

犬糸状虫感染の免疫学

早崎 峯夫

東京農工大学農学部 (府中市幸町 3-5-8, 〒183)

Parasitological Immunology on *Dirofilaria immitis* Infection

MINEO HAYASAKI (Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183)

寄生虫疾患の免疫学的研究は宿主血清中の特異抗体を特異的に検出する研究から始まり、次いで感染経過中の宿主の免疫応答を体液性応答、細胞性応答の両面からその態度を解析しようとする報告が相つぎ、近年ではこれら数々の新知見の蓄積のうえにたつて寄生虫抗原物質あるいは遺伝子を免疫的に分析し、宿主の免疫学的防御機構のターゲットとなっている抗原分子や寄生虫の生存を可能にしている抗原分子ならびに虫体由来物質の解析あるいはそれらを応用した診断法の開発等を目的に基礎的・応用的研究が多数報告されている^{30, 63, 101}。この間に種々の免疫学的技法の開発・改良も進み、寄生虫免疫学はめざましい発展を示し、なかでも細胞融合技法によるモノクローナル抗体作製法と免疫生化学的分析法の進展により宿主の免疫防御機構の全体の輪郭がずいぶんはっきりとしてきた⁴³。たとえば、原虫類等の単細胞の寄生虫の場合等は貪食細胞により処理されるが、貪食の不可能な蠕虫では種々の免疫担当細胞が虫体表面に付着して種々の細胞障害因子を放出して虫体を殺滅へと導く。このような細胞が虫体表面に付着して寄生虫に傷害を与える機序を抗体依存性細胞関与細胞障害作用 Antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)⁹と呼ぶ。この作用に関与する細胞は、マクロファージ、好中球、好酸球、血小板、マスト細胞、好塩基球、キラー細胞等で細胞膜表面に抗体や補体のリセプターを有し、虫体表面に結合している抗体や補体、免疫複合体を介して虫体に付着する。こうした抗体や補体を介した異物への結合力は強く、細胞は結合力が強いほど細胞障害作用を強く発揮する。したがって、ADCCによって集中的な攻撃を受けた寄生虫は、クチクラ層に致命的なダメージを生じ、内部組織へとダメージが拡大して、殺滅・排除へと追い込まれて行く^{4, 56, 81, 83, 84, 92}。ただし寄生虫の生存にとって重要な役割を果たすクチクラは、20年ほど前には代謝的にも免疫的にも全く不活性であると考えられていたのである。

ここでは、獣医学領域における重要なフィラリア種の一つである犬糸状虫について、その免疫学的研究の現状の一端を紹介する。

体液性応答と細胞性応答

犬糸状虫実験感染犬における犬糸状虫特異抗体の動態を感染から血中マイクロフィラリア (mf) 出現期まで、約 250 日間、間接赤血球凝集 (IHA) 反応と受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応で測定すると、IHA 抗体は発育虫体の第 3 脱皮 (感染後 10 日前後) 後の感染後 19 日には早くも検出され、PCA 抗体は第 4 脱皮期 (感染後 60 ~ 70 日) に一致して検出され始め、以後両抗体はともに漸増し、感染虫体が性成熟に達したことを示す血中 mf 出現時にさらに強い抗体価の上昇を示す。これらは脱皮期の虫体と虫体由来物質 (脱皮殻と脱皮液) および産出された mf と子宮内液が強い抗原性を有することを示唆している³⁶。なお、血中 mf の急激な増数に相反して抗体価は低下を示すが、これは増数した mf による特異抗体の吸着によるものと考えられている。いっぽう、成虫抽出抗原と子宮内 mf 抽出抗原を用いたマクロファージ遊走阻止試験で細胞性免疫応答の動態を測定すると、感染経過中一貫して反応陰性であり、未感染犬群と感染犬群の間の比較においても、感染犬の成績は未感染犬と同様に反応陰性で、ともに細胞性応答の存在は認められない⁴⁶。このように、犬糸状虫感染に対する犬の免疫応答は抗体産生が強く惹起されているのに対して、細胞性免疫応答は微弱であるのが特徴である^{26, 93}。このように寄生虫感染により宿主の体液性免疫応答は強く刺激され細胞性免疫応答は抑制されるという現象は、他種の線虫感染¹⁰²でも知られている。

なお、犬糸状虫寄生犬に実験感染によって再感染させても感染経過中における IHA 抗体価は、初回感染のような各発育段階での特徴的な抗体価の推移を示さず、むしろ多少の上下を示しながらも大差なく推移し、必ずしも抗体価のブースター効果や再感染率の増減等の変化は認められず²³、住血吸虫感染¹⁹にみられるような随伴免疫 concomitant immunity (すでに感染が成立している宿主は感染虫体を殺滅できないが同種虫体の再感染は防御できるようになる) は犬糸状虫には認められない (未投稿成績)。

犬糸状虫特異抗体の母子間移行

母犬の保有する犬糸状虫特異抗体は乳汁を介して移行する³⁷⁾。すなわち、特異抗体を保有しない母犬からの新生子には抗体は検出されないが、抗体を保有する母犬から生まれた新生子には抗体が検出され、しかも出産直後ほど母犬に近い抗体価を示す。いっぽう、抗体を保有する母犬であってもその胎子からは検出されない。さらに、出生直後から母乳を与えず人工乳で飼育した新生子からは特異抗体が検出されないことや、抗体価の高いフォスター・マザー（乳母）の乳で飼育された子犬は、本来の母親の抗体価より高い抗体価を示すことから乳汁を介した抗体移行が証明された。また、移行抗体の主体がIgGであること、乳汁中の抗体は出産後約40日間検出されること、新生子中の抗体も約2カ月間は検出されること等が明らかになっている。

なお、通常の血清反応で検出されてくる犬糸状虫特異抗体の感染防御能については今までに全く証明されてなく、したがって、子犬への移行抗体も感染防御効果はないものと考えられるが、オカルト感染現象（特に、成熟した雌雄成虫の寄生があるにもかかわらず血中mfの検出されない場合）を有する寄生犬では特異抗体にmf障害作用があることが示されている⁴²⁾ことから、オカルト感染犬の移行抗体はmf殺滅効果をもつものと考えられる。

このような移行抗体の態度が明らかになったことから、従来、犬糸状虫未感染幼犬においてみられたfalse positiveの血清反応は、移行抗体による陽性反応が含まれていた可能性も高い。

