

犬蛔虫第2期幼虫 ES 抗原の抗原分析と感染経過中 にみられる宿主の抗原認識の変化

赤尾 信明 近藤 力王至
岡本 敬 吉村 裕之

(昭和58年10月5日 受領)

Key Words: *Toxocara canis*, ES antigen, antigenicity, immunoblotting, antigen localization, rabbit

蠕虫類の産生する排泄・分泌物 (ES) は好適あるいは非好適宿主を問わず、宿主が最初に認識する抗原として重要である (Sadun, 1976). Maizeles *et al.* (1982) によれば、宿主に強い免疫応答を惹起し得るのは寄生虫を *in vitro* で培養した時の培養上清液中に存在し、寄生虫はその多くを体表面から分泌し、かつそれは属特異的であると同時に、stage 特異的でもあったと考えられている。

犬蛔虫幼虫移行症では、侵入した犬蛔虫幼虫は肉芽組織で被囊されながらも長く生きながらえる (Sprent, 1953) ことから、診断には病理学的あるいは免疫学的手法を用いなければならない。後者については近年、微量の抗体をも検出することができる感度の高い抗体測定法が開発されてきた。しかし、より信頼性のある結果を得るためには、他種寄生虫抗原との間で交叉反応がみられない、特異性の高い抗原を用いる必要がある。犬蛔虫幼虫移行症においても成虫抽出抗原 (Jung and Pacheco, 1960; Enayat and Pezeski, 1977), 成虫精製抗原 (河村, 1983; Welch *et al.*, 1983), 幼虫抽出抗原 (Polderman *et al.*, 1980), 虫卵抽出抗原 (Cypess *et al.*, 1977), 幼虫 ES 抗原 (de Savigny and Tizard, 1977; Yang and Kennedy, 1977; Smith *et al.*, 1980; van Knapen *et al.*, 1983) 等を用いた各種免疫診断法が試みられた結果、幼虫 ES 抗原の有用性が指摘されている (de Savigny *et al.*, 1979)。ところが一方、幼虫 ES それ自身の免疫化学的性状に関する知見は少なく、僅かに、幼虫 ES は抗原性を有し、少なくとも3種類 (de Savigny, 1975) あ

るいは7種類 (Maizeles *et al.*, 1982; Koizumi *et al.*, 1983) の蛋白質から構成され、IgG あるいは IgM 抗体を宿主に誘導し得るのみならず IgE 抗体をも誘導する糖蛋白 (Sugane and Oshima, 1983) と報告されている。

著者らは、犬蛔虫幼虫移行症における免疫現象を解析するための基礎的研究の一環として、幼虫 ES の抗原性とその局在、ならびに幼虫包蔵卵投与後の宿主の抗原認識が感染経過につれてどのように変化するかを検討し、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

抗原の調整

抗原組成および抗原活性の比較のために、犬蛔虫雌成虫抽出抗原 (AEX), 第2期幼虫抽出抗原 (LEX), 幼虫 ES 抗原 (LES) の3種類の抗原を用いた。AEX と LEX は近藤ら (1981) の方法に従って抽出した虫体粗抗原である。LES は de Savigny (1975) の方法を若干変更して作製した。即ち、近藤ら (1981) の方法で集めた活発に運動する第2期幼虫を Eagle'MEM (日水製薬) で無菌的に培養して、その上清を濃縮・透析して作製した。実験には培養後4週目までの LES を用いたが構成蛋白質の比較のために、一部培養後8週目から17週目までのものを抗原として使用した。抗原はいずれも凍結乾燥したものを、用に臨んで0.4%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS, 半井化学) 加0.15M トリス-グリシン緩衝液 (pH 6.8) に溶解して使用した。抗原の蛋白量は Lowry (1951) の方法に従って測定した。

感染血清

虫卵の培養および家兎への感染方法は近藤ら (1981)

