

犬蛔虫幼虫排泄・分泌物抗原に対する マウスの免疫応答

再感染マウスの肝臓でみられる幼虫捕捉現象と
液性免疫応答の関連性について

赤 尾 信 明

(昭和59年7月31日 受領)

Key words: *Toxocara canis*, larval excretory-secretory antigen, antigen recognition, protective immunity, BALB/c mice

緒 言

寄生虫の再感染に対する宿主の抵抗性については、寄生虫病流行地における疫学調査や、さまざまな動物実験モデルを用いた研究から、宿主に獲得性免疫が誘導されることによって生じることが知られている。なかでも *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *Trichinella spiralis*, *Hymenolepis nana* などでは、再感染に対して一部の宿主は強い抵抗性を示すことが報告されている。(Smithers and Terry, 1965; Bradley and McCullough, 1973; Knof *et al.*, 1977; Grove *et al.*, 1977; Ito and Yamamoto, 1976).

Toxocara canis についても、その幼虫包蔵卵の投与によって宿主に再感染防御能を生ずることが Lee (1960), Olson (1962), Fernando (1968), 加藤(1973), 近藤ら (1976), Sugane and Oshima (1983) らによって報告されている。これらの報告によれば、犬蛔虫幼虫包蔵卵を投与された家兎あるいはマウスでは、肝臓で捕捉される幼虫が再感染によって増加すると共に、この現象には好酸球が密接に関係していることが指摘されている。

最近、寄生虫感染に対する宿主の感受性の相違を、その寄生虫抗原に対する抗原認識機構の違いから説明しようとする試みがなされている (Jungery and Ogilvie, 1982; Shapiro and Murray, 1982)。本論文では犬蛔虫

幼虫包蔵卵投与後のマウスの免疫応答、とりわけ本虫由来抗原の中でも特異性がもっとも高い (Koizumi *et al.*, 1983; 赤尾ら, 1983) と考えられる幼虫排泄・分泌物 (ES) 抗原に対する免疫応答が、再感染における肝臓での幼虫捕捉現象とどのように関連するかを検討した。

材料および方法

1. 虫卵の調整

実験に用いた犬蛔虫幼虫包蔵卵 (以下、虫卵と略す) は近藤 (1970) の方法に従って調整した。即ち、犬蛔虫自然感染犬より採取した成熟雌成虫の子宮内虫卵を、0.5%ホルマリン水中で30°C の孵卵器を用いて培養し、30日以上経過したものをを用いた。培養後の虫卵は50%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で1分間処理することにより除蛋白膜操作を行い、蒸留水で充分水洗のち、感染実験あるいはES抗原採取のための幼虫回収に供した。なお、感染実験には同一日時に培養して除蛋白膜操作を行った同一ロットの虫卵を用いた。

2. マウスへの感染

感染のために用いたマウスはBALB/c・SPF・雄・5週齢 (体重20~22g・静岡実験動物協同組合) である。1回感染あるいは再感染後の幼虫の体内分布の検討のためには、60匹のマウスを6群 (I~IV群) に分け、次のようなスケジュールで感染を行った。即ち、虫卵500個を各々のマウスに経口投与し、1回感染群は感染後2週目 (I群)、4週目 (II群)、7週目 (IV群)、9週目 (V群) にそれぞれ剖検した。また、再感染群は初感染後2週目 (III群) あるいは7週目 (VI群) に同数の虫卵により再感染を行い、いずれも再感染後2週目に剖検した。