犬糸状虫の宿主適応性

犬糸状虫の宿主適応性について、固有宿主の犬と非固有宿主の猫、家兎の比較が行われている。犬への正常感染における成虫回収率は約40～50%である^{36, 46, 48, 49)}。これに対して猫では0.4%⁶⁹⁾と犬のその約1/100の感染率であり、しかも血中mfは全く検出されない。いっぽう、犬糸状虫感染幼虫(L₃)をげっ歯類に実験感染しても成虫の寄生は成立しないことがすでに知られているが、久米(1947)⁵⁹⁾は、未成熟成虫(young adult)を皮下へ外科的に移植すると移植虫体は再び組織内を移動し、静脈に侵入して肺動脈に到達し、寄生が成立することを世界で初めて報告した。この方法を用いると固有宿主のみならず非固有宿主へも犬糸状虫を肺動脈内へ実験感染させることができる。この移植感染法の結果、虫体回収率は犬では平均45%で犬糸状虫L₃の実験感染によるそれと類似であり、血中mfも検出されてくる。ここに用いた移植虫体はすでに宿主(犬)の免疫学的攻撃をくぐり抜けて肺動脈まで到着し生存するための機序¹⁰²⁾

を獲得した虫体であるが宿主(個体)が変わると半数以上が新しい宿主に適応できずに死滅することが分かる。

このことから犬糸状虫は宿主個体ごとに宿主適応性を獲得していることが示唆される。いっぽう、猫への移植でも約40%とほぼ犬の場合と同様であるが、数カ月を経ても血中mfは検出されない。家兎では、移植虫は早いもので2～3日後には家兎の肺動脈に到達するが、多くは数週間内に死滅し、約1カ月以上生存するものもあるものの3カ月以上生存できたものはない。特異抗体の産生については、固有宿主ではIHA抗体とPCA抗体の産生が認められ、血中mfは移植40日後から検出され、これは正常感染の場合の血中mf出現時期とほぼ同時期であり移植虫が成熟虫へ発育したことが分かる。いっぽう、非固有宿主ではPCA抗体は顕著な産生がみられたが、IHA抗体は一貫して陰性であった。しかも、血中mfは全く検出されないことから、PCA抗体が虫体やmfの殺滅作用に関与している可能性が示唆される。このことは後述するように、特異IgE抗体の関与するmf殺滅機序が証明されていることを考慮すると非固有宿主における犬糸状虫感染防御機序を考えるうえで興味深い(未投稿成績)。

また、実験感染犬から成虫を回収して犬糸状虫未感染犬の頸静脈から外科的に挿入すると、挿入された成虫は肺動脈へ流れ着き再び寄生を成立させることができる。この成虫移植犬群では移植後1カ月以内に抗体上昇が認められたが、血中mfは移植翌日から検出されたもののきわめて低値であり、移植後約1カ月から漸増した。なお、移植虫体はほぼ100%が回収された(未投稿成績)。このような長期間のmf抑制現象は移植操作等により移植成虫のmf産生能が影響を受けてただ単に低下していたとは考えにくく、むしろの間には雌虫に対するmf産出抑制効果か、mfに対する殺虫効果が作用しているのではないかと思われるが、オカルト感染現象を解析するうえで今後の詳細な検討が必要となる。

非固有宿主でも免疫抑制処置を行うとL₃の実験感染が成立し、成虫にまで発育することがある。すなわち既報によれば、ステロイドホルモンを投与した猿(macaques)では1～3% (成虫1～3匹/L₃ 95～100匹)⁶⁶⁾、スナネズミ(mongolian gerbil)では0.4% (成虫2匹/L₃ 500匹)⁶⁷⁾の成虫回収率とされている。

いっぽう、固有宿主(犬)においても免疫抑制処置の感染に及ぼす影響について検討されている⁴⁹⁾。免疫抑制剤はアザチオプリン(AZP)(投与量1～10 mg/kg)あるいはプレドニゾロン(PDS)(投与量5～10 mg/kg)を用い、それぞれ副作用(顆粒球減少、化膿性皮膚炎、下痢)の発現しない限り高用量を用いている。すなわち、AZPは感染前3日から実験期間のほぼ全期間毎日投与し、PDSは感染前3日から感染後15日の17日間と感

染後 60～70 日の 11 日間毎日投与された。その結果、AZP 投与群では実験全期間をとおして抗体産生が抑制され、PDS 投与群では第 1 次投与により感染 35 日前後まで抗体産生が抑制され、第 2 次投与では抑制効果は得られなかった。しかし、両投与群の虫体回収率は対照群に比較して差異が認められなかった。これらの結果は犬糸状虫感染に対して犬の免疫防御機序が無効果であることを示すものではなく、むしろ犬糸状虫感染により宿主の免疫学的防御機序の抑制現象が成立しているために免疫抑制剤を投与しても薬効が実験成績に反映しなかったものと推察される。

犬糸状虫の抗原性

犬糸状虫特異抗体の検出における犬糸状虫抗原の有用性を雌虫子宮内 mf 抽出抗原、流血中 mf 抽出抗原、幼虫（虫齡 84 日）抽出抗原および成虫抽出抗原について IHA 反応で検討してみると、子宮内 mf 抗原を用いた IHA 反応が鋭敏性特異性の点で最も感度高く、寄生犬での陽性率は 93% で平均抗体価も高値であった。いっぽう、未感染犬では数頭が陽性反応を示したが、これはその後の解析で上述した母子間移行抗体であることが証明され、子宮内 mf 抗原は特異抗体検出のために高い抗原性を有することが明らかになった。これに対して幼虫抗原、成虫抗原の順で検出感度は低下し流血 mf 抽出抗原の感度はきわめて低いことが示された³³⁾。

次に蛍光抗体法で検討した結果、子宮内 mf に最も強い蛍光が認められた。さらに、子宮内 mf の表面には蛍光が認められるが、流血 mf 表面には明確な特異蛍光は認められないことも明らかになり、子宮内 mf の抗原性の高いことは蛍光抗体法によっても認められた³⁸⁾。

以上のような結果から、子宮内 mf 抗原は他の抗原と抗原性を異にしている可能性が考えられることから、抗体吸収試験により IHA 反応における子宮内 mf 抗原と成虫抗原の抗原性の差異について検討した。すなわち、感染犬血清を成虫抗原で抗体吸収処理を行い、処理前後における抗体価の変化を成虫抗原を用いた IHA 反応と子宮内 mf 抗原を用いた IHA 反応で観察すると、成虫抗原 IHA 反応では処理後全例が陰転したが、子宮内 mf 抗原 IHA 反応では処理前後に抗体価の大きな変動はみられなかった。いっぽう、同様に子宮内 mf 抗原で抗体吸収処理を行うと、処理後子宮内 mf 抗原 IHA 反応は陰転するが、成虫抗原 IHA 反応では処理前後に大きな変動はみられず、両抗原の抗原性は異なることが示された³³⁾。

