

Immunological Response of Dogs to *Dirofilaria immitis* Infection

Mineo HAYASAKI, Kazuhide NAKAGAKI, Shigeo KOBAYASHI
and Isamu OHISHI

Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University
of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183

(Received for publication December 16, 1980)

Abstract. The immunological responses of dogs infected with *Dirofilaria immitis* were studied by macrophage migration inhibition (MI) test (indirect method), indirect hemagglutination (IHA) test and passive cutaneous anaphylaxis reaction. Both 13 non-infected dogs and 20 naturally infected dogs were negative for MI test, when examined with antigens prepared from adult worms and intrauterine microfilariae. Three dogs experimentally infected with *D. immitis* (98 to 121 infective larvae) and 2 non-infected controls were monitored for the kinetics of immunological responses during the course of infection. In infected dogs, both IHA and reaginic antibody productions were demonstrated throughout prepatent and patent periods of the infection. It seems likely that the marked production of these antibodies was associated with the timing of fourth larval molt and the occurrence of microfilaremia. Nevertheless, the MI tests were negative for these dogs throughout the prepatent period of the infection.

犬糸状虫寄生犬における免疫応答について

早崎峯夫・中垣和英・小林茂雄・大石 勇
東京農工大学農学部家畜内科学教室

犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* 感染に対する固有宿主(犬)の免疫応答の研究は体液性応答の研究が主体をなし、多くは自然感染犬における血清診断を目的としたもの [3, 7, 16, 26, 27] で、感染経過中の体液性抗体の動態や寄生蠕虫感染における特異的現象として知られる IgE 抗体の産生についての研究 [1, 8, 9, 13, 15, 20, 22, 29, 30] は比較的少ない。しかも、感染経過中の IgE 抗体の動態については未だ報告はない。一方、細胞性免疫応答に関しては、patent period における反応を検討した Grieve et al. [4] および Weil et al. [29] の報告をみるのみであり、感染経過中の細胞性応答の動態を追跡した報告はない。

この研究は、犬糸状虫自然感染犬および実験感染犬における細胞性免疫と体液性免疫について検討し、犬

糸状虫寄生犬における免疫応答の性状を明らかにすることを目的としている。

材料と方法

実験動物: 犬糸状虫自然感染犬は検血にて末梢血ミクロフィラリア (Mf) 陽性、または剖検にて成虫寄生を認めたもの(雑種、推定 1~10 歳)を用い、犬糸状虫未感染犬は冬期に生れ、感染期未経過の若犬(雑種、推定 3~5 カ月齢)を用いた。実験感染犬群は実験期間を通して蚊の侵入のない閉鎖式動物舎内で飼育した。

犬糸状虫感染実験: 犬糸状虫第 3 期幼虫 (L₃) は、あらかじめ末梢血 Mf 陽性犬を吸血させたトウゴウヤブカ *Aedes togoi* の吻鞘より採取した。L₃ の感染は皮

下注射にて行い、実験感染犬は感染後 277 日 (感染犬 No. 1 のみ 253 日) に剖検し、右心室・肺動脈内の虫体数を算定した。

血清: 実験感染犬群は随時採血し、分離した血清は検査時まで -40°C に保存した。

抗原: 犬糸状虫成虫および犬糸状虫子宮内 Mf より作製した。すなわち、成虫抗原は、成虫虫体を生理食塩液にて、数回洗滌後、雌雄同数の虫体に少量の磷酸緩衝液 (PBS), pH 6.4 を加えて、テフロンホモジナイザーにて乳剤にしたものを 4°C に一晩静置後、 4°C , 5,000 rpm で 30 分間遠心沈澱し、得られた上清を用いた。また Mf 抗原は、雌成虫の子宮内より採取した Mf を用いて、成虫抗原と同様の術式により作製した。

抗原蛋白濃度は Lowry et al. [14] の方法により測定した。

マクロファージ遊走阻止 (MI) 試験 (間接法): 末梢血リンパ球の分離は Conray 400-Ficoll を用いた比重遠沈法 [28] により行った。採取したリンパ球は 0.1% トリパンプルーにて生死を判定し、生存率 95% 以上のものを用いた。回収されたリンパ球の純度は 85.4% であった。