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

3. マウス諸臓器からの幼虫の回収方法

感染後所定の日時に達したマウスは、心臓穿刺による採血ののち、1群10匹のうち任意の5匹について剖検し、近藤(1970)の方法を一部改変して各臓器からの幼虫の回収を試みた。即ち、胃・腸管は縦に切開して内容物をリン酸緩衝生理食塩水(以下、PBSと略す、pH 7.2)で洗い流したのち、ブレンダー(トミー精工 K. K., 東京)で1分間破碎した。次いで人工胃液(0.5% W/V 1:1000 ペプシン, 0.7% V/V %塩酸) 50 ml を加え、37°C の恒温槽で3時間、時々攪拌しながら消化した。肝臓、肺臓も同様にして消化した。開頭により取り出した脳(嗅球、大脳、小脳、延髄)は約2mm³に細切し、2枚のスライドガラスで圧平ののち光学顕微鏡下に寄生幼虫数を算定した。皮膚を取り除いたあとの筋肉、骨組織、心臓、生殖器、その他の脂肪組織(以下、筋組織と略す)は一括して直鉗で細切ののちブレンダーで5分間破碎し、人工胃液を加えて同様に消化した。消化終了後、筋組織以外の臓器については3000 rpm・5分間遠心して上清を捨て、沈渣に含まれる幼虫数を実体顕微鏡下に算定した。筋組織については沈渣が多量になるため、遠心後の沈渣にPBSを加えて50 ml とし、充分混和後その5 ml を3回とり、その平均を10倍して筋組織内幼虫数とした。

4. ES 抗原の調整

幼虫 ES 抗原は、近藤ら(1981)の方法により集めた活発に運動する第2期幼虫を、de Savigny(1975)の報告を若干改変した方法により無菌的に *in vitro* 培養し、その培養上清を濃縮して作製した(Koizumi *et al.*, 1983)。蛋白濃度の測定は Lowry *et al.*(1951)の方法に従って行った。

5. 感染マウス血清と幼虫 ES 抗原との反応

幼虫 ES 抗原に対する感染マウスの抗原認識の解析は、赤尾ら(1983)の方法に従って SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(以下、SDS-PAGE と略す)と Immunoblotting 法を組合せた間接酵素抗体染色法によって検討した。即ち、1 mg/ml に調整した幼虫 ES 抗原の 10 μ l を SDS-PAGE により分画し、そののち nitrocellulose 膜にその分画を転写した(Southern, 1975)。この膜と、前述の感染実験に用いた各々の群のマウス血清とを Towbin *et al.*(1979)の方法に従って反応させた。そのあと、ペロオキシダーゼ結合抗マウス IgG ヤギ IgG 抗体(カッセル社, USA)を反応させ、感染マウス血清中の IgG 抗体と反応する幼虫 ES 抗原分画を同定した。今回用いた感染血清の希釈倍数は 1:

20、ペロオキシダーゼ結合抗マウス IgG 血清のそれは 1:200である。

6. 感染血清による受動免疫

感染血清の受動免疫によって recipient マウスに誘導される防御効果の検討のために以下の実験を行った。90匹の BALB/c マウスを3群にわけ、前述と同様の方法で虫卵500個を投与した。第1群は1回感染後4週目に心臓穿刺によって採血し、また第II群は初感染後7週目に同数の虫卵を再投与して2週間目に採血した。得た血清はそれぞれにプールして-80°C に保存した。また第III群は、第II群と同週齢の生後14週齢の非感染マウス群で、同様に採血して対照血清とし受動免疫に用いた。

recipient マウスへの受動免疫スケジュールとその後の感染ならびに剖検時期は以下のごとくである。即ち、1回感染血清あるいは再感染血清を recipient マウスの腹腔内に0.5 ml ずつ連日3日間注射し、4日目に虫卵500個を投与した。感染後2週目に剖検し、前述と同様の方法でマウスの肝臓内および脳内幼虫数を算定した。対照としては非感染マウス血清あるいは生理食塩水を用いて、腹腔内注射とその後の感染を同様のスケジュールで行い、2週目に剖検した。また recipient マウスの末梢好酸球数の算定は、剖検時尾静脈から採血した血液を用いて、Hinkelmann 液(0.5% W/V エオジン Y, 0.5% V/V ホルマリン, 0.475% V/V フェノール)により染色して血球計算盤により行った。