さらに、抗原構成成分を分析するために子宮内 mf 抗原と成虫抗原をそれぞれ Sephadex G-200 でゲル濾過して画分すると、ともに第 1 ピークに IHA 反応抗原活性が存在した。それぞれの第 1 ピークをさらに DEAE

セルロースカラムクロマトで画分すると、子宮内 mf は NaCl の 0.125, 0.5 M の溶出分画に、成虫抗原は NaCl の 0.125 M, 0.25 M, 0.5 M の溶出分画に IHA 反応抗原活性が存在した。これらの分画に含まれる蛋白分画を DISC-PAGE でさらに詳細に分析すると、子宮内 mf 抗原の分画で IHA 反応抗原性の最も高い 0.5 M の分画では一本のバンドが検出されたが、このバンドは成虫抗原に検出されたいずれのバンドとも電気的移動度が一致せず、mf にのみ特異的なバンドであった。これらの成績も IHA 反応に関与する抗原物質は異なることを示している³⁹⁾。

さらに、SDS-PAGE により雄成虫、雌成虫、子宮内 mf の各抽出抗原間における蛋白構成成分を比較してみる⁵⁷⁾と、分子量 12～250 kilodaltons (Kd) の間にそれぞれ多数のバンドが検出され、特に mf は形態学的にも簡単な構造をしているにもかかわらず、構成蛋白成分は雄成虫 (52 バンド)、雌成虫 (51 バンド) を越える 58 バンドが算定され、その複雑な体成分が示された。これを、分子量の比較によって特異バンドを算定すると、雌雄成虫では各々 2 本であるのに対して、mf では 10 本であり雌雄成虫には存在しない蛋白成分が含まれていることが示唆された。次いで Immunoblotting により、これら雄成虫、雌成虫、子宮内 mf の虫体抽出成分の抗原性を比較すると、血中 mf 陽性犬血清に対してはそれぞれ 21, 18, 16 本のバンドが検出されたが、オカルト感染犬血清に対してはそれぞれ 25, 32, 26 本のバンドが検出され、特異的抗原バンドは前者でそれぞれ 4, 2, 4 本、後者でそれぞれ 5, 7, 4 本であった。

このように、3 種の犬糸状虫抽出抗原の抗原性は異なることが示され、またオカルト感染犬は mf 陽性犬より多くの虫体成分を認識していることが示されたことから、オカルト感染犬にのみ認識されている抗原成分は、mf の殺滅に関連している可能性も考えられ、今後の解析を要する。

しかし、虫体をすりつぶして得た抽出抗原には実際に寄生している虫体から虫体外へ放出されることがなく、したがって宿主に認識されない抗原物質も含まれている可能性もあることから、実際に宿主が認識する虫体生活代謝物質である排泄分泌 (ES) 抗原について分析した。雄成虫 ES 物質と雌成虫 ES 物質について、SDS-PAGE により蛋白分画を比較すると、それぞれ 16, 21 本のバンドが検出される。次に Immunoblotting により抗原性を有するバンドについて検討した結果、mf 陽性犬血清は雄成虫 ES 物質では 7 本、雌成虫 ES 物質では 10 本を検出し、両 ES 物質とも 14～32 Kd の分子量の小さいバンドと強く反応した。いっぽう、オカルト感染犬血清は雄成虫 ES 物質では 3 本、雌成虫 ES 物質では 10 本を検出し、特に雌成虫 ES 物質の 53～136 Kd の比較

的大きい分子量のバンドと強く反応した。

これらオカルト感染犬が認識する抗原バンドには mf にとって致死抗原となりうるものが存在する可能性が強いが、今後の検討を要する。このように、ES 物質が複雑な構成成分からなっていることは虫体の炭水化物代謝や脂質代謝の複雑さに基づいていることを示唆するものと思われる^{47, 52, 53, 61, 62}。

フィラリア性咳嗽

犬糸状虫感染犬には、持続性で時に発作性で激しい湿咳が発生することが知られていて、フィラリア性咳嗽と呼ばれ、犬糸状虫感染犬の約 23% に認められる⁵⁰。本症の発生機序はまだよく知られていないが、長年にわたって犬糸状虫が寄生している牡齢から老齢犬にみられることが多く、抗生物質や一般的鎮咳剤があまり有効に作用しないで抗アレルギー剤が有効に作用すること等が経験的に知られている。また、一般的に寄生虫感染においてみられる種々の症状は、虫体自体の病害作用よりも宿主の虫体抗原に対する免疫応答の結果、組織障害が発現することに起因している^{30, 92}ことから、フィラリア性咳嗽にはアレルギー性素因が大きく関与しているものと考えられている。このことから免疫療法の有効性を検討するために抗原感作療法が行われた。

種々の臨床検査成績による類症鑑別の結果、フィラリア性咳嗽と診断された罹患犬 21 頭に犬糸状虫抽出抗原 (200 µg 蛋白/ml) 1 ml を 1 日 1 回 5 日連続で皮下注射したところ、7 頭 (33%) に咳嗽の消失、10 頭 (48%) に著明な軽減がみられ、計 17 頭 (81%) に鎮咳効果がみられた⁵⁰。このように寄生虫抗原の接種のみの処置によって咳嗽が軽快したことから、この処置が減感作療法に類似した効果を発揮したことが考えられる。しかし、通常アレルギー疾患の減感作療法は遮断抗体 (IgG)^{67, 68}の産生までに比較的長期間を必要とする。したがって、本成績のようにきわめて短期間で発咳の抑制効果が現れたことに対する作用機序の解明が必要である。

血小板のマイクロフィラリア障害作用とジエチルカルバマジン剤

血小板が止血作用の他に炎症の場において血管透過性の亢進、白血球走化性の促進、殺菌作用に関与^{65, 82, 100}することや血小板膜表面上に IgE リセプターを有していること^{15, 54, 83}がわかったのは比較的最近のことで、このように血小板がアレルギー反応に大きく関与していることが解明^{7, 84, 90, 91, 92}され、さらに、住血吸虫感染において特異 IgE 抗体と血小板により幼虫 (schistosomula) が殺滅されることも明らかとなった^{14, 55}。

