

幼虫移行症に関する研究——待機宿主内犬蛔虫幼虫の感染能と感染ラット血清抗体の推移——

井 上 洋 子

広島大学医学部寄生虫学教室 (主任:辻 守康教授)

受付 昭和 62 年 9 月 1 日

犬蛔虫 (*Toxocara canis*) の虫卵及び待機宿主である鶏より得た幼虫をラットに投与し, その感染能及び宿主に産生される抗体の推移を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により比較検討した。

1) 虫卵を鶏に投与した場合, 21~25日間培養卵では1~10日後で5~18%, 31日後で1.7%の感染率を示した。

2) 鶏より得た幼虫をラットに感染した場合, 幼虫投与1~3日後には, 胃壁, 肝臓, 肺に多く存在し, 10日後には脳及び筋肉内にも認められ, その感染率は1~2日後で10~19%, 10~31日後で2~4%であった。

なお1ヶ月後の幼虫の大きさは $391 \sim 468(442) \times 20.0 \sim 20.6(20.3) \mu\text{m}$ であった。

3) ELISA によりラット血清中の特異 IgG 抗体価の推移を検討した結果, 虫卵投与群及び幼虫投与群とも投与1週より抗体が産生され始め, 15~18週で最高値を示し, 26.5週後まで陽性を持続していた。

4) 成虫, 幼虫, 虫卵の三種抗原のうち陰性と陽性の差が明確であったのは, 幼虫抗原, 成虫抗原, 虫卵抗原の順で, ELISA 用抗原としては, 幼虫抗原を使用することが好ましいと判断された。

以上の成績から, 従来より知られている虫卵摂取という経路以外にも鶏などの待機宿主内の幼虫を摂取することにより, 犬蛔虫の感染が成立するという経路が実験的に明らかとなった。

Key words: Paratenic host, *Toxocara canis*, Infectivity, Enzyme-linked immunosorbent assay, Larva migrans

人以外の動物を固有宿主とする寄生虫の感染型が人に侵入した場合, 人の体内で成虫にまで発育することができず幼虫のまま体内を移行して, 組織の損傷や炎症を惹起し好酸球増多やアレルギー反応など種々の症状を呈することは知られている。この様な症候群を幼虫移行症 (Larva migrans) と称することを Beaver et al¹⁾ (1952) が提唱して以来現在まで多くの報告があるが, 特に犬蛔虫幼虫などの場合には幼虫が, 肝・肺・脳・脊椎・眼・筋肉など深部の臓器や組織に移行するので, 内臓幼虫移行症 (Visceral larva migrans: VLM) と呼ばれるようになっていく。吉田²⁾ (1987) によればこの犬蛔虫症は米国を中心に世界で数百例報告されており, 我が国では目下確実な症例は5例であるが実際にはもっと多いものと思われると述べている。近年はペットブームで犬, 猫との接触の機会が多く, 事実当教室における血清検査でも年間30~40例の陽性者が認められ, 犬蛔虫症あるいは猫蛔虫症が疑わ

れる症例に遭遇することも多い。また最近伊藤ら¹⁰⁾ (1986) は新しい感染経路として, 鶏肝や牛肝の生食により発症したと考えられる内蔵幼虫移行症例を報告している。

そこで今回鶏を待機宿主とした場合, その体内で孵化した犬蛔虫幼虫が如何なる感染能を有しているかラットを用いて実験的に検討し, かつ宿主血清中に産生される特異抗体を ELISA にて測定したので報告する。

材料及び方法

I 待機宿主内犬蛔虫幼虫の感染能

1) 犬蛔虫虫卵の採取と培養

広島市保健所より入手した生後2~3ヶ月の幼犬の腸管より採り出した犬蛔虫雌成虫を生理食塩水で洗浄後, EAGLE (GIBCO) 液または生理食塩水を入れた100 ml ビーカーで 30°C の恒温器内で飼育し産卵を続けさせた。産出された虫卵は, 生理食塩水中で同様

に培養した。

なお上記の溶液はすべて滅菌し 100 U/ml ペニシリンGと 100 µg/ml 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓) を加えて使用し, 溶液は毎日交換した。

