

## 実験的幼線虫移行症の研究

### (4) 蛍光抗体法および酵素抗体法による犬蛔虫感染 家兎における血清免疫グロブリン

近藤力王至 赤尾信明 小西喜彦  
吉村裕之

(昭和58年11月18日 受領)

**Key words:** VLM, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Ascaris suum*, IFA, ELISA

#### 緒言

著者ら(1981)はさきの実験的犬蛔虫(*Toxocara canis*)幼虫移行症の家兎血清について、ラテックス凝集反応、幼虫沈降物附着試験、ゲル内沈降反応などを用い、虫卵投与後の抗体産生の経時的推移を比較検討した結果、凝集反応による抗体の推移パターンと、沈降反応抗体のそれとは、感染後の時期により差異があることを報告した。同時にこの差異は、これら反応群に関与する抗体として、IgG, IgM クラスの免疫グロブリンの産生経緯に相違があるのではなかろうかと推察した。ところで、本症の免疫、血清学的研究には、感度、種の特異性を知る上で、犬蛔虫幼虫あるいはその排泄物・分泌物(以下ESとする)を抗原とした間接蛍光抗体法(以下IFAとする)、および酵素抗体法(以下ELISAとする)を用いての検討が、既にHogarth-Scott(1966), Cypess and Glickman(1976), de Savigny and Tizard(1977), Stevenson and Jacobs(1977)らによつてなされている。そこで今回著者らは、従来から用いられてきた凍結切片法とは別に、幼虫包蔵卵の樹脂包埋薄切片を抗原とするIFA、ならびに幼虫ES抗原とペルオキシダーゼ結合 protein A を用いたELISAにより、犬蛔虫幼虫感染家兎血清のIgG, IgMの経時的推移を比較した。さらに、犬蛔虫の幼虫包蔵卵薄切片抗原に対する特異性、ならびに他蛔虫との交叉反応性を、猫蛔虫(*Toxocara cati*)、豚蛔虫(*Ascaris suum*)の虫卵抗原と比較検討した。

#### 材料および方法

##### 犬蛔虫幼虫感染家兎血清

実験に供した家兎血清は、著者ら(1981)の方法に従い、日本白色在来種2.5~3.0kgの9羽に、それぞれ1羽あたり100,000個の犬蛔虫幼虫包蔵卵(以下虫卵と略す)を、確実に胃内に投与し、虫卵投与後経時的に26週目まで採血、分離、-20°Cで保存したものである。

##### IFAと使用抗原

IFAに用いた抗原は犬蛔虫、猫蛔虫および豚蛔虫の幼虫包蔵卵で、これら虫卵を95%の冷エタノールで固定、瀬野尾ら(1977)の方法に準じJB-4樹脂に包埋、2μmの薄切片としたものを、無蛍光スライドガラス上に貼付、よく乾燥させたものを虫卵抗原とした。IFAはKamiya and Kamiya(1980)の方法に準じ、二次抗体としてはFITC標識抗ウサギIgG, IgMのヤギ血清(カペル社)を用い反応させた後、それぞれオリンパスBH-RFL落射蛍光顕微鏡装置により抗体価を測定した。抗体価は血清を2倍系列で稀釈し、反応したその最高稀釈倍数をもつて示した。

##### ELISAと使用抗原

抗原は、著者ら(1981)の方法に従つて採集した犬蛔虫第Ⅱ期幼虫を、de Savigny(1975)やKoizumi *et al.*(1983)の方法に準じ、Eagle's MEM培養液(日本製薬KK)中に、500隻/mlになるように懸濁培養し、その培養液の液中に含まれている排泄物・代謝物(ES)である。培養は3~4日毎に新しいものと交換し、培養後の液は培養開始後4週目までのものをすべて集め、濃縮、透析(蒸留水中1昼夜)、20,000G(16,000rpm)で遠沈、その上清を凍結乾燥したものを犬蛔虫幼虫ES抗原とした。