本研究の一部は昭和57年度文部省科学研究一般C (課題番号56570159) の補助をうけて行われた。記して謝意を表す。

金沢大学医学部寄生虫学教室

の方法に準じて行つた。即ち、犬蛔虫自然感染犬から採取した雌成虫の子宮内虫卵を 30C の 0.5%ホルマリン水中で培養し、30日以上経過した幼虫包蔵卵を 5羽の家兎(日本白色種、雄、2kg)に 1×10^5 個あて経口投与した。採血は経時的に行つたが、今回用いた血清は感染後 2 および 26 週目のもので、使用時まで $-20C$ に保存した。

SDS-PAGE と蛋白分画のニトロセルロース膜への転写 (immunoblotting)

抗原組成の分析は Laemmli (1970) の方法に準じたスラブ型 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) によつて行つた。即ち、2.5% SDS, 10%グリセリン, 2.5% 2-メルカプトエタノール (和光純薬) を含んだ 0.15M トリス-グリシン緩衝液 (pH 6.8) 1 ml に各抗原 2 mg を溶解し、 $100C \cdot 90$ 秒間湯煎した。この抗原液 10μ l を 10%ポリアクリルアミドゲルで、100 V 定電圧、270分間泳動した。蛋白染色のためにはクマシー・ブリリアント・ブルー・R-250 (メルク) あるいは銀染色キット (バイオ・ラド) を用い、糖を含有する分画の染色には Zacharius (1969) の方法でゲルを PAS 染色した。また分子量 (MW) を推定するための指標として、生化学工業製分子量測定マーカー (耐熱製 RNA ポリメラーゼ B サブユニット β' : 180K, β : 140K, X: 100K, α : 42K, Z: 39K) を同時に泳動した。

SDS-PAGE 終了後、分画された蛋白質を Southern (1975) の方法でニトロセルロース膜 (ミリポア) に転写した。この膜を Towbin *et al.* (1979) の方法に従つて間接酵素抗体染色を行い、家兎 IgG 抗体に反応する抗原分画を同定した。一次反応血清として用いた感染血清は 3%牛アルブミン加リン酸緩衝食水 (pH 7.2) で 100倍に希釈し、標識抗体はペルオキシダーゼ結合ヤギ抗家兎 IgG 血清 (カッペル) を 400倍に希釈して用いた。発色基質は 3-3' ジアミノベンチジントラヒドロクロライド (DAB, ドータイト) 2 mg を 10ml の 0.05M トリス塩酸緩衝液に溶解し、使用直前に 0.3% H_2O_2 100 μ l を加えたものを用い、室温で 4 ~ 5 分間反応させたのち蒸留水で水洗した。

感染血清に反応する抗原の局在部位

培養開始直後の第 2 期幼虫あるいは培養後 17 週目の幼虫を $-80C$ に冷却した 95% エタノールで固定し、瀬野尾ら (1977) の方法で JB-4 樹脂包埋した。1 μ m に薄切したこの幼虫切片を抗原として、感染後 2 および 26 週目の家兎血清中の IgG 抗体に反応する抗原の局在を間接酵素抗体染色法により観察した。これに用いた感染血清

の希釈倍数は 1 : 40, 標識抗体 (ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗家兎 IgG 血清) のそれは 1 : 200 で、発色基質はニトロセルロース膜を染色した時に用いたのと同じ組成の DAB を用いた。発色終了後の切片は水洗し、飽和メチレンブルー水溶液で一晩後染色を施し、iso-プロピルアルコールで脱水、キシロールで透徹して封入した。また対照として、一次血清の代りに非感染家兎血清あるいはリン酸緩衝食水 (PBS) を用いて標識抗体と反応させた。

結 果

AEX, LEX および LES の蛋白組成と糖含有分画の比較

SDS-PAGE 後のクマシー・ブルー染色によつて AEX, LEX, LES はそれぞれ明瞭なバンドに分画された (Fig. 1)。AEX と LEX は極めて多数の蛋白分画からなる複雑な組成を示したが、LES は少なくとも 8 本のバンドに分画され、AEX や LEX に較べて比較的簡単な組成を示した。またその分子量は陰極側から順に 130K (band 1), 100K (band 2), 80K (band 3), 40K (band 4), 35K (band 5), 32K (band 6), 30K (band 7) および dye front まで泳動される極めて低分子のポリペプチドと推定された。