2) 実験動物及び感染方法

実験動物としては, 鶏の雄雛 (DEKALB XL-LINK, アキタ産業) と Wistar 系ラット雄 200 g 前後を用いた。

投与虫卵の培養日数は, 培養14~16日目まで既に感染能を有し100日後まで維持する (石井⁷⁾ 1959 a; 近藤¹⁴⁾ 1970) ことや28日間培養卵を用いた Mossalam et al¹⁸⁾ (1972) の報告に準じて21~52日間培養卵を用い, 投与数は, Mossalam et al¹⁸⁾ (1972) や Koizumi et al¹³⁾ (1983) の報告に準じた。虫卵数の測定は実体顕微鏡下で行い, 必要量を数えた後ゾンデを用いて鶏の嚙嚢内に直接投与した。なお鶏よりの幼虫のラット内投与法は, 虫卵投与4日後の鶏の肝臓及び肺を0.5% ペプシン液で1時間消化後生理食塩水で洗浄し, 1,000 rpm 10分間遠心分離した沈渣中に含まれる総幼虫数を算出して必要量をラットの胃内にゾンデを用いて投与した。

3) 宿主内幼虫の観察

鶏及びラットはエーテルで屠殺した後, 消化管, 肝臓, 肺, 脳, 筋肉などの各臓器内幼虫の有無を調べた。胃, 小腸, 盲腸などの消化管はハサミで縦方向に切り, 内容物は水で洗いながらビーカー内に入れ数回自然沈澱させて観察し, 腸粘膜は指でこすりとりそのままスライドグラス上で圧平して検鏡し, 腸壁は 0.5% ペプシン液 (ペプシン (1:10,000) 0.5 g, 塩酸 0.7 ml, 蒸留水 100 ml) で 37°C 1~2時間消化後数回自然沈澱させ, 1,000 rpm 10分間遠心した沈渣をすべて40倍で検鏡した。なお幼虫の体長と体幅はマイクロメーター (×100) で計測した。

II 感染ラット血清抗体の推移

1) 犬蛔虫感染ラット血清

虫卵投与群 (C): 38~41日間培養卵をラット1匹当たり約2,200個ずつ6匹 (C1~6) に投与した。

幼虫投与群 (A, B): 28~37日間培養卵を体重 50 g 前後の鶏の雛1匹当たり, 7,000個ずつ70匹に投与し, 4日後に剖検して採り出した肝臓を消化後得られた幼虫を約2,200虫ずつラット7匹 (A1~3, B1~4) に投与した。

各群とも経時的に眼窩静脈より採血し, 血清分離後使用時まで -20°C に保存した。

2) 抗原の作製

成虫 (A), 幼虫 (L), 幼虫包蔵卵 (E) の各抽出物を

抗原とした。

成虫の全虫体は細片後, 0.1% 食塩水で6~8回凍結融解して磨砕抽出した。幼虫は31~35日間培養した幼虫包蔵卵より近藤ら¹⁵⁾ (1981) の方法で採取し, ホモジナイザーを用い1/30M PB-0.15 M NaCl (pH 7.2) 中で磨砕後, 20KHz, 115w で20分間超音波発生装置 (TOMY SEIKO) で破壊し, 4°C 24時間攪拌しながら抽出した。幼虫包蔵卵も幼虫と同じ方法で抽出し, それぞれ 15,000 rpm 30分間冷却遠心し, 上澄液を透析後凍結乾燥して抗原とした。

3) 酵素抗体法 (ELISA)

標識抗体と基質: 標識抗体は, ペルオキシターゼ結合抗ラット IgG (H+L) ウサギ血清 (第一化学薬品) を用いた。基質は, O-phenylenediamine:OPD (半井化学) を用い, 中尾ら¹⁹⁾ (1981) の方法に準じて作成した。即ち OPD 10 mg を 1 ml のメタノールに溶解して蒸留水 99 ml を加え, 使用直前に 3% H₂O₂ 100 µl を加えて調整した。