リンパ球の培養には 5% の割合で牛胎子血清 (FBS) (Flow Laboratories, Rockvill, MD) を添加した TC 199 (カナマイシン $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 含有) (日水製薬, 東京) $2.5\ \text{ml}$ (実験感染群は $1.5\ \text{ml}$) を用いた。培養液には成虫抗原, Mf 抗原および牛血清アルブミン (BA) (Nutritional Biochemical corp., Cleveland, Ohio) を添加したものと非添加のものを調整した。培養は試験管 ($10\times 105\ \text{mm}$) にて行い、培養リンパ球数は平均 6.3×10^6 ($1.0\sim 18\times 10^6$)/ ml とし、5% 炭酸ガス混合空気の下で、 37°C にて 24 時間培養後、 4°C , 1,500 rpm にて 15 分間遠心沈澱して、回収した上清を MI 試験に用いた。

正常モルモットからの腹腔滲出細胞 (PEC) の採取は、市販の健康なハートレー系モルモット (体重 230~630 g) を用いて、既報 [6] の方法により行った。PEC は 0.1% トリパンプルーにて生死を判定し、生存率 95% 以上であることを確認した。回収された PEC の 83.2% は単核細胞が占め、残りは多形核細胞であった。

MI 試験は、Harrington and Stastny [6] の Agarose droplet 法に従い、間接法にて行った。試験は重複培養にて行い、遊走比 (MR) の算出は、彼らの方

Table 1. Migration inhibition of guinea pig peritoneal exudate cells by supernatants of non-infected or naturally infected dog peripheral lymphocytes cultured with *D. immitis* antigens

| Antigen ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | Migration ratios in MI test (Mean \pm SD) | |
|-------------------------------------|---|-----------------|
| | Non-infected (n=13) | Infected (n=20) |
| A-Di 100 | 0.99 \pm 0.11 | 0.93 \pm 0.15 |
| 200 | 0.79 \pm 0.13 | ND |
| I-Mf 100 | 0.94 \pm 0.17 | 0.89 \pm 0.16 |
| BA 100 | 1.13 \pm 0.11 | 0.94 \pm 0.15 |

MI: Macrophage migration inhibition. A-Di: Adult *D. immitis*. I-Mf: Intrauterine microfilaria. BA: Bovine serum albumin. ND: Not done. SD: Standard deviation.

法 [6] によった。

末梢血 Mf 数算定: 実験感染犬は、感染後 174 日からアセトン集虫法 [18], または濃厚塗抹染色法により末梢血 $20\ \mu\text{l}$ 中の Mf を定量的に算定した。

間接赤血球凝集 (IHA) 反応: 反応用 Mf 抗原作製法および術式は既報 [7] の通りである。

受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応: ペントバルビタール全身麻酔下で、腸内寄生虫陰性の犬糸状虫未感染犬の背部および体側部をあらかじめ剪毛し、倍数希釈した被検プール血清の $0.1\ \text{ml}$ ずつを、皮内注射した。注射後 72 時間に、成虫抗原 $1\ \text{mg}$ 蛋白/kg を静注したのち、ただちに対側肢に 0.5% エバンスブルー $1\ \text{ml}/\text{kg}$ を静注した。判定は、60 分後に殺処分して剥皮し、5 mm 以上の青斑を有するものを陽性反応とした。PCA 抗体価は陽性反応の最大血清希釈倍数をもって表わした。

成 績

1. 自然感染犬における細胞性免疫応答

未感染犬 13 頭および犬糸状虫寄生犬 20 頭における MI 試験の成績は、Table 1 に示した。未感染犬群では、成虫抗原 $100\ \mu\text{g}$ 蛋白/ ml における平均 MR は 0.99 ± 0.11 であり、このうち最低値を示したのもでも 0.81 と全て 0.8 以上にあった。これに対して、同抗原 $200\ \mu\text{g}$ 蛋白/ ml における平均 MR は 0.79 ± 0.13 であり最低値は 0.59 の false positive を示すものもあった。これらの成績から、MR は 0.8 以下を MI 試験陽性とした。以後成虫抗原は $100\ \mu\text{g}$ 蛋白/ ml のみを用いることとし、他の 2 種抗原 (Mf, BA) も成虫抗原と同様にそれぞれ $100\ \mu\text{g}$ 蛋白/ ml とした。