本研究は昭和56年度及び57年度文部省科学研究、一般研究C(課題番号56570159)の補助を受けて行なつた。記して謝意を表する。  
金沢大学医学部寄生虫学教室

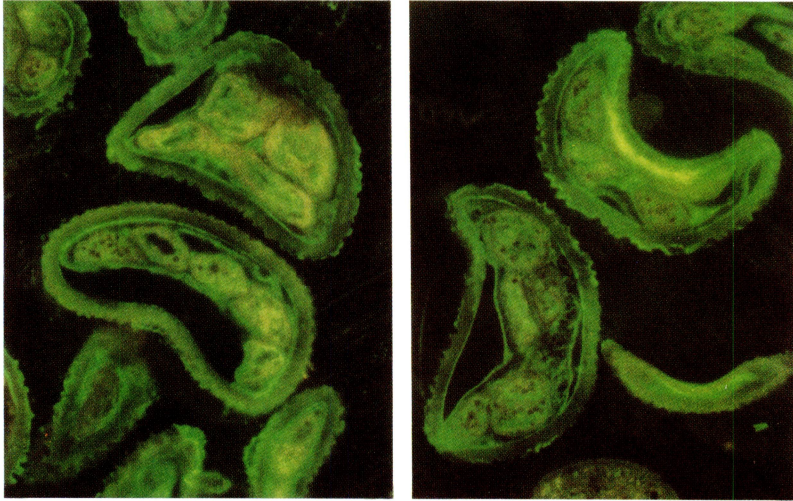


Fig. 1 The localization of antigen in plastic sections of embryonated *T. canis* eggs for IgG (left) and IgM (right) in rabbit sera with *T. canis* infection. left: IgG fluorescence seen on the inner membrane of egg shell, cuticle, intestinal wall and excretory canal of the larvae ( $\times 400$ ) reacted with serum of 13 weeks after infection. right: IgM fluorescence seen on the same locations like IgG ( $\times 400$ ) reacted with serum of rabbit 5 weeks after infection.

ELISA は Suter *et al.* (1980), Pain and Surolia (1981), 中村・青木 (1982) らの方法に準じ、ペルオキシダーゼ結合 protein A, 抗ウサギ IgG, IgM ヤギ血清を用い、0.003%  $H_2O_2 + o$ -phenylenediamine を基質として反応させる方法によつて行つた。抗体価は、MTP-12型マイクロプレート光度計 (コロナ電気 KK) を用い、吸光度 (OD 値) を測定、算出した。抗体価の算出方法は、虫卵投与前の家兎血清が示す吸光度 (C) に対し、虫卵投与後の各時期における家兎血清の吸光度 (T) との比 (T/C 値) を求めた。この時の抗原量と被検血清量は、予めボックス・タイトレーションを行ない、その測定値から決定した。抗原量は蛋白濃度 (Lowry 法による)  $5 \mu\text{g/ml}$ , 血清は  $1/100$  に希釈したものにより測定した。

## 結 果

### 1) IFA による犬蛔虫虫卵抗原の抗体反応部位

犬蛔虫虫卵抗原の IFA により著明に蛍光がみられる部位は、卵殻の内膜、幼虫の角皮、排泄管、消化管の内壁面およびその周囲の体組織であつた。IgG に強い活性がみられたのは、虫卵投与後13週目の家兎血清では卵殻の内膜、幼虫の角皮、消化管の内壁面であつた (Fig. 1

左)。他方、IgM に強い活性を示したのは、虫卵投与後5週目の血清では卵殻の内膜、幼虫の角皮であり、消化管内壁面、周囲組織ではやや弱かつた (Fig. 1 右)。