実験結果の解析には *t* 検定を用い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

結 果

1. 1回感染あるいは再感染後の幼虫の体内分布

虫卵500個を経口感染させたときのマウス諸臓器からの幼虫の回収成績は Table 1 に示した。感染後2週目(I群)、4週目(II群)、7週目(IV群)、9週目(V群)に剖検した1回感染群では総回収幼虫数の90%以上の幼虫が脳と筋組織に分布していた。ところが、初感染後2週目に同数の虫卵を再投与し、2週間後に剖検した再感染群(III群)では脳と筋組織に分布していた幼虫が総回収幼虫数の約80%と、1回感染群に比較して減少していた。しかし、肝臓から回収された幼虫数は 57.5 ± 10.9 隻(平均 \pm SE)であり、I群 (7.0 ± 1.7 隻)あるいはII群 (3.8 ± 1.6 隻)に較べて有意(それぞれ $p < 0.02$ と $p < 0.01$)の増加が観察された。また、III群の脳に分布していた幼虫数 (116.3 ± 7.3 隻)はI群とII群の脳から回収された幼虫数(それぞれ 52.3 ± 6.3 隻と 65.0 ± 6.2 隻)の

Table 1 Recovery of *Toxocara canis* larvae from various organs of BALB/c mice after primary and secondary infections with 500 embryonated eggs

Group	Number of mice examined	Weeks after infection			Number* of larvae recovered from				
		Primary	Secondary	GI-tract†	Liver	Lung	Brain	Muscle	Total
I	5	2	—	0	7.0±1.7	7.0±1.7	52.3±6.3	166.8±14.9	232.5±18.4
II	5	4	—	0	3.8±1.6	0.4±0.2	65.0±6.2	77.4±12.4	146.6±12.2
III	5	2	2	0	57.5±10.9*	4.3±0.9	116.3±7.3	150.8±15.3	333.0±13.1
IV	5	7	—	0.2±0.2	12.4±1.3	1.6±0.2	78.6±5.4	123.2±13.2	216.0±14.0
V	5	9	—	0	15.6±3.5	1.6±0.6	71.2±7.8	125.2±9.7	213.6±12.6
VI	5	7	2	1.2±0.6	160.6±37.7‡	0.8±0.5	81.2±6.0	130.0±10.0	355.8±36.9

* Mean±SE

† GI-tract : Gastrointestinal tract

‡ Significant difference from primarily infected groups (P<0.02)