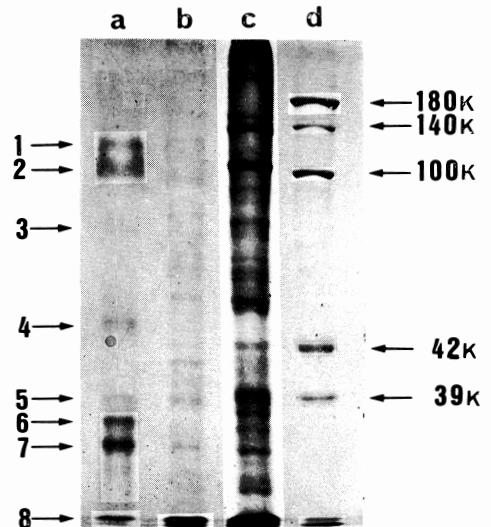


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of LES (a), LEX (b) and AEX (c) of *Toxocara canis*. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250. Lane (d) indicated the molecular weight of marker proteins at 39K, 42K, 100K, 140K and 180K.

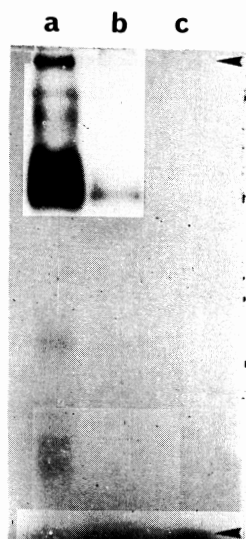


Fig. 2 Comparison of electrophoretic patterns of PAS-reacting bands of LES (a), LEX (b) and AEX (c). Arrow indicated the PAS weakly reacting bands of AEX.

ゲルのPAS染色では3種抗原の中でLESが最も強い反応を呈した。なかでもMW:100K以上の分画とは強く反応したが、band 3はPAS反応陰性であった(Fig. 2)。LEXはLESとよく似たPAS陽性分画を保持していたが(Fig. 2 lane b)、AEXでは僅かに高分子量の領域とdye frontの2本のバンドがPAS弱反応性であった。

クマシー・ブルー染色よりもさらに鋭敏に蛋白質を検出し得る銀染色法でLESを染色したところ、クマシー・ブルー染色ではみることのできなかった多くのバンドを確認することができた。即ち、band 1よりも陰極側に新たに3本の蛋白分画が出現し、band 1は2本のバンドに、band 2は3本に、band 4は2本にそれぞれ細分画された。さらにband 4と5の間に1本、band 6と7の間にも1本、band 7と8の間には3本のバンドがみられ、合計20本のバンドが認められた(Fig. 4 lane a)。

3種抗原の抗原性の比較

SDS-PAGEにより分画された蛋白質をニトロセルロース膜に転写し、間接酵素抗体法を用いて感染血清中のIgG抗体と反応する抗原分画を同定した。感染後2週目(急性期)あるいは26週目(慢性期)血清との反応性を検討したところ、どちらの血清も3種抗原のなかではLESと最も強く反応した(Fig. 3)。LEXはLESにほぼ一致する分画と反応したが、LESと較べるとその反

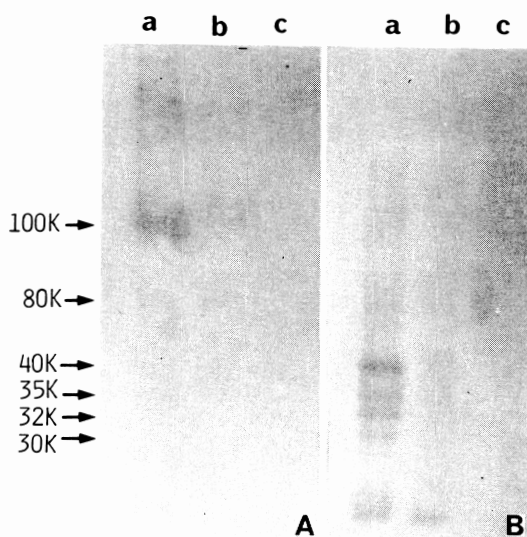


Fig. 3 Comparison of antigenicity among LES (a), LEX (b) and AEX (c) in acute phase (A) or in chronic phase of infection (B). Molecular weights indicated with arrow were calculated from reference markers.