Table 2. Worm counts and recovery rate of dogs experimentally infected with *D.immitis*

| Group | Dog No. | No. of L ₃ | Days of infection | No. of adult worms (M, F) | Recovery rate (%) |
|--------------|---------|-----------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
| Infected | 1 | 98 | 253 | 37 (17,20) | 37.7 |
| | 2 | 100 | 277 | 41 (19,22) | 41.0 |
| | 3 | 121 | 276 | 54 (30,24) | 44.6 |
| | Mean | | | 44 | 41.1 |
| Non-infected | 4 | 0 | 277 | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | 277 | 0 | 0 |

L₃: Third stage larva. M,F: Male, female.

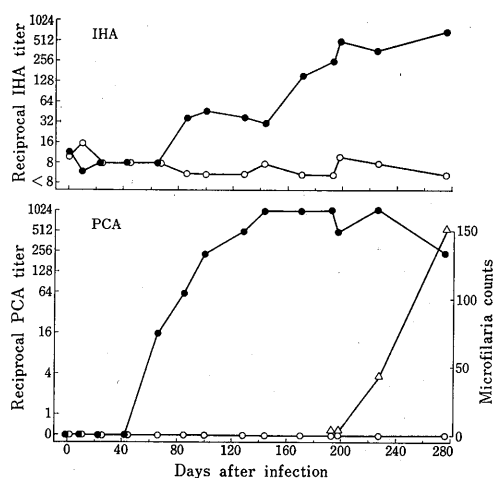


Fig. 1. Time-course development of IHA and PCA titers in sera from dogs experimentally infected with *D. immitis*.

- —●: Mean titers in infected dogs (n=3).
- —○: Mean titers in non-infected dogs (n=2).
- △ —△: Mean counts of microfilaria in 20 μ l of peripheral blood of infected dogs.

Mf 抗原においては 2 例が 0.74 を示したが、平均 MR は 0.94 ± 0.17 で陰性であった。さらに、犬糸状虫と無関係な BA に対する、平均 MR は 1.13 ± 0.11 の陰性を示した。自然感染犬群では、成虫抗原における成績は一部に 0.8 以下を示すものもあったが、平均 MR は 0.93 ± 0.15 と陰性であった。同様に Mf 抗原においても一部に 0.8 以下を示すものがみられ、しかもその例数は成虫抗原のそれより多かったが、平均 MR は 0.89 ± 0.16 の陰性を示した。BA における平均 MR は 0.94 ± 0.15 の陰性であった。

2. 実験感染犬における免疫応答

Table 3. Time-course development of migration inhibition of guinea pig peritoneal exudate cells by supernatants of experimentally infected dog peripheral lymphocytes cultured with *D. immitis* antigens

| Days after infection | Migration ratios in MI test (Mean \pm SD) | | |
|----------------------|---|-----------------------------|-------------------|
| | A-Di antigen 100 μ g/ml | I-Mf antigen 100 μ g/ml | BA 100 μ g/ml |
| 35 | 0.93 \pm 0.03 | 0.92 \pm 0.04 | 0.90 \pm 0.20 |
| 50 | 0.89 \pm 0.02 | 0.86 \pm 0.14 | 0.75 \pm 0.01 |
| 69 | 0.98 \pm 0.06 | 1.05 \pm 0.03 | 1.08 \pm 0.12 |
| 88 | 0.84 \pm 0.13 | 0.98 \pm 0.13 | 1.08 \pm 0.01 |
| 124 | 1.02 \pm 0.23 | 1.12 \pm 0.04 | 1.06 \pm 0.12 |
| 141 | 0.93 \pm 0.02 | 0.95 \pm 0.10 | 0.96 \pm 0.13 |
| 187 | 1.05 \pm 0.04 | 1.02 \pm 0.06 | 1.03 \pm 0.01 |

MI: Macrophage migration inhibition. A-Di: Adult *D. immitis*. I-Mf: Intruterine microfilaria. BA: Bovine serum albumin. SD: Standard deviation.