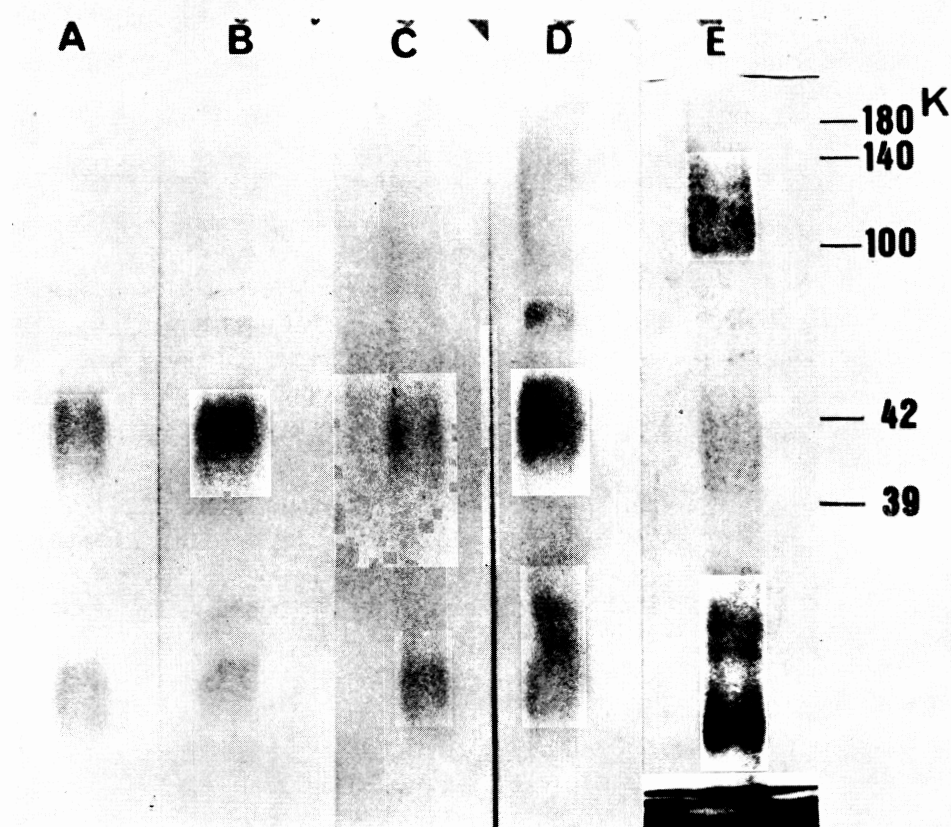


Fig. 1 Antigenic recognition following primary and secondary infections of BALB/c mice with embryonated eggs of *T. canis*. Figures indicate IgG antibody-binding antigens in larval excretory-secretory products of *T. canis* reacting with: (A) the serum from mice 4 weeks after primary infection, (B) the serum from mice challenged after 2 weeks of primary infection (C) the serum from mice 9 weeks after primary infection, (D) the serum from mice challenged 7 weeks after primary infection. Lane (E) indicates the profile of larval excretory-secretory products stained with silver reagent. Molecular weight of each marker protein is also indicated at the right of the lane E.

Table 2 Recovery of *Toxocara canis* larvae and eosinophil counts in peripheral blood of recipient BALB/c, passively transferred with either sera from reinfected, primarily infected, uninfected groups of donors' mice or saline

Serum used for passive immunization	Number of mice used	Number§ of larvae recovered from		Eosinophil counts (per μ l)§
		Liver	Brain	
Reinfected*	6	64.2 \pm 3.6	18.0 \pm 5.9	3,311 \pm 567
Primarily infected†	6	19.5 \pm 0.5	ND¶	4,021 \pm 430
Uninfected‡	5	17.4 \pm 2.4	ND	2,389 \pm 418
Saline	6	5.2 \pm 1.5	40.7 \pm 7.8	3,109 \pm 724

Each mouse was intraperitoneally given 0.5ml of serum from donor mice for 3 consecutive days prior to challenge infection. Necropsy of the recipient mice was performed 2 weeks after challenge infection.

* Sera taken from mice 2 weeks after secondary infection. Secondary infection was given at 7 weeks of primary infection.

† Sera taken from mice 4 weeks after primary infection.

‡ Sera taken from uninfected mice.

§ Mean \pm SE.

¶ ND : not done.

合計にほぼ等しい幼虫が回収され、脳における幼虫の集積性が観察された。肝臓から回収される幼虫数は初感染後7週目に再感染を行うとさらに増加した。即ち、VI群の肝臓からは160.6 \pm 37.7隻の幼虫が回収でき、1回感染群に比べ有意 ($p < 0.02$) に増加していた。またIII群の肝臓からの回収幼虫数との間でも有意 ($p < 0.05$) の増加がみられた。しかしVI群ではIII群でみられたような再感染による幼虫の脳への集積性は観察されなかった。

2. 感染マウス血清と反応する幼虫 ES 抗原分画

虫卵500個を1回のみ投与した1回感染群、あるいは初感染後2週目または7週目に再投与した再感染群のマウス血清と反応する幼虫 ES 抗原分画を、SDS-PAGE と immunoblotting 法を組み合わせた間接酵素抗体染色法によって解析した。1回感染後4週目あるいは9週目のマウスでは、主として ES 抗原の分子量 (MW) 40 KD 付近および30KD 以下の分画に対する IgG 抗体の産生が認められた。これに対して再感染群のマウスでは、上述の分画以外に MW が80KD および32KD の分画との反応が強くみられた。この反応は初感染後7週目に再感染を行った時のほうが、初感染後2週目に再感染を行った時よりも強く出現した。また MW が100KD 以上の分画に対する反応は1回感染群に比べて再感染群で幾分強くなったが、他の ES 抗原分画の反応と比較するとその反応性は弱いものであった (Fig. 1)。

感染2週目のマウス血清は今回の実験条件では ES

抗原と反応しなかった。

3. 再感染血清の受動免疫による肝臓での幼虫捕捉現象の誘導

再感染マウスでみられた肝臓での幼虫捕捉現象と、異なる ES 抗原分画に対するマウスの免疫応答が肝臓での幼虫捕捉現象と関連しているか否かを確かめるために、感染血清の受動免疫による実験を行った (Table 2)。