ELISA の手技: Fig. 1 に示す如くである。即ち抗原は Lowry et al¹⁷⁾ (1951) の方法で蛋白定量を行って

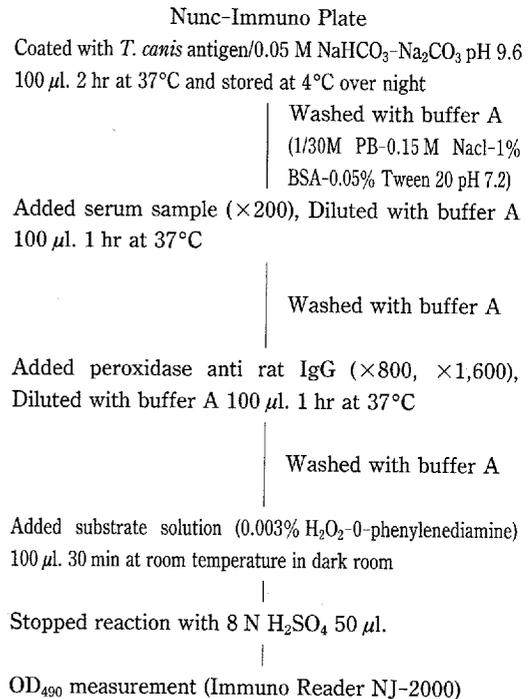


Fig. 1. Method for ELISA

た後、0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で調整した。なおラット血清は予備試験により至適と思われた200倍希釈血清を実験に供した。まず抗原液 100 μ l を Nunc Immunoplate (96F) に入れ 37°C で2時間更に 4°C で一夜コートし、2回洗浄後3回目は30分放置して洗浄液を除去後、200倍希釈したラット被検血清 100 μ l を加え 37°C で1時間反応させ、洗浄後希釈した標識抗体 100 μ l を加え、37°C 1時間更に反応させた。洗浄後 OPD 100 μ l を加え室温で30分間暗室に静置し、8 N H₂SO₄ 50 μ l で反応停止した。直ちに Immuno Reader NJ-2000 (Inter Med) で490 nm における吸光度 (OD₄₉₀) を測定した。

被検血清、標識抗体の希釈及び洗浄には、1/30M PB-0.15 M NaCl-1% BSA-0.05% Tween 20, 0.025% Merthiolate Sodium, pH 7.2 (Buffer A) を用い、洗浄は3回ずつ行った。なお陽性対象 (P. con) 血清は、ラットに幼虫包蔵卵2,000個を投与し32日後に剖検して147匹の幼虫を確認した血清を用いた。

ELISA 力価の測定は duplicate で行い、被検血清の OD 値の平均 (X) よりブランク (血清のかわりに Buffer A のみ) の OD 値 (B) を減じた OD₄₉₀ の値 (X-B) をそのまま表わすか、あるいは陰性対照 (N. con) 血清の OD₄₉₀ の値 (N-B) に対する (X-B) との比 (以下 X/N と略) で表わした。

4) Ouchtelony

辻³⁵⁾ (1974) の方法の一部を改変して行った。即ちペロナール緩衝液 (pH 8.2) に溶解した 0.9% agarose (Behring Werke) を支持体とし、抗原 10 mg を 0.1 ml の蒸留水に溶かしたものを溝に入れ、経時的に採血した血清をそれぞれ穴に入れて反応させた。

実験結果

I 待機宿主内犬蛔虫幼虫の感染能

A 犬蛔虫成虫の飼育と虫卵の発育態度

1) 飼育液中の成虫生存力と産卵能

成虫5匹ずつを 60 ml の EAGLE 液または生理食塩水に入れ、30°C にて飼育した。

EAGLE 液中の成虫は少なくとも6日間は虫卵を産出し続けその後も生存していたが、生理食塩水中のものは4日間は虫卵を産出したが、以後虫卵数は激減し虫体も弱まり死亡するものが多くなった。また EAGLE 液で飼育する方が産卵数が多く、雌1匹当りの1日の産出虫卵数は約30,000個であると算出された。