実験感染犬群における虫体回収成績は Table 2 に示した。これら実験感染犬群における IHA 抗体の推移は Fig. 1 に示した。抗体価は、感染後 65 日から 100 日にかけて、および 142 日から 197 日にかけて急増する傾向を示しながら、全体的に漸増した。これに対して、対照犬は実験期間を通して一貫して抗体価 1:16 以下であった。レアギン抗体 (Fig. 1) は、感染後 65 日に初めて検出され、以後急激に上昇し、197 日に 1:512 を示したことを除いて、142 日より 225 日まで 1:1024 の高抗体価を維持し、275 日においてもなお 1:256 の抗体価を示した。これに対して、対照犬は実験期間を通して一貫して PCA 反応陰性であった。

MI 試験の成績は Table 3 に示した。すなわち、成虫抗原、Mf 抗原、BA のいずれに対しても感染後

187日まで陰性であった。

末梢血 Mf は、感染後 192 日に陽転し、以後急速に増数した (Fig. 1)。

考 察

フィラリア感染に対する宿主の細胞性免疫応答の研究は、*Wuchereria bancrofti* 感染 [5, 21], *Brugia pahangi* 感染 [23-25, 32], あるいは *Dipetalonema viteae* 感染 [2, 31] などについての報告がみられ、感染宿主には、げっ歯類 [2, 23, 24, 31, 32], 人 [5, 21], および猫 [25] などが用いられている。しかし、犬糸状虫感染に対する犬の細胞性免疫応答は、Grieve et al. [4] および Weil et al. [29] の, patent period におけるリンパ球幼若化試験による検討をみるにすぎず, prepatent period における免疫応答の態度など, 未だ不明の点が少なくない。

本実験の成績からみる限り, 犬の細胞性免疫応答は, 実験感染犬群, 自然感染犬群のいずれも, MI 試験陰性であったことから, prepatent および patent period における細胞性免疫応答は微弱である可能性が考えられた。なお, 被検自然感染犬はその多くが大学付属家畜病院の患畜であるため, 成虫保有数を算定することはできなかったが, 実験感染犬における平均保有虫体数 44 匹は, 自然状況下における犬糸状虫感染犬におけるそれ [17] の約 4 倍多いものであり, このような実験感染犬の細胞性免疫応答が, 感染後 187 日までの観察期間を通して, 一貫して陰性であったことは興味深い。また Weller [32] は *B. pahangi* 感染ラットのリンパ球幼若化試験において発育ステージが異なる虫体抗原間では, 試験成績が大きく異なることを示しているが, 本実験では成虫抗原と Mf 抗原の間の MI 試験成績に有意差は認められなかった。このように細胞性免疫応答が微弱であった理由としていくつかの可能性が考えられる。まず, 細胞性免疫応答が局所的に働いている可能性が考えられる。Grieve et al. [4] は, 末梢血リンパ球を用いたリンパ球幼若化試験は陰性であったが, 脾細胞や肺門リンパ節細胞では陽性であったと述べており, 局所的な細胞性免疫応答の可能性を示唆している。つぎに, 犬糸状虫感染に対する犬の細胞性免疫応答が抑制されている可能性が考えられる。Grieve et al. [4] および Weil et al. [29] は, いずれも犬糸状虫抗原に対するリンパ球幼若化は認められなかったという。しかし, マイトゲンに対しては, 前者は, 実験群に有意な抑制が認められたと述べ