応は弱かった。またAEXとは泳動ゲルの原点付近に極く弱い反応がみられるだけであった。

また感染後2週目の血清はLESの比較的高分子量の分画(MW:80K以上)とよく反応したが、26週目の血清とは主としてより低分子量の分画(MW:40K-30K)と反応した。両血清に共通して反応した分画はdye frontまで泳動されたband 8であった(Fig. 3)。感染経過に伴う宿主の抗原認識のこのような変化は、今回検討した5羽の家兎のすべてにおいて認められた。

培養経過に伴うLESの蛋白組成の変化

感染後の急性期と慢性期におけるLESに対する感染家兎の免疫応答の変化が、培養経過に伴うLESの組成の変化に起因するものか否かを検討するために、培養開始後4週目までのLES(LES-4)と8週目から17週目までのLES(LES-8)を用いてSDS-PAGEを行い、銀染色を施してその蛋白組成を比較した(Fig. 4)。その結果LES-8にはLES-4のband 6に相当する分画を欠いていたが、その他の成分は両者とも近似しており、先に述べたような急性期と慢性期との間でみられる宿主の抗原認識の違いを説明し得るような組成の変化は認められなかった。

感染血清に反応する幼虫抗原の局在部位

JB-4樹脂包埋した幼虫を用いて、感染血清中のIgG

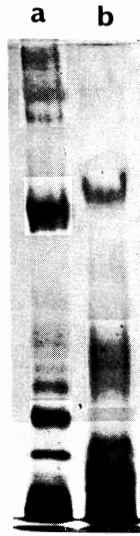


Fig. 4 Comparison of protein components of LES stained with silver reagent. (a) indicates the bands of LES obtained with the supernatant fluids taken from the beginning to 4 wks of incubation, (b) indicates the ones taken from 8 to 17 wks of incubation.

抗体に反応する抗原の局在を間接酵素抗体染色法により検討した. 本法によっても幼虫の抗原性は失われることなく保持され, かつ $1\ \mu\text{m}$ の薄切々片のため, 高倍率での顕微鏡的観察が容易であった.

培養直後の活発に運動する幼虫を抗原切片とした場合最も強い反応がみられたのは排泄細胞であった (Fig. 5). この反応は26週目血清よりも2週目血清と反応させた時のほうが強く反応した. このほか角皮, 腸管内顆粒にも抗原の局在がみられたが, この反応は2週目, 26週目血清とも同程度に認められた. 培養後17週を経過した幼虫を抗原切片とした場合には排泄細胞の陽性反応は減弱していた. 感染血清の代りに非感染家兎血清あるいはPBSを反応させた対照の切片では, 排泄細胞, 角皮, 腸管内顆粒は全く反応しなかったが, 食道球部の一部に非特異的なペルオキシダーゼ活性がみられた.

考 察

de Savigny (1975) が *in vitro* での幼虫の長期培養に成功して以来, LES を抗原とした各種の免疫診断法が試みられてきた (de Savigny and Tizard, 1977; de Savigny *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1980, van Knapen *et al.*, 1982; 1983; Kondo *et al.*, 1982). これらの報告によれば, LES は他種蠕虫抗原との間での交叉反応が