### 2) IFA と ELISA による犬蛔虫幼虫感染家兎における IgG および IgM の経時的变化

IgG: 虫卵投与後3日目の抗体価 (mean  $\pm$  SD) は、IFA, ELISA とともに著明な増加はみられず、それぞれ  $1 : 2^{1.0 \pm 0.6}$ , および  $0.8 \pm 0.3$  であつた。これらの抗体価はその後急激な上昇がみられ、2週目には IFA では  $1 : 2^{8.8 \pm 1.8}$ , ELISA では  $11.0 \pm 2.4$  に達した。3週目以降の IFA では、13週目まであまり変動しないまま  $1 : 2^{9.3 \sim 29.8}$  と高値を持続したが、26週目には  $1 : 2^{7.2 \pm 0.5}$  と低下した。一方、ELISA では3週目以降徐々に上昇し、26週目には  $12.2 \pm 4.6$  に達した (Fig. 2)。

IgM: 虫卵投与後3日目の抗体価は、IgG の場合と同様に IFA, ELISA とともに増加がみられず、 $1 : 2^{0.6 \pm 0.8}$ ,  $0.9 \pm 0.1$  であつた。その後、1週目頃より急激な上昇がみられ、2週目には IFA では  $1 : 2^{5.4 \pm 1.2}$  ELISA では  $5.1 \pm 1.2$  となつた。この増加はさらに進み、両者とも5週目にはそれぞれ  $1 : 2^{6.4 \pm 1.1}$ ,  $6.1 \pm 1.5$  と最高値に達したが、以後次第に低下し、26週目には  $1 : 2^{1.0 \pm 1.4}$ ,  $1.9 \pm 0.9$  となつた (Fig. 2)。

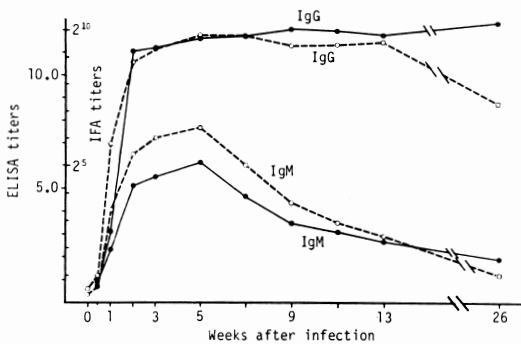


Fig. 2 Transitional changes of IgG and IgM in rabbits sera with *T. canis* infection by means of IFA or ELISA.

JB-4 plastic section antigen of embryonated eggs of *T. canis* was used for IFA (○—○) and larval ES antigen of *T. canis* was used for ELISA (●—●).

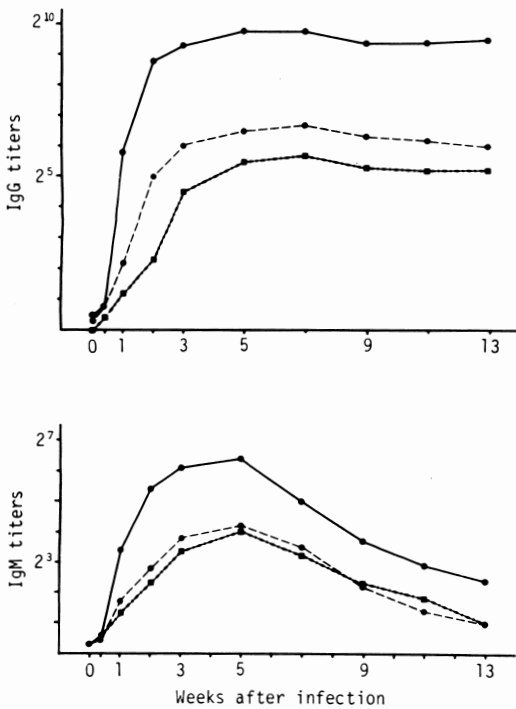


Fig. 3 Comparison of IgG and IgM by means of IFA in rabbits sera with *T. canis* infection against *T. canis* (●—●), *T. cati* (●—●) and *A. suum* (■—■) antigens.