ているのに対し, 後者は, むしろ実験群, 対照群ともに同程度の幼若化を示したという。一方, フィラリア感染宿主では免疫応答が抑制されているとする報告は, 犬糸状虫感染以外にも, *B. pahangi* 感染 [23, 32], *W. bancrofti* 感染 [5, 21] および *D. viteae* 感染 [2, 31] について, 人, げっ歯類で認められている。しかしながら, これらの報告によれば prepatent period における免疫抑制は一時的であり, 必ずしも一貫して認められてはいない。本実験の成績では, 感染後 35 日以前の MI 反応は不明であるが, prepatent period と patent period ともに陰性であったことは, *D. immitis* 感染による宿主の免疫抑制を考える上で重要な示唆を与えるものと考えられる。従って, 今後は, 感染直後から patent period までを詳細に検討し, このような抑制が *D. immitis* 感染に及ぼす意義について検討する必要があると考えられる。第 3 に, MI 試験が一貫して陰性であったことは, MI 試験法の鋭敏性が低いためであるのかも知れない。従って, MI 試験以外の測定法によっても検討する必要がある。第 4 に培養したリンパ球数に幅があったことが, MR に影響しているのかも知れない。従って, できるだけリンパ球数を一定にさせることが必要であろう。

一方, 体液性免疫応答においては, IHA 抗体, レアギン抗体ともに第 4 脱皮期と末梢血 Mf 陽転時期に, 著明に産生される傾向が認められた。なお, 平均 IHA 抗体価は, 感染後 225 日 (3 頭平均) より 276 日 (2 頭平均) の方が高値を示したが, これは検査頭数が減少したためで, 実際には 2 頭の個別の IHA 抗体価は 225 日より 276 日の方がともに低値であった。なお, 自然感染犬における IHA 抗体やレアギン抗体産生については, 今回検討しなかったが, 既にいくつかの報告 [3, 7, 13, 26] があり, IHA 抗体については, 常に高抗体価 (時に 1:16,384 以上) の抗体産生が認められており, レアギン抗体についても, 比較的高い (時に 1:256) 抗体産生が認められている。これらの成績から, 犬糸状虫感染に対する犬の免疫応答は, prepatent および patent period ともに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が微弱である可能性が考えられる。

これに対して, 非固有宿主のモルモットを犬糸状虫抗原で免疫した場合には, 著明な細胞性免疫応答を示すことが知られている [10-12] ことから, 従来, 犬糸状虫の感染が極めて低率に認められるかあるいは全く感染しないという猫 [19], 猿 [33], およびげっ歯類

[34, 39] において、どのような細胞性免疫応答がみられるかを MI 試験によって検討してみることも必要であろう。なぜなら、Yoshimura et al. [35-38] は固有宿主（ラット）と非固有宿主（モルモット）において、*Angiostrongylus cantonensis* 感染に対する免疫応答を検討したところ、ラットでは抗体産生が主体をなし、逆にモルモットでは抗体産生は微弱であるが、細胞性免疫応答の発現はラットより顕著であり、固有宿主と非固有宿主の間の免疫応答には差異が認められることを報告しているからである。

以上のことから、犬糸状虫感染についても固有宿主における細胞性免疫応答の局在性の可能性、あるいは細胞性免疫応答抑制の詳細、ならびに免疫学的諸特徴と虫体の生存のメカニズムなどについての検討が、今後必要になると思われる。

要 約

犬糸状虫感染に対する犬の免疫応答をマクロファージ遊走阻止 (MI) 試験 (間接法)、間接赤血球凝集 (IHA) 反応、受身皮膚アナフィラキシー反応により、検討した。犬糸状虫成虫抗原と子宮内マイクロフィラリア (Mf) 抗原を用いた MI 試験の結果、犬糸状虫未感染犬群 13 頭と自然感染犬群 20 頭の成績は陰性であった。犬糸状虫実験感染犬 3 頭 (感染子虫数 98~121 匹) および未感染対照犬 2 頭の感染経過中における免疫応答の動態についても検討した。感染犬では、IHA 抗体、レアギン抗体ともに実験期間を通して産生され、特に著明な増加は、第 4 脱皮期と末梢血 Mf 陽性時期に関連している可能性が認められた。それにもかかわらず、prepatent period における MI 試験は陰性であった。