ジエチルカルバマジン (DEC) 剤は約 40 年も前から用いられてきた主要な抗糸状虫剤であるが、その作用機序

について多くの研究報告が行われてきたが、いまだに解明されてなく、寄生虫学領域の興味ある研究課題となっている⁴⁴。すなわち、薬剤の直接作用は否定されているが、DEC が抗幼虫・抗 mf 効果を発揮するために、特異抗体⁶⁸、リンパ細胞⁸⁷、DEC の虫体表面への直接的ダメージによる ADCC の促進²²等が重要な役割を果たすとしているが明快に説明しているものはない。いっぽう、DEC の体内動態の特徴は代謝排泄がきわめて速く、投与後血中濃度は 1 時間でピークを示し 24 時間後には全く検出されず、尿にのみ排泄され糞便中には排泄されず体内蓄積もない。また、血小板フリーの場所では DEC を増量投与しても mf 殺滅作用はみられず殺滅には血小板の存在を必要とする^{31, 32}等が指摘されている。

これらの成績は血小板の関与を強く示唆するもので、その後の研究から血小板の重要性が証明された^{14, 15}。すなわち、正常人に DEC を 1 回投与して 3 時間後に血小板を採り、人のロア糸状虫 *Loa loa* の mf と *in vitro* 培養すると mf の死滅がみられ、血小板が殺滅に重要な役割を果たすことが示された。同時に、顆粒球や白血球あるいは特異抗体や補体の存在は必要ないことも示された。しかも、この DEC 投与正常人では 2 日後には血中 DEC は検出されなくなるが、15 日後の血小板にも mf 殺滅効果がみられ、DEC が血小板を活性化することが示された。さらに、DEC 非投与正常人血小板とマレー糸状虫 *Brugia malayi* の mf と DEC を加えた *in vitro* 培養でも mf の殺滅が確認され、しかも DEC 投与量依存性に殺虫率が増加した。さらに、この反応系に正常人新鮮血清を加えても殺滅能が増強することはなく、補体の関与は認められなかった。

人の回旋糸状虫 *Onchocerca volvulus* の mf を用いた実験では、血小板のみや DEC のみ、あるいは DEC と ES 抗原のみでは mf の殺滅は認められないが、血小板と DEC それに成虫培養液より採取した ES 抗原を加えると殺滅効果がさらに増強することが明らかになった。このように血小板による mf の殺滅に ES 抗原の存在が不可欠であることが強く示唆されたため、ES 抗原特異抗イディオ型モノクローナル抗体による証明が試られた。

すなわち抗体分子はそれ自体が抗原性を有しているが、抗イディオ型抗体とは、抗体分子の変領域で抗原認識部位である Fab 部位に対する抗体で、抗体分子でありながら元の抗体が認識する抗原と同一の抗原活性を有することができる^{80, 85, 86}。それはちょうどカギ (抗原) とカギ穴 (抗体) の関係に例えられ、カギ穴 (元の抗体) からカギ (抗イディオ型抗体) を作るができるようなものである。つまり、抗イディオ型抗体は元の抗原とは全く無関係な物質であるが、その抗体活性は抗原物質とおなじ働きを示す。

なお、寄生虫抗原特異抗イディオ型モノクローナル抗

体の作製は、今までに、*Plasmodium berghei*⁷²⁾, *Trypanosoma rhodesiense*⁷⁹⁾, *Schistosoma mansoni*²⁹⁾, *S. japonicum*⁸⁴⁾, についての報告しかなく、フィラリア種¹⁵⁾では初めてである。

そこで、*O. volvulus* の ES 抗原を認識するモノクローナル抗体 (Ab-1) を作製し、これを用いてさらに抗イディオ型抗体 (Ab-2) を作製した。この Ab-2 を ES 抗原の代わりに反応系に加えた結果、添加量依存性の mf 殺滅効果が認められた。さらに Ab-2 の抑制物質として Ab-1 を反応系に添加すると、添加量依存性に mf 殺滅率が減少した。これらの成績から、ES 抗原は重要な役割を果たしていることが証明された¹⁵⁾。

さらに、興味深い新事実も明らかにされた。すなわち、血小板と DEC と ES 抗原の反応系に mf の代わりにマソソ住血吸虫 *S. mansoni* の schistosomula を加えても殺滅されることがわかった。つまり、血小板が DEC によって活性化されるためには ES 抗原が必要であった。したがって DEC による血小板の活性化は ES 抗原特異的である。いっぽう、活性化された血小板は mf のみならず schistosomula も殺滅できる。したがって、活性化血小板の寄生虫殺滅機序は虫種非特異的である¹⁵⁾。

血小板のこの様な 2 面的な細胞反応はアレルギー学の研究でも確認されている^{7, 18, 55, 92)}。すなわち、血小板は IgE リセプターを介してアレルギー反応に関係しているが血小板の活性化にはアレルゲン特異 IgE 抗体とアレルゲンの存在が必要であることが証明されている。こうして活性化された血小板は種々の放出因子によって細胞障害作用を発揮してアレルギー症状を引き起こす。ところがこのようにして活性化された血小板もまた mf や schistosomula を殺滅できることが証明されている。なお、殺滅因子として、血小板から放出される活性酸素が強く示唆されている^{14, 15)}。

免疫学的犬糸状虫感染診断

寄生虫の免疫学的感染診断の研究は長い歴史をもち多くの報告が行われ、現在では抗原分子や遺伝子を応用して精度の高い診断法の開発が研究されている¹⁰⁾。犬糸状虫の診断法においても多くの改良が行われてきた²⁴⁾。その検査法も最近、抗体検出法から抗原検出法に移ってきた。その理由として、抗体検出の場合、宿主は一度抗原刺激を受けると長期にわたり抗体を産生し、必ずしも虫体の存在を忠実に反映しているとは限らない。すなわち、毎年幼虫駆除 (いわゆる予防法) や成虫駆除を行っている虫体寄生がなくとも、たとえ駆除されるまでの短期間であっても抗原刺激を受ければ抗体は産生され反応陽性となることもあり得る。これに対して抗原検出の場合、生存虫体より放出される生活代謝産物を検出するため虫体の存在を忠実に反映し得る。しかし、流血中のご