初感染後7週目に再感染を行ったのち2週目に採血した BALB/c マウスのプール血清を、同系のマウスに0.5ml ずつ3日間、腹腔内注射を行った。最終注射の翌日に500個の虫卵を経口投与し、2週間後に剖検して肝臓内の幼虫数を前述の方法に従って算定したところ、64.2 \pm 3.6隻の幼虫が回収された。ところが、1回感染後4週目の血清を recipient マウスに受動免疫したのち感染を行った群では、肝臓から回収された幼虫数は19.5 \pm 0.5隻であり、再感染マウス血清による受動免疫によって肝臓内にとどまる幼虫数は有意 ($p < 0.001$) に増加していた。対照として用いた非感染マウス血清投与群と生理的食塩水投与群の肝臓から回収された幼虫数はそれぞれ17.4 \pm 2.4と5.2 \pm 1.5隻であり、再感染血清投与群との間には有意の差 ($p < 0.001$) が認められた。また非感染投与群と生理的食塩水投与群の間にも推計学的に差がみられた ($p < 0.02$)。しかし1回感染血清投与群と非感染血清投与群の間には有意差は認められなかった。

また、再感染血清を移入したマウスでは脳に移行した幼虫が、生理的食塩水投与群に比べて減少していた ($p < 0.1$)。なお、recipient マウスの末梢血好酸球数と移入した血清の種類との間には関連がみられなかった。

考 察

犬蛔虫幼虫包蔵卵をただ1回、非好適宿主であるマウスに感染させると、侵入した幼虫は肝臓を通過して全身の筋肉や脳内に移行する (Sprent, 1952)。しかし、繰返し虫卵を感染させると肝臓でとどまる幼虫数は増加する。Lee (1960) は、この幼虫捕捉現象が既感染に対する宿主の抵抗性の現われであると考えた。近藤ら(1976)も ddY 系マウスを用いた追試から、感染を繰返すことによって肝臓から回収される幼虫が増加することを認め、マウスにおける実験的犬蛔虫幼虫移行症の再感染防御効果発現部位としての肝臓の役割を強調した。最近 Sugane and Oshima (1983) は、BALB/c 系ヌードマウスを用いた実験により、再感染マウスでみられる肝臓での幼虫捕捉現象には好酸球性肉芽腫形成が関与し、肝臓で捕捉された幼虫は好酸球によって殺滅されてゆくのではないかと報告している。今回著者は、再感染マウスの肝臓でみられる幼虫の捕捉現象が宿主のいかなる免疫応答を反映しているかを、幼虫 ES 抗原に対する液性免疫応答から解析した。

即ち、SDS-PAGE によって幼虫 ES 抗原を分画し、1回感染のみのマウス血清と再感染を行ったマウス血清とが認識する抗原分画を Southern blotting 法と間接酵素抗体法を用いて検討した。その結果、再感染マウスは、1回感染マウス血清との間では反応のみられなかった幼虫 ES 抗原分画中の MW が80 KD と32 KD の分画を強く認識する IgG 抗体の産生がみられた。そしてこれらの分画に対する反応は、肝臓で捕捉される幼虫数がさらに増加した群 (初感染後7週目に再感染を行ったVI群) でより強くみられた。

犬蛔虫卵の再投与による二次免疫応答の結果産生された抗体が肝臓での幼虫捕捉現象に関与することが感染血清の受動免疫による実験で明らかになった。即ち、初感染後7週目に再感染を行い2週間経過したマウスの血清を同系統のマウスに移入すると、その後の攻撃感染によって肝臓から回収される幼虫数が、1回感染血清や非感染血清あるいは生理的食塩水のみを移入した群と比較して、有意に増加した。このことは再感染マウスでみられる肝臓での幼虫捕捉現象が宿主の免疫学的機序に基づくものであることを示している。さらに、この現象は幼虫