文 献

- [1] Allain, D. S., Kagan, I. G., and Schlotthauer, J. C. (1972). Serologic studies on dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. In *The Current Knowledge of Canine Heart Worm Disease*, Bradley, R. E., editor, Univ. of Florida, Gainesville, Florida, 69-75.
- [2] Dalesandro, D. A., and Klei, T. R. (1976). Evidence for immunodepression of Syrian hamsters and Mongolian jirds by *Dipetalonema viteae* infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **70**, 534-535.
- [3] Fujita, K., Tanaka, H., Sasa, M., Shichinohe, K., Asai, Y., and Kurokawa, K. (1970). Cross-reaction among filarial species in hemagglutination test. *Jpn. J. Exp. Med.* **40**, 67-77.
- [4] Grieve, R. B., Gebhardt, B. M., and Bradley, R. E. (1979). *Dirofilaria immitis*: Cell-mediated and humoral immune responses in experimentally-infected dogs. *Int. J. Parasitol.* **9**, 275-279.
- [5] Grove, D. I., and Forbes, I. J. (1979). Immunosuppression in bancroftian filariasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **73**, 23-26.
- [6] Harrington, J. T., Jr., and Stanstny, P. (1973). Macrophage migration from an agarose droplet: Development of a micromethod for assay of delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* **110**, 752-759.
- [7] Hayasaki, M. (1981). Indirect hemagglutination test for diagnosis of canine filariasis. *Jpn. J. Vet. Sci.* **43**, 21-26.
- [8] Hayashi, S., Yamamoto, H., Wakai, Y., and Hirano, S. (1972). Immunological studies on filariasis: Reaginic antibodies in the dogs infected with *Brugia pahangi* or *Dirofilaria immitis* as revealed by passive cutaneous anaphylaxis (PCA). Japan-U.S. cooperative Medical Science program, Abstracts of Joint Conference on Parasitic Diseases, 28-31.
- [9] Hsu, C. K., Melby, E. C., Jr., and Farwell, A. E., Jr. (1974). Demonstration and interspecies cross-sensitization of reaginic antibodies in dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**, 619-624.
- [10] Kobayakawa, T., and Ishiyama, H. (1974). Delayed hypersensitivity to *Dirofilaria immitis*. II. Blast transformation test. *Jpn. J. Parasitol.* **23**, 226-231.
- [11] Kobayakawa, T., Ishiyama, H., and Senda, F. (1973). Delayed hypersensitivity to *Dirofilaria immitis*. I. Migration inhibition test. *Jpn. J. Parasitol.* **22**, 369-374.
- [12] Kobayakawa, T., Kobayashi, T., and Ishiyama, H. (1974). Delayed hypersensitivity to *Dirofilaria immitis*. III. The *in vitro* cytotoxic activity of sensitized lymphocytes and their effect upon the mortality of microfilariae in diffusion chambers implanted intraperitoneally into guinea pigs. *Jpn. J. Parasitol.* **23**, 300-305.
- [13] 小林瑞穂・岩間 昭・大友弘士・伊藤 清・平賀千兼 (1974). イヌ糸状虫 (*Dirofilaria immitis*) 自然感染犬におけるレアギン様抗体. 岐阜大学医学部紀要 **22**, 385-391.
- [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] Mantovani, A., and Kagan, I. G. (1967). Fractionated *Dirofilaria immitis* antigens for the differential diagnosis of canine filariasis. *Am. J. Vet. Res.* **28**, 213-217.
- [16] Mantovani, A., and Sulzer, A. J. (1967). Indirect fluorescent antibody technique for diagnosis of canine filariasis. *Am. J. Vet. Res.* **28**, 351-354.
- [17] 大石 勇・小林茂雄・久米清治 (1958). 犬糸状虫の寄生状態について. 日獣会誌 **11**, 10-12.
- [18] 大石 勇・小林茂雄・久米清治 (1959). 犬糸状虫症の診断に関する研究. III. 子虫のアセトン集虫法. 日獣会誌 **12**, 149-153.
- [19] 大石 勇・小林茂雄・久米清治 (1965). 犬糸状虫の猫・犬への寄生適応性に関する研究. 日獣誌 **27**, 407.
- [20] 大石 勇・小林茂雄・久米清治・河野 恵・沢田利貞 (1961). 犬糸状虫症の診断に関する研究. IV. 皮内反応について. 日獣会誌 **14**, 277-282.
- [21] Ottesen, E. A., Weller, P. F., and Heck, L. (1977). Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis. *Immunology* **33**, 413-421.