く微量な抗原分子を検出するものであることから、微量なため検出されない場合もあるという短所も持つ。

抗体検出 ELISA は、犬糸状虫成虫抽出抗原を Sephadex G-200 でゲル濾過した分画のうち抗原活性が集中している第 1 ピーク³⁹⁾を精製抗原として用い被験血清を反応させ、結合した特異抗体を市販のペルオキシターゼ標識抗犬 IgG 血清で検出した。なお、通常、ELISA 反応で行われている one well 法では試験操作中に実験室内の温度差や実施するもの間で微妙な手技的差異が発色度の誤差を与えるであろうと考え、血清希釈度をもって抗体価として表現する抗体希釈法にて行った。いっぽう、抗原検出法はモノクローナル抗体を用いて 2 抗体サンドウィッチ法による。

実験犬群は、未感染群、感染暴露のみの非寄生群、mf 血症群、未成熟虫寄生群、単性 (雄または雌) 成虫寄生群、そしてオカルト感染群に分けた。犬糸状虫診断において基本的検査法は血中 mf 検出法であるが、mf が陰性の場合免疫学的診断法が有効となる。問題となるのは次の 4 つで、すなわち感染暴露後感染した幼虫がまだ体内移行期にあるもの、未成熟虫寄生のもの、単性寄生のもの、それにオカルト感染犬である。

抗体検出法においては基礎試験にて吸光度 0.097 以上で最終血清希釈倍数が 1600 倍以上のものを特異的陽性反応と定めた結果、未感染群は全例反応陰性で、mf 血症群は 100% の陽性率であった。いっぽう、感染暴露群は 40% と低値であったが、未成熟虫群とオカルト感染群では 100% の陽性率となり、単性寄生群でも 87% と高率であった。

抗原検出法においては基礎試験にて吸光度 0.280 以上を特異的陽性反応とし、抗体価は吸光度をもって表した結果、未感染群では全例反応陰性であったが、mf 血症群では 79% であり、オカルト群でも 80% であった。しかも感染暴露群、未成熟虫群、単性寄生群の陽性率は低く、診断的有用性は低いものと思われた。ただし、用いられるモノクローナル抗体の抗原特異性が高くなれば抗原検出感度も高くなり、診断有用性は増す。

以上のように、mf 陰性犬を診断する場合、抗体検出法で高い抗体価が得られた時は未成熟虫寄生犬か、オカルト感染犬の可能性がきわめて高く、抗原検出法でも高い抗原価を示したときはオカルト感染犬である確率が高いものと考えられる。したがって、両検出法を実施することが望ましい⁴⁵⁾。

実験的オカルト感染現象

mf 抵抗性を短日時のうちに賦与させて、オカルト現象を実験的に再現させることができる⁴²⁾。すなわち、未感染犬に寄生犬から採取した生きた mf の 90 ~ 201 × 10⁴ を毎週 1 回、計 3 回静注したうえで L₃ 100 匹を実験

感染した。実験犬の血中 mf は通常 2 回目の静注後全く検出されなくなる。正常感染対照犬にみるように血中 mf が出現してくるのは 180 日頃であるが、実験犬では全く血中 mf は検出されてこない。なお、実験犬の成虫回収率は対照犬と差はなく、しかも雌雄両成虫の寄生が認められ、かつ雌成虫子宮内には mf が多数存在していることから、mf は子宮内で正常に発育し、血中に産出されると殺滅されることを示唆しており、実験犬には mf 殺滅機序が成立しているものと考えられる。この現象は、WONG^{94, 95, 99)} が初めて報告した。なお、死 mf ではこの現象は成立しないことから、生活代謝産物が mf 殺滅機序の成立に大きく関与しているものと考えられる。

犬糸状虫感染の免疫学的防御

HAYASAKI et al. (1989)⁴⁸⁾ は、免疫賦与と処置による成虫回収率への影響を検討した。すなわち、実験犬群を 4 群に分け、第 1 群は犬糸状虫成虫の PBS 抽出抗原を毎週 1 回合計 3 回皮下接種したもので、第 2 群は同抗原を同様に 2 回皮下接種したもので、第 3 群は豚肺虫の L₃ を 3 回経口投与したもので、第 4 群は対照感染群とし、全実験犬は処置後 1 週に犬糸状虫 L₃ を実験感染した。その結果、第 1、2 群では虫体回収率高く、虫体体長も長く、しかも 3 回免疫群 (第 1 群) のほうが 2 回免疫群 (第 2 群) より回収率、体長ともに高値を示し、成虫抽出抗原による免疫処置が虫体の発育に有利に働くことが示された。いっぽう、第 3 群では逆に虫体回収率低く体長も有意に短く、この免疫処置が虫体の発育を妨害したことが示された。犬糸状虫 L₃ 実験感染前に、豚肺虫 L₃ 接種により犬糸状虫成虫抽出抗原を用いた IHA 反応の抗体価に上昇が認められたことは、豚肺虫が犬糸状虫と抗原交差することを示すものである。また、血中 mf の出現が対照群のそれより約 1 カ月以上遅れたことは感染虫体の発育が抑制されたことを示すものである。以上のように、免疫学的処置を賦与すると虫体回収率や虫体発育に影響することから、犬糸状虫の生存は宿主の免疫学的防御機序の態度と強く関連していることが示唆される。

以上のように、抑制されている宿主の免疫防御機序は何らかの免疫賦与と処置で刺激すると宿主の免疫学的防御効果が回復する可能性のあることが示唆された。

WONG et al. (1974)⁹⁸⁾ の報告では、20 Krad の放射線照射により生命力を減弱させた L₃ を、4 頭の犬にそれぞれ 2000 ~ 2400 匹を接種した後、57 日と 89 日に正常 L₃ を 200 ~ 250 匹感染させ、さらに 216 ~ 480 日後に肺動脈内の成虫を算定したところ、接種後 57 日に正常感染を行ったものの虫体回収率は 10 ~ 17% であったが、接種後 89 日の場合の回収率は 0% であった。さらに 4 頭の犬に照射 L₃ の 200 ~ 415 匹を接種した後、120 ~ 190 日に正常 L₃ を 200 ~ 234 匹感染させ、さらに 41 ~

