、4週には沈降線cがみられ、7週頃より沈降線数が急増した。

CF反応；ES抗原では、Lc感染血清26検体中、陽性23(88.5%)を示し、SM抗原では、陽性率は87.5%であつた。また、正常血清は全て陰性反応を示した。

感染後4週の幼若虫からのES物質には抗原性がみられなかつたが、7週以降の成虫からのES物質に抗原性を認めた。雄のES物質はゲル内沈降反応で活性を示さなかつたが、CF反応では抗原性を示し、雌では両反応とも抗原性を現した。成虫からのES抗原を用いたCF反応は鋭敏で、その抗原収量も多く、作製方法も容易であつた。

HA反応；成虫からのES物質に抗原性が認められたが、活性はCF反応より低下していた。

感染コトナラットを供給された田辺製菓・薬理学研究所、大島慧、田中英文氏に深く謝意を表す。

文 献

- 1) Anderson, R. I., Sadun, E. H., Rosen, L., Weinstein, P. P. and Sawyer, T. (1962) : The detection of antibodies in eosinophilic meningitis. *J. Parasit.*, 48 (suppl) 15.
- 2) Campbell, C. H. (1955) : The antigenic role of the excretions and secretions of *Trichinella spiralis* in the productions of immunity in mice. *J. Parasit.*, 41, 483-491.
- 3) Chaffee, E. F., Bauman, P. M. and Shapiro, J. J. (1954) : Diagnosis of schistosomiasis by complement fixation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 3, 905-913.
- 4) Csizmas, L. (1960) : Preparation of formalinized erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 103, 157-160.
- 5) Fujita, K. and Kobayashi, J. (1969) : The sequential appearance of 19S and 7S antibody in cotton rats infected with the cotton rat filaria, *Litomosoides carinii*. *Japan. J. Exp. Med.*, 39, 481-490.
- 6) 細井達夫 (1965) : イヌ回虫の研究, 1. 成虫ES抗原, *寄生虫学雑誌*, 18, 149-158.
- 7) Ishii, A. (1970) : Antigenicity of excretory and secretory products of the cotton rat filaria, *Litomosoides carinii*. *Japan. J. Exp. Med.*, 40, 39-45.
- 8) 石井明, 田中寛, 藤田紘一郎, 神谷正男, 松田肇, 小林準三 (1968) : フィラリア感染コトナラットの補体結合反応価と間接赤血球凝集反応価の経時変化について, *寄生虫学雑誌*, 17 : 402-406.
- 9) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.* 43, 308-315.
- 10) Jacobs, L., Lunde, M. N. and Weinstein, P. P. (1965) : Hemagglutination test results with antigens derived from cultures of *Angiostrongylus cantonensis* and with whole worm extracts. *J. Parasit.* 51, Sect. 2, 38.
- 11) Kagan, I. G. and Oliver-Gonzalez, J. (1958) : Hemagglutination studies with *Schistosoma* antigens. *J. Parasit.* 44, 457-460.
- 12) 神谷正男, 江下優樹, 高岡正敏, 田中寛 (1973) : コトナラットフィラリアのゲル内沈降反応の研究, *寄生虫学雑誌*, 22(1), 補6.
- 13) Kamiya, M., Tharavani, S. and Harinasuta, C. (1973) : Antigenicity for hemagglutination and immunoelectrophoresis tests in fractionated antigens from *Angiostrongylus cantonensis*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 4, 187-194.
- 14) Kamiya, M. and Tanaka, H. (1969) : Hemagglutination test in rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Japan. J. Exp. Med.*, 39, 593-599.
- 15) 小林昭夫, 熊田三由, 石崎達, 勝呂毅, 小糸賢太郎 (1968) : アニサキス幼虫抽出液ならびに虫体排泄物・分泌物抗原による皮内反応(1)一般人における皮内反応成績, *寄生虫学雑誌*, 17, 407-413.
- 16) Oliver-Gonzalez, J. and Levine, D. M. (1962) : Stage specific antibodies in experimental trichinosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 11, 241-244.
- 17) Ozerol, N. H. and Silverman, P. H. (1970) : Further characterization of active metabolites from histotropic larvae of *Haemonchus contortus* cultured in vitro. *J. Parasit.* 56, 1199-1205.
- 18) Tanaka, H., Fujita, K., Sasa, M., Tagawa, M., Naito, M. and Kurokawa, K. (1970) : Cross-reaction in complement fixation test among filaria species. *Japan. J. Exp. Med.* 40, 47-58.
- 19) Tanaka, H., Kobayashi, J., Ishii, A. and Sasa, M. (1969) : Complement fixation test with adult *Litomosoides carinii* antigen in cotton rat filaria. *Japan. J. Exp. Med.*, 39, 393-398.
- 20) Tanaka, H., Kobayashi, J., Matsuda, H. and

- Sasa, M. (1968) : Hemagglutination test with *Litomosoides carinii* antigen in the diagnosis of cotton rat filaria. *Japan. J. Exp. Med.*, 38 : 19-25.
- 21) Warburg, O. and Christian, W. (1941) : Protein estimation by ultraviolet absorption. *Biochem. Z.* 310, 389.
- 22) Yogore, M. G. Jr., Lewert, R. M. and Madoraso, E. D. (1965) : Immunodiffusion studies on paragonimiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14, 586-591.

Abstract

STUDIES ON EXCRETORY AND SECRETORY ANTIGEN IN COTTON RAT FILARIA, *LITOMOSOIDES CARINII*

MASATOSHI TAKAOKA* AND HIROSHI TANAKA

(*Department of Parasitology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo 108* *Present address; *Department of Medical Zoology, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113*)

Antigenicity in excretory and secretory materials (ES) from adult *Litomosoides carinii* was studied by Ouchterlony's (DD), immunoelectrophoresis (IEP), complement fixation (CF) and indirect hemagglutination (HA) tests.

DD test: Of 70 cotton rats infected with *L. carinii*, 56 (80.0%) were positive with ES antigen, 60 (85.7%) were positive with somatic antigen (SM) derived from *L. carinii* and all of 25 clean cotton rats were negative. The crossreaction was found in 4 (6.7%) of 60 serum samples from dogs infected with *Dirofilaria immitis* by SM antigen from *Litomosoides* and in 6 (10.0%) by ES antigen. The precipitin bands between ES antigen of *Litomosoides* and dog sera showed crossing to the bands between cotton rat sera and *Litomosoides* antigen. ES antigen was found to be involved in SM antigen since the serum from cotton rats absorbed with SM antigen showed no band either by SM or ES antigen of *Litomosoides*.

IEP test: The maximum number of bands observed between SM antigen and sera from infected cotton rats was 9 (*a-i*) and that by ES antigen was 3 (*c, f & g*). Among 3 bands the band *c* was found on cathode side with serum from cotton rats from 4 weeks after infection. Two more bands *f & g* appeared on anode side from 7 weeks after infection. Between SM antigen and sera from infected cotton rats, the band *d* appeared 3 weeks, the band *c* from 4 weeks and the other bands from 7 weeks after infection.

CF test: Of 26 infected cotton rats, 23 (88.5%) were positive for CF reaction with ES antigen and 14 (87.5%) of 16 were positive with SM antigen. All of 29 clean cotton rats were negative with antigens. Antigenicity could be detected by CF reaction in ES materials from both sexes of *Litomosoides* which were recovered from 7 weeks after infection but not in the incubate of immature worms obtained 4 weeks after infection.

HA test: Antigenicity for HA test was detected in the incubate of adult worms but the amount of antigen was less than for CF reaction.