従って今後の感染実験には、EAGLE 液で飼育した成虫より産出された虫卵を用いた。

2) 虫卵の発育態度

飼育液中に産出された虫卵を、その後生理食塩水で培養し発育態度を調べた。

EAGLE 液で産出された虫卵は、培養2日目まで単細胞から2分裂へ、3日目で桑実期へと発育し、5日目ではほとんど蝌蚪期となり虫卵内には幼若幼虫が形成され始め、以後6~7日ではほぼ幼虫包蔵卵となった。

B 犬蛔虫幼虫包蔵卵及び鶏肉幼虫の感染能

1) 幼虫包蔵卵の鶏に対する感染能と感染部位

生後7日前後から2ヶ月弱の鶏 (60~600g) 1匹当り500~4,000個の虫卵を投与し1~31日後まで Table 1 の如く随時剖検した。Table 中 ca. と印したものは、一定量の浮遊液中の幼虫を数え、それをもとに全幼虫数を算出したものである。なお投与虫卵数が500~4,000と異なるのは予備実験で感染後の日数が長い程検出率の低下が認められ、500個投与では幼虫の検出が困難であったためである。

21~25日間培養卵を投与した場合の幼虫検出率は、1~10日後で4.8~18.0%、31日後で1.7%となり、寄生部位は虫卵投与後の経過日数には関係なく、ほとんどが肝臓内に認められ肺にも若干存在し、脳、筋肉、腸内にも、稀に認められた。なお鶏体重 1g 当り6~333個の虫卵を投与したことになるが、宿主である

Table 1. Distribution of larvae in chickens infected with *T. canis* embryonated eggs

Days after infection	No. of eggs administ.	No. of larvae recovered					
		Liver	Lung	Brain	Muscle	Intestine	Total (%)
1	500	23	0	0	1	0	24 (4.8)
3	500	88	2	0	0	0	90 (18.0)
5	1,000	92	2	0	0	3	97 (9.7)
10	2,000	ca. 200	0	0	0	0	ca. 200 (10.0)
31	4,000	64	0	1	1	0	66 (1.7)

Table 2. Distribution of larvae in rats infected with *T. canis* larvae obtained from chickens organs

Days after infection	Mean No. of larvae administ. per rat (ca.)	Mean No. of larvae recovered													Total (%)						
		Stomach			Small intestine						Caecum	Colon and Rectum	Liver	Lung		Brain	Muscle	Abdominal cavity			
		C.	M.	W.	Upper			Lower			C.	W.	C.	W.							
1	700	0	0	23	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	28	17				0	72(10.3)
2	835	19	27	37.5	1	0	2	1.5	0.5	0.5	0	0.5	0	0.5	24	42	[Heart 0.5, Kidney 0.5]	1		1	158(18.9)
10	835	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	17	5.5	6.5		0	34(4.1)
20	835														0.5	9	5	5.5			20(2.4)
31	627														0	5	6.3	3.7			15(2.4)

C: contents, M: mucosa, W: wall

鶏はすべて元気に発育し死亡する例はなかった。

2) 鶏内幼虫のラットに対する感染能

虫卵を投与した鶏の体内で生育している幼虫のうち感染4日後に肝臓及び肺より集めた幼虫を、ラット1匹当たり約600~800虫感染させ剖検して幼虫の有無を調べた。幼虫投与数と検出数はラット1匹当たりの平均数(mean)で表わし Table 2 に示したが、幼虫投与数は一定量の浮遊液中の幼虫を数えそれをもとに全幼虫数を算出したものである。

幼虫感染1~2日後の検出率は10.3~18.9%と高く、10日後で4.1%, 20日~31日では2.4%と低下した。

これらの幼虫の寄生部位は Table 2 に示す如く、2日以内では胃に残存している幼虫は検出された総幼虫数の32~53%を占めているが、1日後でも既に39%

が肝臓に、24%が肺に移行しており、虫卵を投与したラットの場合の1日後では肝臓に7%, 肺に2%, 2日後で肝臓に25%, 肺に5%, 残りは小腸に残存するという著者の予備実験に比べると移行の速度及び寄生部位に若干の差異が認められた。10日後からは脳にも検出され、その後1ヶ月までの移行部位は肺、脳、筋肉内に認められた。