381 日後に虫体回収率を算定したところ、41 日後に検査した 1 頭では体内移行中の幼虫は検出されず、残りの 3 頭は 0.5 ~ 3.5% の虫体回収率であった。いっぽう、正常感染対照犬 5 頭の虫体回収率は 38.4 (22 ~ 54)% であった。このことから、放射線照射 L₃ の接種は生ワクチンとしての効果を有し、接種後約 90 日の正常感染に対して完全な感染防御効果を示すが、それ以前や以後ではかなりの防御効果を示すが完全ではないことが示唆された。このことから、放射線照射 L₃ の生存期間を検討している。すなわち、照射 L₃ の 200 ~ 396 匹を接種して約 1 カ月から約 14 カ月後に体内移行中の虫体や固有寄生場所 (肺動脈内) の虫体を詳細に検査した結果、感染後 66 日に皮下織と筋膜下より 1 匹ずつ計 2 匹が検出されたのを最後に、それ以降全く検出されなかったことから、生存期間は 2.0 ~ 2.5 カ月であろうと結論している。このように、感染後 2 カ月間に幼虫から放出される ES 物質が宿主の感染防御能を刺激することが示唆されている。しかも、感染 2.2 ~ 2.5 カ月後の時期は感染した幼虫の第 4 脱皮期に一致しており、脱皮期には血清反応における犬糸状虫特異抗体価が急速に上昇し強い抗体産生刺激が加わっていることから、脱皮時の虫体放出物質や脱皮の脱け殻が強い抗原性を有し、特に感染防御効果の発現に大きく関与している可能性の高いことが推察される。

また、GRIEVE et al. (1988)²⁵⁾ も興味深い実験を犬で行っている。彼の報告によれば、まず L₃ 150 ~ 400 匹の感染約 2 カ月後に ivermectin 50 μg/kg の経口投与にて幼虫を殺滅する。50 日後に再度、同様の感染を行い約 2 カ月後に ivermectin を投与する。さらに 140 日後に 3 回目の同様の感染と投薬を行う。こうして実験犬を L₃ が殺滅されるまでの 2 カ月間に放出する ES 抗原物質で繰り返し免疫する。この免疫犬を 2 群に分け、1 群には L₃ 100 匹を diffusion chamber にいれて皮下に外科的に移植し、20 日後の chamber 内の幼虫の体長を計測して発育を観察し、他の 1 群は L₃ を正常感染して約 250 日後に成虫回収率を算定する。その結果、chamber 内の幼虫の体長は免疫群の方が対照群より有意に小さく、虫体生存数も免疫群は対照群の 37% に過ぎなかった。成虫回収率に関しては、免疫群 (4 頭) は 1 頭から成虫 2 匹 (雄虫、雌虫各 1 匹) が回収されたが集虫法による血中 mf の検出は陰性であった。残りの 3 頭からは成虫は全く回収されなかった。これに対して対照群での成虫回収率は 28% であり、全頭に血中 mf が検出された。この報告においても、感染後 2 カ月間に幼虫から放出される ES 物質が宿主に感染防御能を賦与していることが明らかである。

上述した感染後 2 カ月間とは、犬糸状虫の第 3 期幼虫 (L₃) 期 (感染後約 10 日間) と第 4 期幼虫 (L₄) 期 (感

染後約 10 日から 60～70 日の 50～60 日間)に相当している。したがって、この間の ES 物質の免疫により、chamber を用いた実験にみるように L_4 の初期の幼虫に対する殺滅機序が働いていることが示され、成虫回収率の比較の実験にみるように成虫 (L_5) あるいはそれ以前の未成熟虫または L_5 の初期の虫体さらには L_4 の後期の虫体に対しておよび mf に対して殺滅機序が働いていることが推察される。このように、 L_3 と L_4 の ES 物質は犬糸状虫のいろいろな発育段階に対して殺滅現象を賦与できるようである。したがって、逆にいえば、必ずしも幼虫期の ES 物質が重要とは限らず、成虫から採取される ES 物質の中にも感染防御能を惹起させる分画が含まれているかも知れない。

おわりに

寄生虫の駆除、寄生の阻止等の目的で毎年多くの駆虫剤が開発されその駆虫効果も高く低毒性で安全に使える駆虫剤が普及して、わが国の獣医領域では寄生虫病は必ずしも驚異の疾患とは思われていないようにさえ見える。しかし、いまだに獣医診療におけ主要疾患は寄生虫病でありしかもその正確な罹患動物数等出しようがないほど多い。たとえば、人でさえも全世界で、線虫症患者は 30 億 4700 万人、糸虫症患者は 1 億 3000 万人、吸虫症患者は 2 億 4300 万人にのぼっている⁷⁸⁾ことを考えれば家畜における寄生虫病罹患率はきわめて高いことは容易に想像できる。

寄生虫ワクチンの開発の研究の歴史は長く、現在までに組織培養減弱化虫体や放射線照射減弱化虫体による免疫、別種寄生虫による交差感染免疫、虫体抽出物質や ES 物質を用いた免疫等、種々の方法で宿主に感染防御能を賦与しようとする多くの試みが報告されてきている^{34, 35, 40, 41)}。その詳細については、いくつもの総説^{17, 21, 30, 60, 71, 89, 92)}にみるように枚挙にいとまがないが、近年では寄生虫 ES 抗原にその焦点が絞られてきていて、あらゆる寄生虫種を対象に ES 抗原のワクチン効果が検討され⁶⁰⁾、なかでも Rickard 一派の *Tenia* 属糸虫に関する研究⁷³⁻⁷⁷⁾や Capron 一派の住血吸虫に関する研究^{5, 8, 12, 13, 20, 27, 28)}等、特筆に値する報告も少なくない。しかし、実用ワクチンの完成はいまだ見ず、わずかにマンソン住血吸虫感染において実用化試験が始まったところである^{6, 10)}。

糸状虫種においても総説⁶⁰⁾にみるように、*O. volvulus*、*Brugia pahangi*、*B. malayi*、*Litomosoides carinii* 等、ES 抗原の検討は多い。さらに、虫体体表の抗原性についても総説⁵¹⁾されているように多くの報告がみられ、*O. volvulus*⁸⁸⁾や *B. malayi*³⁾等、詳細な検討がみられる。

犬糸状虫についても mf¹⁶⁾、 L_3 や L_4 ^{1, 2, 66, 70)}の体表物質の抗原性、あるいは成虫の ES 抗原⁵⁷⁾の検討が行われ

ていて、とりわけ Grieve 一派の報告^{1, 2, 66)}はきわめて興味深い。

しかし、犬糸状虫はその life cycle が約半年と長く、中間宿主が蚊でその飼養は決して容易ではなく、しかも本種がげっ歯類には感染できず犬を用いて実験しなければならない等、犬糸状虫種そのものがあまり実験室向きの寄生虫種ではないため、報告は決して多くはないのであるが、すでに述べてきたように、虫体抽出物質や ES 物質における感染防御関連抗原分画の解析や虫体体表抗原性の解析の研究は徐々に興味深い新知見を提出し始めており、感染防御に強く関与する虫体由来分子の単離及びその物質のバイオテクノロジーによる複製生産の研究は犬糸状虫ワクチンの開発にとって今後の重要な課題である。