- [22] Pacheco, G. (1966). Progressive changes in certain serological responses to *Dirofilaria immitis* infection in the dog. *J. Parasitol.* **52**, 311-317.
- [23] Portaro, J. K., Britton, S., and Ash, L. R. (1976). *Brugia pahangi*: Depressed mitogen reactivity in filarial infections in the jird, *Meriones unguiculatus*. *Exp. Parasitol.* **40**, 438-446.
- [24] Portaro, J. K., Kowalski, J. C., Howell, C., and Ash, L. R. (1977). Use of lymphocyte transformation for the detection of filarial infections. *J. Parasitol.* **63**, 172-174.
- [25] Rogers, R., Denham, D. A., Nelson, G. S., Guy, F., and Ponnudurai, T. (1975). Studies with *Brugia pahangi*. III. Histological changes in the affected lymph nodes of infected cats. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **69**, 77-84.
- [26] Shichinohe, K., Tagawa, M., Kurokawa, K., Fujita, K., and Tanaka, H. (1973). Studies on the diagnosis of canine filariasis with special reference to the comparison of hemagglutination test and skin test. *Jpn. J. Vet. Sci.* **35**, 1-10.
- [27] Tanaka, H., Fujita, K., Sasa, M., Tagawa, M., Naito, M., and Kurokawa, K. (1970). Cross-reactions in complement fixation test among filaria species. *Jpn. J. Exp. Med.* **40**, 47-58.
- [28] 辻 公美 (1971). 比重遠沈法によるリンパ球の分離, Conray 400-Ficoll 法. 免疫実験操作法, 日本免疫学会編, 265-268.
- [29] Weil, G. J., Ottesen, E. A., and Powers, K. G. (1981). *Dirofilaria immitis*: Parasite-specific humoral and cellular immune responses in experimentally infected dogs. *Exp. Parasitol.* **51**, 80-86.
- [30] Weiner, D. J., and Bradley, R. E. (1973). The 2-mercaptoethanol labile immunoglobulin response of beagles experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *J. Parasitol.* **59**, 696-700.
- [31] Weiss, N. (1978). *Dipetalonema viteae*: *in vitro* blastogenesis of hamster spleen and lymph node cells to phytohemagglutinin and filarial antigens. *Exp. Parasitol.* **46**, 283-299.
- [32] Weller, P. F. (1978). Cell-mediated immunity in experimental filariasis: Lymphocyte reactivity to filarial stage-specific antigens and to B- and T-cell mitogens during acute and chronic infection. *Cell. Immunol.* **37**, 369-382.
- [33] Wong, M. M. (1974). Experimental dirofilariases in macaques. Susceptibility and host responses to *Dirofilaria immitis*, the dog heartworm. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **68**, 479-490.
- [34] Wong, M. M., and Lim, K. C. (1975). Development of intraperitoneally inoculated *Dirofilaria immitis* in the laboratory mongolian jird (*Meriones unguiculatus*). *J. Parasitol.* **63**, 573-574.
- [35] Yoshimura, K., Aiba, H., Hayasaki, M., and Yoshida, H. (1976). Delayed hypersensitivity responses of guinea pig and rat to *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Jpn. J. Vet. Sci.* **38**, 579-593.
- [36] Yoshimura, K., and Soulsby, E. J. L. (1976). *Angiostrongylus cantonensis*: Lymphoid cell responsiveness and antibody production in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **25**, 99-107.
- [37] Yoshimura, K., and Yamagishi, T. (1975). Immunologic response of guinea pigs to infection with *Angiostrongylus cantonensis*. *Jpn. J. Vet. Sci.* **37**, 585-591.
- [38] Yoshimura, K., and Yamagishi, T. (1976). Reaginic antibody productions in rabbits and rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Jpn. J. Vet. Sci.* **38**, 33-40.
- [39] Zielke, E. (1977). Preliminary studies on the transplantation of adult *Dirofilaria immitis* into laboratory rodents. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **71**, 243-244.