### 3) 犬蛔虫幼虫感染家兎血清の3種蛔虫虫卵抗原のIFAによる交叉反応

IgG: 虫卵投与後3日目を除いて、各週毎の血清の抗

体価をみると、犬蛔虫虫卵抗原では2週目に  $1: 2^{8.8} \pm 1.8$  となり、以後  $1: 2^{9.3} \sim 2^{9.8}$  の値を持続するのに対して、猫蛔虫虫卵抗原では2週目には  $1: 2^{5.0}$  となり、以後  $1: 2^{6.0} \sim 2^{6.7}$  の値を持続した。豚蛔虫虫卵抗原では2週目に  $1: 2^{3.3}$  となり、以後  $1: 2^{4.5} \sim 2^{5.7}$  の値を持続した。即ち、犬蛔虫虫卵抗原による抗体価と比べ、猫蛔虫では  $1/8.7 \sim 1/13.9$ 、豚蛔虫では  $1/17.2 \sim 1/45.3$  となり、ともに犬蛔虫虫卵抗原とは有意に差 ( $P < 0.05$ ) がみられた (Fig. 3 上)。

IgM: 虫卵投与後3日目、1週目の血清の抗体価は、3種抗原ともほとんど差はみられなかつた。犬蛔虫虫卵抗原の抗体価は5週目に  $1: 2^{6.4}$  と最高値に達した後、漸減した。同様に、猫蛔虫虫卵抗原、豚蛔虫虫卵抗原での抗体価は、5週目には  $1: 2^{4.2}$  および  $1: 2^{4.0}$  とピークに達し、以後漸減するが、いずれも犬蛔虫虫卵抗原よりも低い値を示すものの、IgGの場合と同様犬蛔虫抗原による抗体価と比較すると、猫蛔虫では  $1/2.9 \sim 1/6.1$ 、豚蛔虫では  $1/2.2 \sim 1/8.6$  であつていずれもあまり差はみられなかつた (Fig. 3 下)。

### 考 察

近年、免疫血清学的方法の進展に伴い、犬蛔虫幼虫移行症に関しても、より適確な診断を行うための検討、ならびにその基礎となる研究がなされている。抗原については、成虫の抽出物を抗原とするよりも、幼虫および幼虫包蔵卵の抽出物あるいは幼虫ESを抗原とする方が、感受性、特異性を知る上でより優れているとの報告も多い。即ち、Hogarth-Scott (1966)、de Savigny and Tizard (1977)、Stevenson and Jacobs (1977) らは、感度の高いIFAやELISAにより、抗原性あるいは産生抗体の検討を行なつた。これらの方法は、二次抗体として抗IgG、抗IgMなど、抗ヒトあるいは抗動物免疫グロブリンが用いられることから、ヒトや動物の抗体とその抗体価をも知ることが可能となつた。

IFAについては、Hogarth-Scott (1966) は豚蛔虫の第Ⅲ期幼虫を抗原とした Taffs and Voller (1962) にならない、犬蛔虫、猫蛔虫ならびに犬小蛔虫 (*Toxascaris leonina*) の幼虫および幼虫ESを抗原とし、それぞれの感染血清について検討したところ、同属蛔虫間では互いに共通性と思われる反応がみられるのに対し、異属蛔虫との間にはそれがみられないと報告した。最近 Sugane and Oshima (1983) は、Ouchterlony法により、犬蛔虫幼虫ES抗原は豚蛔虫感染マウスに対し交叉反応性を示したが、旋毛虫 (*Trichinella spiralis*)、*Nippostrongylus*

*lus brasiliensis* 感染マウスに対しては反応しなかつたと述べている。また Ruitenber *et al.* (1974) は旋毛虫感染豚について、幼虫抽出物を抗原とする ELISA を行つた結果、感度の点で IFA よりも優れていることを報告し、Cypess and Glickman (1976) も幼線虫移行症患者および他の寄生虫感染者について、ELISA が診断的価値があると報告した。これらの実験には感染動物としてビーグル犬、家兎、サルが用いられ、抗原としては犬蛔虫成虫、幼虫包蔵卵の凍結切片、脱殻幼虫、幼虫 ES が IFA に、成虫、幼虫包蔵卵の抽出物、幼虫 ES を ELISA に用いている (Ruitenber and Buys, 1976; de Savigny and Tizard, 1977; Ruitenber and Knapen, 1977; Glickman *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1982)。