引用文献

- 1) ABRAHAM D., GRIEVE R. B. and MIKA-GRIEVE M.: *Exp. Parasitol.*, 65, 157～167 (1988).
- 2) ABRAHAM D., MOK M., MIKA-GRIEVE M. and GRIEVE R. B.: *J. Parasitol.*, 73, 377～383 (1987).
- 3) AGGARWAL A., CUNA W., HAQUE A., et al.: *Immunology*, 54, 655～663 (1985).
- 4) AIME N., HAQUE B., BONNEIL B., et al.: *Immunology*, 51, 585～594 (1984).
- 5) BALLOUL J. M., GRZYCH J. M., PIERCE R. J. and CAPRON A.: *J. Immunol.*, 138, 3448～3453 (1987).
- 6) BUTTERWORTH A. E., BENSTED-SMITH R., CAPRON A., et al.: *Parasitology*, 94, 281～300 (1987).
- 7) CAPRON A., AMEISEN A., JOSEPH M., et al.: *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 77, 107～114 (1985).
- 8) CAPRON A. and DESSAINT J. P.: *Ann. Rev. Immunol.*, 3, 455～476 (1985).
- 9) CAPRON A., DESSAINT J. P. and CAPRON M.: *Progr. Allergy*, 31, 234～267 (1982).
- 10) CAPRON A., DESSAINT J. P., CAPRON M., et al.: *Science*, 238, 1065～1072 (1987).
- 11) CAPRON A., JOSEPH M., AMEISEN J. C., et al.: *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 82, 307～312 (1987).
- 12) CAPRON A., PIERCE R., BALLOUL J. M., et al.: *Acta Tropica* 44, Suppl. 12, 63～69 (1987).
- 13) CAPRON M., CAPRON A., KHALIFE J., et al.: *Acta Tropica*, 44, Suppl. 12, 55～62 (1987).
- 14) CESBRON J. Y., CAPRON A., VARAGAFITIF B., et al.: *Nature*, 325, No. 6104, 533～536 (1987).
- 15) CESBRON J.-Y., HAYASAKI M., JOSEPH M., et al.: *J. Immunol.*, 141, 279～285 (1988).
- 16) CHERIAN P. V., STROMBERG B. E., WEINER D. J. and SOULSBY E. J. L.: *Int. J. Parasitol.*, 10, 227～233 (1980).
- 17) CLEGG J. A. and SMITH M. A.: *Adv. Parasitol.*, 16, 165～218 (1978).
- 18) CLEMMONS R. M., YAMAGUCHI R. A., SCHAUB R. G., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 47, 322～325 (1986).

- 19) DISSOUS K. and CAPRON A.: *FEBS lett.*, 162, 355~359 (1983).
- 20) DISSOUS C., GRZYCH J. M. and CAPRON A.: *J. Immunol.*, 129, 2232~2234 (1982).
- 21) EVERED D. and CLARK S., eds: *Filariasis, Ciba Foundation Symposium 127*, John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK (1987).
- 22) GIBSON D. W., CONNOR D. H., BROWN H. L., et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25, 74~87 (1979).
- 23) GRIEVE R. B.: *Epidemiol. Rev.*, 5, 220~246 (1983).
- 24) GRIEVE R. B.: *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small animal)*, 2, 4~14 (1987).
- 25) GRIEVE R. B., ABRAHAM D., MIKA-GRIEVE, M., et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39, 373~379 (1988).
- 26) GRIEVE R. B., GEBHARDT B. M. and BRADLEY R. E.: *Int. J. Parasitol.*, 9, 275~279 (1979).
- 27) GRZYCH J. M., CAPRON M., BAZIN H., et al.: *J. Immunol.*, 129, 2739~2743 (1982).
- 28) GRZYCH J. M., CAPRON M., DESSOUS C., et al.: *J. Immunol.*, 133, 998~1004 (1984).
- 29) GRZYCH J-M., CAPRON M., LAMBERT P. H., et al.: *Nature*, London 314, 74~76 (1985).
- 30) HAQUE A. and CAPRON A.: *Parasite Antigens, Toward New Strategies for Vaccines*, Pearson T. W. ed., 317~402, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1986).
- 31) HAWKING F.: *Adv. Pharmac. Chemother.*, 16, 129~194 (1979).
- 32) HAWKING F., SEWELL P. and THURSTON J. P.: *Brit. J. Pharmacol.*, 5, 217~238 (1950).
- 33) HAYASAKI M.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 43, 21~26 (1981).
- 34) 早崎峯夫: 東獣ジャーナル, No. 194, 11~15 (1981).
- 35) 早崎峯夫: 東獣ジャーナル, No. 195, 14~15 (1982).
- 36) HAYASAKI M.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 44, 63~70 (1982).
- 37) HAYASAKI M.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 44, 781~786 (1982).
- 38) HAYASAKI M.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 45, 113~115 (1983).
- 39) 早崎峯夫: 東京農工大学農学部学術報告, 第25号, 1~27 (1984).
- 40) 早崎峯夫: 東獣ジャーナル, No. 244, 11~12 (1986).
- 41) 早崎峯夫: 東獣ジャーナル, No. 246, 11~13 (1986).
- 42) 早崎峯夫: 犬糸状虫一寄生虫学の立場から一. 大石 勇編, 144~152, 文永堂出版, 東京 (1986).
- 43) 早崎峯夫: 比較臨床血液研究会誌, 1, 24~28 (1988).
- 44) 早崎峯夫: 比較臨床血液研究会誌, 1 (No. 2), 59~63 (1989).
- 45) 早崎峯夫: 犬糸状虫症. 大石 勇編, 124~132, 文永堂出版, 東京 (1990).
- 46) 早崎峯夫, 中垣和英, 小林茂雄, 大石 勇: 日獣誌, 43, 909~914 (1981).
- 47) 早崎峯夫, 中垣和英: 犬糸状虫一寄生虫学の立場から一. 大石 勇編, 153~160, 文永堂出版, 東京 (1986).
- 48) HAYASAKI M. and OHISHI I.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51, 540~546 (1989).
- 49) HAYASAKI M. and OHISHI I.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51, 955~960 (1989).
- 50) HAYASAKI M., HARAYAMA A. SEKI H., et al.: *J. Vet. Med. Sci.*, 53 (4), in press.
- 51) HOWELLS R. E.: *Filariasis. Ciba Foundation Symposium 127*, 97~106, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK (1987).
- 52) HUTCHISON W. F. and McNEILL K. M.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 35, 721~727 (1970).
- 53) HUTCHISON W. F., TURNER A.C., GRAYSON D. P., et al.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 53B, 495~497 (1976).
- 54) JOSEPH M., AMEISON J. C., KUSNIERZ J. P., et al.: *C. R. Acad. Sci.*, Paris 298, 55~60 (1984).
- 55) JOSEPH M., AURIAULT C., CAPRON A., et al.: *Nature*, 303, No. 5920, 810~812 (1983).
- 56) JOSEPH M.: *Clinics in Immunology and Allergy*, 2, 567~596 (1982).
- 57) KANEKO H., HAYASAKI M. and OHISHI I.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 52, 995~1000 (1990).
- 58) 小林準三, 松田 肇, 藤田紘一郎, ほか: 寄生虫誌, 18, 563~574 (1969).
- 59) 久米清治, 板垣四郎: 日獣誌, 9, (3, 4), 106 (1947).
- 60) LIGHTOWLERS M. W. and RICKARD M. D.: *Parasitology*, 96, S123~S166 (1988).
- 61) McNEILL K. M. and HUTCHISON W. F.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 38B, 493~500 (1971).
- 62) McNEILL K. M. and HUTCHISON W. F.: *Canine Heartworm Disease* (Bradley, R. E. ed.), University of Florida Press, Florida (1972).
- 63) MEREDITH S. E. O., UNNASCH T. R., KARAM M., et al.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 36, 1~10 (1989).
- 64) MITCHELL G. F., GARCIA E. D. and CRUISE K. M.: *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 61 (Pt. 1), 27~36 (1983).
- 65) 水島 裕: 感染・炎症・免疫, 18~2, 89~98 (1988).
- 66) MOK M., GRIEVE R. B., ABRAHAM D. and RUDIN W.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 31, 173~182 (1988).
- 67) NESBITT G. H.: *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 172, 55~60 (1978).
- 68) NESBITT G. H. and SCHMITZ J. A.: *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173, 282~288 (1978).
- 69) 大石 勇, 小林茂雄, 久米清治: 寄生虫誌, 14, 610 (1965).
- 70) PHILIPP M. and DAVIS T. B.: *J. Immunol.*, 136, 2621~2627 (1986).
- 71) PORTER R. and KNIGHT J., eds: *Parasites in the immunized host, mechanisms of survival: Ciba Foundation Symposium 25 (new series)*, Elsevier, Amsterdam (1974).