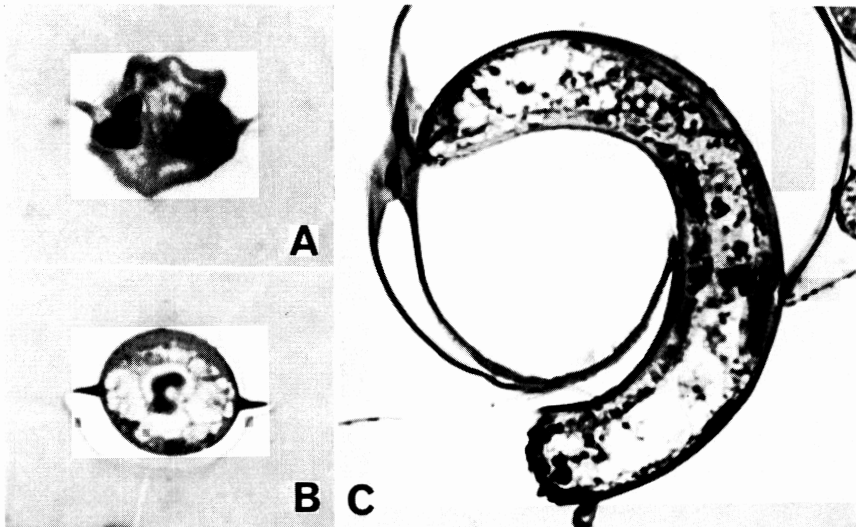


Fig. 5 Immunoenzymatic staining of second stage larva of *T. canis* using a goat anti-rabbit IgG Fc fragment serum. Note the presence of antigen in excretory cells of pre-incubated larva reacted with the serum from rabbit 2 wks after infection (A) when compared with a post-incubated larva (B). Antigenicity was also observed in cuticle and mid-gut of post-incubated larva (C) reacted with the serum from rabbit 26 wks after infection.

少なく、特異性の高い抗原であるといわれている。ところが LES の免疫生化学的性状に関する報告は非常に少ない。de Savigny (1975) はポリアクリルアミド電気泳動法を用いた分析により、LES は少なくとも3種類の蛋白質から構成されると報告した。さらに彼は最近の総説 (Ogilvie and Savigny, 1982) の中で、このうちの1つが genus-specific な major component であり、MW : 42K, 等電点はほぼ9.5であると述べている。また Maizeles *et al.* (1982) は幼虫の outer surface を放射性同位元素で標識した培養実験から、その上清中には7種類の蛋白質が含まれ、うち3種類は幼虫の排泄物で、残りは幼虫の表面から分泌される蛋白質であろうと報告した。抗原性に関する報告では、Sugane and Oshima (1983) は抗原性をもつ分画を精製し、それは15%の糖を含む分子量35,000の糖蛋白で、免疫電気泳動法により感染後6週目のマウス血清の間では1本の沈降線を形成したと述べている。また Koizumi *et al.* (1983) は LES の抗原性を免疫電気泳動法を用いて検討し、感染後6週目のラット血清との間には6本の沈降線を認め、このうちの2本が PAS 陽性であったと述べている。

今回の我々の成績では、LES はさらに多くの蛋白質から構成され、その大部分が抗原性を有していると考えられた。即ち、クマシー・ブリリアント・ブルー・R-250を用いた蛋白染色では Maizeles *et al.* (1982) や Koizumi *et al.* (1983) の成績にはほぼ一致する8本のバンドを区別し得たが、より鋭敏に蛋白質を検出できる銀染色では新たに8本のバンドが出現し、また band 1 と 2 と 4 はそれぞれ2~3本に細分画され、合せて少なくとも20本のバンドが認められた。これらのバンドの大部分が PAS 反応陽性であったことから、LES を構成するものは糖蛋白がその主体をなしていると考えられた。しかし、糖蛋白はその糖鎖の microheterogeneity によつて見かけ上の多様性を示すことが知られており (篠原, 1977)、細分画されたバンドがすべて異なった蛋白質に由来するものか否かについては、さらに詳細な検討が必要と思われる。また Ogilvie and de Savigny (1982) の報告した genus-specific な major protein component については、彼らの実験方法の詳細が不明のため直接の比較は困難であるが、SDS-PAGE と immunoblotting 法 (Southern, 1975) を用いた今回の成績では、MW : 40K の分画は慢性期の感染血清とは強く反応したが急性期の血清とは反応せず、また LES に占る割合も少ない成分ではないかと考えられた。