著者らが今回行つた IFA に用いた虫卵抗原は、JB-4 樹脂包埋により  $1 \sim 2 \mu\text{m}$  の薄切切片が得やすく、従来よりも蛍光抗体陽性部位に特異的、かつ強い蛍光がみられるという瀬野尾ら (1977) の報告にもとづき、また肝蛭 (*Fasciola hepatica*) で行つた Hughes *et al.* (1981) にならい作製したもので、パラフィン切片抗原よりも抗原の局在性がより明らかに認められた。ELISA においても、ペルオキシダーゼ結合 protein A 標識は、簡便さと、哺乳動物の IgG であれば種を問わず IgG の Fc 部分と結合するため、二次抗体を変えることなく、同一条件下で IgG を測定しうる利点がある (中村・青木, 1982)。

著者らはこの様な観点から、今回犬蛔虫幼虫を感染させた家兎血清について、産生抗体の出現時期とその持続時間を IFA と ELISA により、他方猫蛔虫、豚蛔虫との交叉反応性を IFA により観察した。その結果、犬蛔虫感染家兎では、虫卵投与後かなり早い  $1 \sim 2$  週目にかけて IgG が増加し、その後長期にわたつて持続した。他方、IgM は IgG の増加と共に増し、3 週目以降 5 週目頃に最高値に達した後、漸減していく傾向がみられた。これらの成績は、一般に知られている微生物感染に対する宿主の免疫グロブリン産生経過と若干異なっている。寄生虫感染においては、Desmonts (1975) は *Toxoplasma* 感染における免疫グロブリン、特に IgG、IgM の産生経過を IFA により観察し、IgM の産生パターンは 2 週目をピークとし、IgG の出現はそれよりも遅れると報告した。Little *et al.* (1982) は、ELISA により *Schistosoma japonicum* 感染マウスの IgG の出現が、IgM の出現よりも遅れ 6 週目頃から急増すると述べた。また、Hughes *et al.* (1981) は、IFA による肝蛭感染子牛の IgG は、未成熟虫体抗原を用いた場合反応抗体が  $4 \sim 6$  週目に最高値になり以後低下していくが、成熟

虫体抗原では  $6 \sim 10$  週目にかけて上昇し以後高値を維持するとした。今回著者がみた犬蛔虫幼虫感染家兎では、IgG の出現が上記の寄生虫感染のそれに比べ早く、IgM のピークは逆に遅れてみられた。IgG がかなり早く出現することについては、Hughes *et al.* (1981) が肝蛭の未成熟虫体を抗原とした場合の結果と類似しており、虫体の未熟部分の抗原に反応する抗体が分泌物抗原にも対応していることを示唆している。

次に、著者らは犬蛔虫幼虫感染家兎血清の、猫蛔虫および豚蛔虫の虫卵抗原に対する交叉反応性について、IFA により検討した。その結果は、犬蛔虫幼虫感染家兎血清中の抗体に対し、IgG は猫蛔虫および豚蛔虫虫卵抗原に対して反応するものの、その量は豚蛔虫虫卵抗原においてより少なかつた。このことは、異属蛔虫に対する共通な抗原性をもつものと推察されるが、異属蛔虫においてはより少ないように思われる。今回の実験から、このような属、種間の差は IgM より IgG の方により強くみられたが、IgM では交叉性が強くみられることがわかつた。犬蛔虫幼虫感染動物において、幼虫の侵入、移行により産生された免疫グロブリン、特に IgG、IgM の産生経過が宿主の病態生理学的変化にいかに関与しているか、今後検討していきたい。

## 総 括

犬蛔虫幼虫包蔵卵を投与した感染家兎血清中に産生された IgG、IgM について、IFA では虫卵の JB-4 樹脂包埋薄切切片を抗原とし、ELISA では犬蛔虫幼虫 ES 抗原とペルオキシダーゼ結合 protein A によりそれぞれの抗体価を測定し、その経時的推移を検討した。また、IFA による犬蛔虫虫卵抗原における抗体反応部位を検討し、猫蛔虫、豚蛔虫虫卵抗原との間にみられる交叉反応性をみた。得られた結果は次の如くである。