ES 抗原中の特定の分画に対する宿主の免疫応答、即ち再感染によって誘導される特定の抗原分画に対する二次免疫応答と深く関係していると思われる。

Jungery and Ogilvie (1982) は、*Trichinella spiralis* に対して強い排虫現象のみられる NIH マウスと排虫が遅延する C3H マウスを用いた実験から、NIH マウスは *T. spiralis* の stage-specific な surface 抗原を認識して抗体産生を行い得るが、C3H マウスではそのような抗原に対する抗体産生は認められず、ある特定の抗原に対する宿主の抗原認識機構の相違がマウスにおける *T. spiralis* の排虫現象を決定づけていると推察している。また Shapiro and Murray (1982) も、*Trypanosoma burcei* に対して非感受性 (感染しても死亡しない) の N'dama 牛は trypanosome 抗原中の MW: 110 KD, 150 KD, 300 KD の分画中のすくなくともいずれか1つに対する抗体産生が認められたが、感受性 (感染すると死亡する) の Zebu 牛ではこれらのいずれの抗原分画に対する抗体も認められなかったと報告している。このように、寄生虫感染に対する感染防御能の発現にはある特定の寄生虫抗原に対する宿主の免疫応答が深く関わっていると考えられている。

犬蛔虫卵を再感染させたマウスにおいてみられる感染防御能の発現には二次免疫応答の結果惹起された液性抗体が関与する。つまり、この抗体は再感染を完全に阻止することはできないが、侵入した幼虫を肝臓で捕捉することによって以後の移行を抑制し得ると思われる。また、非感染マウス血清の移入群と1回感染後4週目の血清移入群との間では肝臓内幼虫数に有意の差はみられなかった。しかし生理的食塩水投与群との間には推計学的有意差 ($p < 0.02$) が認められたことについては、肝臓での幼虫捕捉現象の発現に正常マウス血清中の非特異的液性因子が一部関与しているのではないかと考えられた。

Maizels *et al.* (1984) は、犬蛔虫症患者血清あるいはマウスの腹腔内に第2期幼虫を接種したのち ES 抗原で追加免疫を行なって得た血清と ES 抗原との反応性の解析から、ES 抗原の全ての分画は感染血清と反応するが、正常血清とは 400 KD の分画のみが反応したと報告している。著者の結果では全ての ES 抗原分画に反応する IgG 抗体の産生は、ただ1回の感染では認められず、再感染後に得られた血清は全分画と反応した。

今回の実験では、recipient マウスに移入された再感染マウス血清が侵入してきた幼虫に対してどのように作用するかについては明らかにし得なかった。Yong and Dobson (1982. a. b) は、広東住血線虫に対する免疫

血清を移入されたラットでは同虫の攻撃感染に対して強い防御効果がみられるが、この作用は移入された免疫血清によって recipient ラットでの抗広東住血線虫抗体産生が抑制されることによって発現されると述べている。また Behnke and Parish (1970) は、*Nematospirides dubius* 感染マウス血清を同系のマウスに受動免疫した際にみられる腸管からの虫体排除の報告の中で、虫体の排除には投与された血清によって虫体が直接傷害されることのほかに、免疫血清によって parasitotoxins が中和され効果的な免疫応答の発現を容易にしているためと考えている。さらに彼らは、*N. dubius* を繰返し感染させて得たマウス血清は正常マウスに防御免疫を誘導できるが、1回感染マウス血清にはこの効果はないと述べている。またこの免疫血清による防御効果は繰返し感染によって多量に産生される IgG₁ によってもたらされると考えられている (Prichard *et al.*, 1983)。

犬蛔虫感染マウスにおいてはこのような液性免疫応答だけでなく、細胞性免疫も誘導され (Kayes and Oaks, 1980)、また T 細胞欠損マウスでは再感染によっても肝臓で捕捉される幼虫数が増加しない (Sugane and Oshima, 1983) という報告もあり、再感染マウスの肝臓でみられる幼虫捕捉現象の発現機構には液性・細胞性免疫の両者が協同して関与しているとも考えられ、今後さらに検討を加えたい。