次にこの LES の抗原性を AEX や LEX と比較し

たところ、LES のほとんどの分画は感染血清と反応し、宿主にとつて LES は強い抗体産生原となつていることが示唆された。また LEX には LES と共通の抗原性を持つ糖蛋白が含まれていたが、感染血清とは反応しない数多くの蛋白質も含まれていた。一方 AEX には、少なくとも MW : 180K から30K の範囲で LES と共通する抗原分画は存在しなかつた。以上の結果から、LES は感染血清と最も強く反応し、かつ効率よく宿主に認識される抗原であるという点から、免疫診断に用いる抗原としては AEX や LEX よりも適切なものと考えられた。

今回の実験で注目されるのは、LES に対して産生される宿主の IgG 抗体が、感染急性期と慢性期とは異つた抗原分画に反応して産生されていることを示唆する結果が得られたことである。寄生虫感染によつて産生される抗体の経時的変化についてはこれまでも多くの研究がある。我々も蛍光抗体法や酵素抗体法を用いて、実験的犬蛔虫幼虫移行症における IgG, IgM 抗体の変化を経時的に追跡した (Kondo *et al.*, 1982)。それによると、感染後 IgM 抗体は5週目をピークに以後減少するが、IgG 抗体は2週目にはピークに達し、それ以降26週目に至るも高い抗体価の持続がみられた。今回の成績はこのような強い IgG 抗体の産生期間中に、宿主が認識する IgG 反応抗原分画に変化が生じていることを示している。このような現象を説明し得る仮説としては、感染急性期と慢性期とは産生される IgG サブクラスが異つており、その各々のサブクラスに反応する LES の抗原分画も異つているのではないかとこの考え方である。Fujita and Tukidate (1982) は、*Dirofilaria immitis* 抗原中には宿主に IgG あるいは IgE 抗体を誘導し得るような抗原が別個に存在し、その虫体内での局在も異つていることを証明した。また Boros *et al.* (1982) は、*Schistosoma mansoni* 感染マウスの肝臓の肉芽腫では、感染急性期には IgG₁ のみの産生しかみられないが、慢性期になると IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA の産生もみられることを報告している。我々の実験結果からも、幼虫の培養が長期にわたると抗原の局在部位に変化がみられたことから、犬蛔虫感染経過中においても *D. immitis* や *S. mansoni* 感染でみられるような現象が生じているのではないと思われる。

Smith *et al.* (1981) は、犬蛔虫幼虫の outer surface には抗原活性が存在し、これが次々と脱落してゆくことを見出した。今回の成績でも角皮に抗原活性は認められたが、さらに排泄細胞や腸管内顆粒にも抗原活性がみられた。幼虫内における LES の産生部位と、その outer

surface からの分泌機構について今後さらに検討してゆきたい。

また糖蛋白複合体である LES が、宿主内での幼虫の体内移行とどのように関わっているかも興味がある。

結 語

犬蛔虫感染家兎血清および幼虫 ES 抗原を用い、ES 抗原の免疫化学的組成、幼虫の培養期間が及ぼす ES 抗原の組成の変化、幼虫内抗原の局在部位、感染経過に伴う宿主の抗原認識の変化につき、SDS-PAGE と immunoblotting 法、間接酵素抗体染色法により検討した。得られた結果は次のごとくである。

犬蛔虫第2期幼虫の ES 抗原は8 (クマシー・ブルー染色)あるいは20 (銀染色)種類の、分子量の異なる蛋白質で構成され、その大部分が PAS 反応陽性であった。感染家兎はこの抗原に対して強い抗体産生を行っていたが、その認識する抗原分画は感染後2週目と26週目とは変化していた。また幼虫の培養が長期に及んでも、ES の組成の一部に変化はみられたが、感染急性期と慢性期の ES に対する抗原認識の変化に対応するようなものではなかった。

さらに、幼虫抽出抗原には幼虫 ES 抗原と共通の抗原性をもつ分画が含まれていたが、雌成虫抽出抗原中には幼虫 ES 抗原と共通の抗原分画は、少なくとも MW : 180K から30K の範囲では認められなかった。また幼虫内の抗原局在部位は排泄細胞、角皮、腸管内顆粒に認められた。