1) IFA による抗原の IgG、IgM に対する反応部位は、主として卵殻の内膜、幼虫の角皮で、排泄管、消化管壁にもみられた。

2) IFA、ELISA による IgG、IgM 抗体価 (mean  $\pm$  SD) の経時的推移は、IgG では両方法とも虫卵投与後 1 週から 2 週目にかけて急増し、 $1 : 2^{8.8 \pm 1.8}$ 、 $11.0 \pm 2.4$  となつた。その後、IFA では 13 週目まで  $1 : 2^{9.3 \sim 2^{9.8}}$  と高値を維持したが、26 週目には  $1 : 2^{7.2 \pm 0.5}$  とやや低下した。ELISA では徐々に上昇し、26 週目には  $12.2 \pm 4.6$  となつた。IgM は両方法とも 2 週目にかけて急増し、 $1 : 2^{5.4 \pm 1.2}$ 、 $5.1 \pm 1.2$  となり、5 週目には  $1 : 2^{6.4 \pm 1.1}$ 、 $6.1 \pm 1.5$  と最高値に達し、その後低減した。

3) 犬蛔虫幼虫感染家兔血清の, 犬蛔虫虫卵抗原, 猫蛔虫虫卵抗原, 豚蛔虫虫卵抗原に対する交叉反応は, IgG では, 猫蛔虫は犬蛔虫のその1/8.7~13.9, 豚蛔虫は1/17.2~45.3と低く, 種属間の交叉性は少なかった。しかし IgM では, 猫蛔虫は犬蛔虫のその1/2.9~1/6.1, 豚蛔虫は1/2.2~1/8.6とあまり差がなく, 交叉性はあるものと思われる。

#### 文 献

- 1) Cypess, R. H. and Glickman, L. T. (1976): Visceral larva migrans: a significant zoonoses? Mod. Vet. Pract., 57, 462-464.
- 2) de Savigny, D. H. (1975): *In vitro* maintenance of *Toxocara canis* larvae and simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic test for visceral larva migrans. J. Parasitol., 61, 781-782.
- 3) de Savigny, D. H. and Tizard, I. R. (1977): Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 71, 501-507.
- 4) Desmonts, G. (1975): Harison's Principles of internal medicine. Ninth Edition (1980), McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo, 882p から引用
- 5) Glickman, L. T., Dubey, J. P. and Winslow, L. J. (1981): Serological response of ascarid-free dogs to *Toxocara canis* infection. Parasitol. 82, 383-387.
- 6) Hogarth-Scott, R. S. (1966): Visceral larva migrans - an immunofluorescent examination of rabbit and human sera antibodies to the E.S. antigens of the second-stage larvae of *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* (Nematoda). Immunol., 10, 217-223.
- 7) Hughes, D. H., Hanna, R. E. B. and Symond, H. W. (1981): *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and life in infected cattle. Exp. Parasitol., 52, 217-279.
- 8) Kamiya, H. and Kamiya, M. (1980): Preliminary application of a formalin fixed tissue section to the indirect fluorescent antibody test and intraoval precipitin reaction for the diagnosis of *Schistosoma japonicum*. Jpn. J. Vet. Res., 28, 155-160.
- 9) Koizumi, T., Hayakawa, J. and Kondo, K. (1983): *Toxocara canis*: immunogenic sources of *Toxocara canis* in infected rats. Jpn. J. Parasitol., 32, 379-386.
- 10) 近藤力王至・小泉 勤・坪田宣之・大西義博・吉村裕之 (1981): 実験的移行性幼線虫症の研究 (3) 犬蛔虫幼虫感染家兔の抗体価の推移. 寄生虫誌, 30, 549-556.
- 11) Little, J. V., III, Carter, C. E. and Colley, D. G. (1982): Serologic responses to *Schistosoma japonicum*: evaluation of total and parasite-specific immunoglobulins during the course of murine infection. J. Parasitol., 68, 519-528.
- 12) 中村良子・青木良雄 (1982): マイクロ ELISA 法における標識プロテインAの応用—VZV 抗体価測定について—. 感染症誌, 56, 1038-1044.
- 13) Pain, D. and Surolia, A. (1981): Preparation of protein A-peroxidase monoconjugate using a heterobifunctional reagent, and its use in enzyme immunoassays. J. Immunol. Methods, 40, 219-230.
- 14) Ruitenber, E. J., Steerenberg, P. A., Bros si, B. J. M. and Buys, J. (1974): Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays. Bull. Wld. Helth. Org., 51, 108-109.
- 15) Ruitenber, E. J. and Buys, J. (1976): An immunofluorescence technique for the detection of *Toxocara canis* antibodies. Vet. Parasitol., 1, 231-237.
- 16) Ruitenber, E. J. and van Knapen, F. (1977): The enzyme-linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections. J. Infect. Dis., 136, S267- S273.
- 17) 瀬野尾 章・渡辺 斉・土井優子 (1977): 生検組織標本作製法. 臨床検査, 21, 1530-1537.
- 18) Smith, H. V., Quinn, R., Bruce, R. G. and Girdwood, R. W. A. (1982): Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 76, 89-94.
- 19) Stevenson, P. and Jacobs, D. E. (1977): *Toxocara* infection in pigs. The use of indirect fluorescent antibody tests and *in vitro* larval precipitate test for detecting specific antibodies. J. Helminthol., 51, 149-154.
- 20) Sugane, K. and Oshima, T. (1983): Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. Immunol., 50, 113-120.
- 21) Suter, L., Briggen, J. and Sorg, C. (1980): Use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for screening of hybridoma antibodies against cell surface antigen. J. Immunol. Methods, 39, 407-411.
- 22) Taffs, L. F. and Voller, A. (1962): Fluorescent antibody studies *in vitro* of *Acaris suum* (Goeze, 1782). J. Helminthol., 36, 339-346.