結 語

犬蛔虫幼虫包蔵卵をマウスに再感染させた際にみられる肝臓での幼虫捕捉現象と幼虫 ES 抗原に対するマウスの免疫応答について検討し以下の成績を得た。

1. 虫卵の再感染によって BALB/c マウスの肝臓で捕捉される幼虫数は増加する。また、再感染までの期間が長くなるほど肝臓で捕捉される幼虫数は多くなる。

2. 再感染マウスは1回感染マウスと較べて、幼虫 ES 抗原分画中の分子量が 80 KD および 32 KD の分画を強く認識して IgG 抗体の産生を行っていると考えられた。1回感染マウスはこれらの抗原分画を認識しておらず、MW が 40 KD 付近と 30 KD 以下の分画に対する IgG 抗体産生しかみられなかった。

3. 再感染マウス血清で同系統の recipient マウスを受動免疫することによって recipient マウス肝臓での幼虫捕捉現象を誘導することができた。

以上の結果から、犬蛔虫幼虫包蔵卵を再感染されたマウスの肝臓でみられる幼虫の捕捉現象には幼虫 ES 抗原のある特定の抗原分画に対するマウスの液性免疫応答が

深く関わっていることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり御指導と御校閲をいただきました金沢大学医学部寄生虫学教室 吉村裕之教授ならびに終始直接の御指導と御助言をいただいた近藤力王至助教授に謝意を表します。

なお本論文の要旨は第39回日本寄生虫学会西日本支部大会 (1983年, 橿原市) において発表した。

文 献

- 1) 赤尾信明・近藤力王至・岡本 敬・吉村裕之 (1983): 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. 寄生虫誌, 6, 541-548.
- 2) Behnke, J. M. and Parish, H. A. (1979): Expulsion of *Nematospirides dubius* from the intestine of mice treated with immune serum. Parasite Immunol., 1, 13-26.
- 3) Bradley, D. J. and McCullough, F. S. (1973): Egg output and the epidemiology of *Schistosoma haematobium*. II. An analysis of the epidemiology of endemic *S. haematobium*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 67, 491-500.
- 4) Fernando, S. T. (1968): Immunological response of rabbit to *Toxocara canis* infection. Parasitol., 58, 91-103.
- 5) Grove, D. I., Hamburger, J. and Warren, K. S. (1977): Kinetics of immunologic responses, resistance to reinfection and pathologic reactions to infection with *Trichinella spiralis*. J. Infect. Dis., 136, 562-570.
- 6) Ito, A. and Yamamoto, M. (1976): The mode of active protection against *Hymenolepis nana* reinfection in mice inoculated with different dose of shell-free eggs. Jpn. J. Parasitol., 25, 247-253.
- 7) Jungery, M. and Ogilvie, B. M. (1982): Antibody response to stage-specific *Trichinella spiralis* surface antigens in strong and weak responder mouse strains. J. Immunol., 129, 839-843.
- 8) 加藤信博 (1973): 実験的イヌ回虫症の研究(Ⅲ) 既感染または既感作マウスの後感染抵抗性と感染マウスの Diethylcarbamazine 投与による治療効果. 岐阜医紀, 21, 159-168.
- 9) Kayes, S. G. and Oaks, J. A. (1980): *Toxocara canis*: T lymphocyte function in murine visceral larva migrans eosinophilia onset. Exp. Parasitol., 49, 47-55.
- 10) Knof, P. M., Nutman, T. B. and Reasoner,