文 献

- 1) Boros, D. L., Amsden, A. F. and Hood, A. T. (1982): Modulation of granulomatous hypersensitivity IV. Immunoglobulin and antibody production by vigorous and immunomodulated liver granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Immunol.*, 128, 1050-1053.
- 2) Cypess, R. H., Karal, M. H., Zidian, J. L., Glickman, L. T. and Gitlin, D. (1977): Larval specific antibodies in patients with visceral larva migrans. *J. Infect. Dis.*, 135, 633-640.
- 3) de Savigny, D. H. (1975): In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in sero-diagnostic tests for visceral larva migrans. *J. Parasitol.*, 61, 781-782.
- 4) de Savigny, D. H. and Tizard, I. R. (1977): *Toxocara larva migrans*: The use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 501-507.
- 5) de Savigny, D. H., Voller, A. and Woodruff, A. W. (1979): Toxocarosis: Serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Pathol.*, 32, 284-288.
- 6) Enayat, M. S. and Pezeski, M. (1977): The comparison of counterimmunoelectrophoresis with indirect haemagglutination test for detection of antibodies in experimentally infected guinea pigs with *Toxocara canis*. *J. Helminthol.*, 51, 143-148.
- 7) Fujita, K. and Tukidate, S. (1982): Localization of highly purified allergen and IgG-inducing antigen in adult *Dirofilaria immitis* determined by fluorescent antibody test. *Trop. Med.*, 24, 219-227.
- 8) Jung, R. C. and Pacheco, G. (1960): Use of a hemagglutination test in visceral larva migrans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 9, 185-191.
- 9) 河村 寛 (1983): 精製犬蛔虫抗原を用いた radioimmunoassay 法および antigen-binding assay 法による犬蛔虫循環抗原と抗体の検出。 *広大医学誌*, 31, 265-274.
- 10) Koizumi, S., Hayakawa, J. and Kondo, K. (1983): *Toxocara canis*: Immunogenic source of *Toxocara canis* in infected rats. *Jap. J. Parasit.*, 32, 379-386.
- 11) 近藤力王至・小泉 勤・坪田宣之・大西義博・吉村裕之 (1981): 実験的移行症幼線虫症の研究 (3) 犬蛔虫幼虫感染家兎の抗体価の推移。 *寄生虫誌*, 30, 549-556.
- 12) Kondo, K., Akao, N., Ohnishi, Y. Muroi, S. and Yoshimura, H. (1982): Studies on visceral larva migrans. Investigation of immunoglobulins in sera of rabbits experimentally infected with *Toxocara canis* eggs, by means of indirect fluorescent antibody technique and enzyme-linked immunosorbent assay. Program and summary of Sino-Japanese seminar on parasitic zoonoses 1982. 144-152.
- 13) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature, London.* 227, 680-685.
- 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