Abstract

EXPERIMENTAL STUDIES ON VISCERAL LARVA MIGRANS  
4. EXAMINATIONS OF IMMUNOGLOBULINS IN SERA OF  
INFECTED RABBITS WITH *TOXOCARA CANIS* BY  
MEANS OF INDIRECT FLUORESCENT  
ANTIBODY (IFA) AND ENZYME-LINKED  
IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

KAORU KONDO, NOBUAKI AKAO, YOSHIHIKO KONISHI  
AND HIROYUKI YOSHIMURA  
(Department of Parasitology, School of Medicine, Kanazawa  
University, Kanazawa City, Japan)

The antigen of JB-4 plastic sections of embryonated eggs was used to examine IgG and IgM in the sera of experimentally infected rabbits with *Toxocara canis* eggs by means of indirect fluorescent antibody (IFA), and the larval excretory/secretory (ES) antigen was used for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques.

The results obtained were summarized as follows;

The localization of antigens in plastic section of embryonated eggs of *T. canis* detected by IFA was seen on the inner membrane of egg shell and cuticle, excretory canal and intestinal wall of the larva.

IgG titers (mean $\pm$ SD) detected by IFA or ELISA rapidly increased to  $1 : 2^{8.8\pm 1.8}$  or  $11.0 \pm 2.4$  two weeks after infection, thereafter the titers were kept until 26 weeks. In contrast, IgM titers reached the maximum of  $1 : 2^{6.4\pm 1.1}$  or  $6.1 \pm 1.5$  five weeks after infection, then their titers gradually decreased by 26 weeks.

In IgG the cross-reactivities of the plastic section antigens were found by IFA among *T. canis*, *T. cati* and *Ascaris suum* eggs with sera from infected rabbits with *T. canis*, being  $1/8.7 \sim 13.9$  with *T. cati* antigen and  $1/17.3 \sim 45.3$  with *A. suum*. However, no significant difference of IgM titers was seen in cross-reactivity between *T. canis* antigen and *T. cati* or *A. suum* antigen.