- 72) POTOCNJAK O., ZAVALA F., NUSSENZWEIG R., et al.: *Science*, 215, 1637~1639 (1982).
- 73) RICKARD M. D.: *Res. Vet. Sci.*, 23, 368~371 (1977).
- 74) RICKARD M. D. and ADOLPH A. J.: *Vet. Parasitol.*, 1, 389~392 (1976).
- 75) RICKARD M. D. and ADOLPH A. J.: *Res. Vet. Sci.*, 23, 365~367 (1977).
- 76) RICKARD M. D. and ADOLPH A. J.: *Parasitology*, 75, 183~188 (1977).
- 77) RICKARD M. D. and BELL K. J.: *Res. Vet. Sci.*, 12, 401~402 (1971).
- 78) ROGERS W. P.: *Parasitology-Quo vadit? Proceedings of the Sixth International Congress of Parasitology*, Howell M. J., ed., Australian Academy of Science, Canberra (1986).
- 79) SACKS D. L. ESSER K. M. and SHER A.: *J. Exp. Med.*, 155, 1108~1119 (1982).
- 80) 坂戸信夫: 代謝, 15臨時増刊号 免疫'78, 1371~1379 (1978).
- 81) SANTORO F.: *Clinics in Immunology and Allergy*, 2, 639~654 (1982).
- 82) 里内 清: 感染・炎症・免疫, 12, 331~342 (1982).
- 83) SIEGELBERG H. L.: *Adv. in Immunol.*, 35, 61~88 (1984).
- 84) SLEZAK S., SYMER D. E. and SHIN H. S.: *J. Exp. Med.*, 116, 489~505 (1987).
- 85) 多田富雄: 代謝, 15臨時増刊号 免疫'78, 1381~1388 (1978).
- 86) 多田富雄: 代謝, 20臨時増刊号 免疫'83, 1378~1379 (1983).
- 87) 田中 寛, 江下優樹, 高岡正敏: 寄生虫誌, 23, 増刊号, 36 (1974).
- 88) TAYLOR D. W., GODDARD J. M. and McMAHON J. E.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 18, 283~300 (1986).
- 89) TAYLOR A.E.R. and MULLER R., eds: *Vaccines against parasites, Symposia of the British Society for Parasitology*, Vol. 18, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1980).
- 90) THOREL T., JOSEPH M., TSICOPOULOS A., et al.: *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 85, 232~237 (1988).
- 91) THOREL T., JOSEPH M., VORNG A., et al.: *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 85, 227~231 (1988).
- 92) WAKELIN D.: *Immunity to Parasites, how animals control parasite*. Edward Arnold (Publishers) Ltd, London (1984).
- 93) WEIL G. J., OTTESEN E. A. and POWERS K. G.: *Exp. Parasitol.*, 51, 80~86 (1981).
- 94) WONG M. M.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13, 57~65 (1964).
- 95) WONG M. M.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13, 66~77 (1964).
- 96) WONG M. M.: *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68, 479~490 (1974).
- 97) WONG M. M. and LIM K. C.: *J. Parasitol.*, 61, 573~574 (1975).
- 98) WONG M. M., GUEST M. F. and LAVOPIERRE M. J.: *Exp. Parasitol.*, 35, 465~474 (1974).
- 99) WONG M. M., SUTER P. F., RHODE E. A., et al.: *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 163, 133~139 (1973).
- 100) 山中 学: 感染・炎症・免疫, 12, 197~204 (1982).
- 101) YAZDANBAKHSH M.: *Parasitology today*, 6, 207~208 (1990).
- 102) 吉村堅太郎: 日獣会誌, 33, 517~524 (1980).