- 15) Maizeles, R. M., Philipp, M. and Ogilvie, B. M. (1982): Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.*, 61, 109-136.
- 16) Ogilvie, B. M. and de Savigny, D. H. (1982): Immune responses to nematodes. In immunology of parasitic infection, 2nd ed., by Sydney Cohen and D. H. de Savigny, Blackwell Scientific Publications, Missouri, 715-757.
- 17) Polderman, A. M., de Vries, H. and de Walter, Th. P. M. (1980): Serological diagnosis of Toxocarosis: The use of larval antigens in ELISA. *Acta Leiden.*, 48, 37-42.
- 18) Sadun, E. H. (1976): Application of immunodiagnostic tests. In immunology of parasitic infection, 1st ed., by Sydney Cohen and Elvio H. Sadun, Blackwell Scientific publications, Missouri, 48-51.
- 19) 瀬野尾 章・渡辺 斉・土井優子 (1977): JB-4-Methylmethacrylate・divinylbenzene (JMD) 包埋による生検組織標本作製法. *臨床検査*, 21, 1530-1537.
- 20) 篠原兵庫 (1977): 糖タンパク質について. *生化学*, 49, 1219-1237.
- 21) Smith, H. V., Quinn, R., Bruce, R. G. and Girdwood, R. W. A. (1980): A paper radioimmunosorbent test (PRIST) for the detection of larva-specific antibodies to *Toxocara canis* in human sera. *J. Immunol. Methods*, 37, 47-55.
- 22) Smith, H. V., Quinn, R., Kusel, J. R. and Girdwood, R. W. A. (1981): The effect of temperature and antimetabolites on antibody binding to the outer surface of second stage *Toxocara canis* larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 4, 183-193.
- 23) Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
- 24) Sprent, J. F. A. (1953): On the migratory behavior of the larvae of various *Ascaris* species in white mice. II. Longevity of encapsulated larvae and their resistance to freezing and putrefaction. *J. Infect. Dis.*, 92, 114-117.
- 25) Sugane, K. and Oshima, T. (1983): Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. *Immunology*, 50, 113-120.
- 26) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 4350-4354.
- 27) van Knapen, F., van Leusden, J. and Buys, J. (1982): Serodiagnosis of toxocaral larval migrans in monkeys by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with somatic adult and secretory larval antigens. *J. Parasitol.*, 68, 951-952.
- 28) van Knapen, F., van Leusden, J., Polderman, A. M. and Franchimont, J. H. (1983): Visceral larva migrans: Examinations by means of enzyme-linked immunosorbent assay of human sera for antibodies to excretory-secretory antigens of the second-stage larvae of *Toxocara canis*. *Z. Parasitenkd.*, 69, 113-118.
- 29) Welch, J. S., Symaos, M. H. and Dobson, C. (1983): Immunodiagnosis of parasitic zoonoses; Purification of *Toxocara canis* antigen by affinity chromatography. *Int. J. Parasitol.*, 13, 171-178.
- 30) Yang, J. and Kennedy, M. (1979): Value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of visceral larva migrans (VLM). *Can. J. Public Health*, 70, 58.
- 31) Zacharius, R. M., Zell, T. H., Morrison, J. H. and Wodlock, J. J. (1969): Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 30, 148-152.

AbstractANTIGENIC ANALYSIS OF EXCRETORY-SECRETORY PRODUCTS OF
SECOND STAGE LARVAE OF *TOXOCARA CANIS* AND THE ANTIGEN
RECOGNITION IN THE COURSE OF INFECTIONNOBUAKI AKAO, KAORU KONDO, TAKASHI OKAMOTO
AND HIROYUKI YOSHIMURA*(Department of Parasitology, School of Medicine,
Kanazawa University, Kanazawa City, Japan)*

In order to clarify the immunological characteristics of excretory-secretory products of second stage larvae of *T. canis* (LES) in the course of infection, antigenicity of LES was compared with those of larval extracts antigen (LEX) or adult worm extracts antigen (AEX) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting technique.

Coomassie blue stain of LES for protein revealed 8 distinct bands showing the molecular weight (MW) range of 32K to 140K. Seven out of 8 protein bands were PAS reactive. However, silver stain, being more sensitive for protein, revealed at least 20 bands. LES and AEX had apparently more protein components than LES. The pattern of PAS positive bands of LEX was almost similar to those of LES, whereas no band was shown in AEX of the MW range of 32K to 180K.

In the reactivity for infected rabbit serum, LES was the most sensitive among three antigen preparations. The common antigenic components were observed in LES and LEX, but none of them could be observed in AEX under the MW range of 180K.

Concerning the change of immune response against LES, there were some differences in acute or chronic phase of infection. Namely, high MW substances mainly reacted with the serum from rabbit after 2 weeks of infection and low MW molecules reacted with the serum after 26 weeks of infection.

By means of immunoenzymatic staining, localizations of the antigen in pre-incubated larvae were shown in the cuticles, granules of intestine and excretory cells reacting with the serum from rabbit 2 or 26 weeks after infection. In contrast, the intensity of the stainability of excretory cells was reduced obviously when the larvae were incubated *in vitro* for 17 weeks.