- J. A. (1977) : *Schistosoma mansoni* : resistance to reinfection in the rat. *Exp. Parasitol.*, 41, 74-82.
- 11) Koizumi, T., Hayakawa, J. and Kondo, K. (1983) : *Toxocara canis* : Immunogenic sources of *Toxocara canis* in infected rats. *Jpn. J. Parasitol.*, 32, 379-386.
- 12) 近藤力王至 (1970) : 移行性幼線虫症の実験的研究. 京府医大誌, 79, 32-56.
- 13) 近藤力王至・嶋田義浩・栗本 浩・織田 清 (1976) : 実験的移行性幼線虫症の研究 (2) 犬蛔虫幼虫の侵入に対するマウスの抵抗性について. 寄生虫誌, 25, 371-376.
- 14) 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.
- 15) Lee, H. F. (1960) : Effects of superinfection on the behaviour of *Toxocara canis* larvae in mice. *J. Parasitol.*, 49, 583-588.
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 17) Maizels, R. M. de Savigny, D. and Ogilve, B. M. (1984) : Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infected larvae. *Parasite Immunol.*, 6, 23-37.
- 18) Olson, L. T. (1962) : Organ distribution of *Toxocara canis* larvae in normal mice and in mice previously infected with *Toxocara*, *Ascaris* and *Trichinella*. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 20, 651-657.
- 19) Prichard, D. I., Williams, D.J L., Behnke, J. M. and Lee, T. D. G. (1983) : The role of IgG₁ hypergammaglobulinaemia in immunity to the gastrointestinal nematode *Nematospiroides dubius*. The immunochemical purification, antigen-specificity and *in vitro* anti-parasite effect of IgG₁ from immune serum. *Immunol.*, 49, 353-356.
- 20) 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 serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J. Parasitol.*, 61, 781-782.
- 21) Shapiro, S. Z. and Murray, M. (1982) : African trypanosome antigens recognized during the course of infection in N'dama and Zebu cattle. *Infect. Immun.*, 35, 410-416.
- 22) Smithers, S. R. and Terry, R. J. (1965) : Naturally acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Parasitol.*, 55, 701-710.
- 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. (1952) : On the migratory behaviour of the larvae of various *Ascaris* species in white mice. I. Distribution of larvae in tissues. *J. Infect. Dis.*, 90, 165-176.
- 25) Sugane, K. and Oshima, T. (1983) : Trapping of large numbers of larvae in the livers of *Toxocara canis*-infected mice. *J. Helminthol.*, 57, 95-99.
- 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) Yong, W. K. and Dobson, C. (1982 a) : Passive immunity in rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*: Interactions between syngeneic immune serum and sensitized lymph node cells. *Z. Parasitenkd.*, 68, 87-92.
- 28) Yong, W. K. and Dobson, C. (1982 b) : Antibody responses in rats infected with *Angiostrongylus cantonensis* and the passive transfer of protective immunity with immune serum. *Z. Parasitenkd.*, 67, 329-336.

Abstract

IMMUNE RESPONSE TO EXCRETORY-SECRETORY PRODUCTS OF SECOND
STAGE LARVAE OF *TOXOCARA CANIS*: HUMORAL IMMUNE
RESPONSE RELATING TO LARVAL TRAPPING IN THE LIVERS
OF REINFECTED MICE

NOBUAKI AKAO

(*Department of Parasitology, School of Medicine, Kanazawa
University, Kanazawa City, Japan*)

The present study was performed to examine the relationship between the phenomenon of larval trapping in the livers of mice receiving reinfection with embryonated eggs of *Toxocara canis* and antigen recognition against the excretory-secretory products of second stage larvae (LES) in mice. Six groups of BALB/c male mice, consisting of 5 individuals each, were orally given 500 embryonated eggs in primary or secondary infection. Recovery of larvae from various organs in mice was carried out either 2, 4, 7 and 9 weeks after primary infection, or 2 weeks after secondary infection. The secondary infection was done 2 or 7 weeks after primary infection. In the groups of primary infection, most of the larvae migrated into the muscle tissues or brain. In contrast, there was a significant increase in the number of larvae accumulating in the livers in mice receiving reinfection ($p < 0.02$). Humoral immune responses of infected mice to LES were assessed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting technique. Sera from mice receiving both primary and secondary infections recognized 80 KD and 32 KD dalton antigens of LES, whereas those from primary infected mice did not. Passive transfer of the sera taken from donors receiving secondary infection at the 7th week after primary infection apparently induced hepatic larval trapping in recipient mice following infection. When mice received intraperitoneally 0.5 ml of sera from reinfected mice for three consecutive days before challenge infection, they harboured significantly larger number of larvae in their livers than those mice receiving sera from mice with primary infection, uninfected sera and saline ($p < 0.001$). These results suggest that IgG antibody response against some particular components of LES in challenge mice might participate in induction of increasing hepatic larval trapping.