C 待機宿主内犬蛔虫幼虫の体長と体幅

虫卵及び鶏肉幼虫投与後のラット内で生育した幼虫の体長と体幅の変化は Table 3 の如くである。即ち虫卵投与の場合には、1~31日後まで平均で391~430×15.8~19.8 μm であり、幼虫投与の場合には、405~515×18.0~22.7 μm であって、幼虫投与の場合の方がやや大きいと思われる。なお、28日間培養した虫卵より人工的に脱殻させて得られた幼虫の大きさは396~426×14.9~19.8 μm であって、ラット体内より得られた幼虫とあまり大差はなかった。

II 感染ラット血清抗体の推移

1) 抗原の至適濃度と ELISA 力価

A抗原, L抗原, E抗原に対する抗体価の比較を行う為、P. con 血清を200倍希釈し標識抗体は400倍に希釈して ELISA を行った。

三種抗原による OD 値を比較すると Fig. 2 に示す如く A 抗原が他の2抗原に比し何れの濃度においてもその値は高く、A (△印) では 5 μg/ml, L (○印) と E (□印) では 20 μg/ml の濃度ではほぼ最高値を示した。従って以後はこの抗原濃度で実験を行った。なおこの場合の標識抗体は OD 値より A で1,600倍, L と E では800倍希釈が至適であった。

2) 三種抗原の抑制試験

各抗原の特異性を調べる為、 2×10^{-3} μg/ml ~ 2×10^2 μg/ml の抗原液に等量の100倍希釈した P. con 血清を加え、37°C 3時間 incubate し 4°C で一夜静置

Table 3. Length and width of larvae recovered in rats

Days after infection	Length Range (mean)	Width Range (mean) (μm)
Larvae in rats after infection with embryonated eggs		
1	371-391 (391)	15.5-16.0 (15.8)
3	422-453 (430)	15.8-17.8 (16.8)
20	391-432 (412)	17.5-20.6 (19.1)
31	391-453 (417)	17.8-21.0 (19.8)
Larvae in rats after infection with larvae obtained from chickens		
1	412-435 (430)	21.8 (21.8)
2	361-433 (405)	17.0-19.0 (18.0)
10	465-515 (515)	20.0-22.7 (22.7)
31	391-468 (442)	20.0-20.6 (20.3)
Larvae from eggs incubated for 28 days		
	396-426 (411)	14.9-19.8 (17.4)

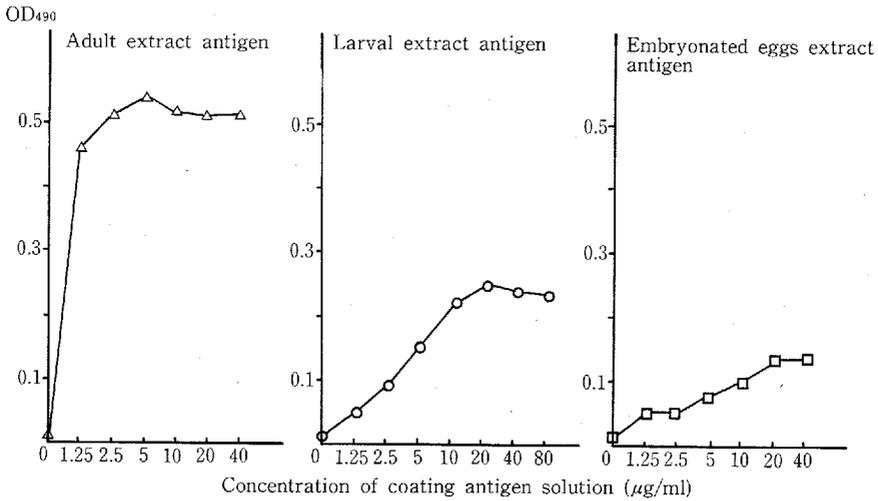


Fig. 2. Determination of the optimal concentration of *T. canis* antigen for ELISA
 Positive control serum dilution: $\times 200$
 Conjugate (Peroxidase anti rat IgG) dilution: $\times 400$

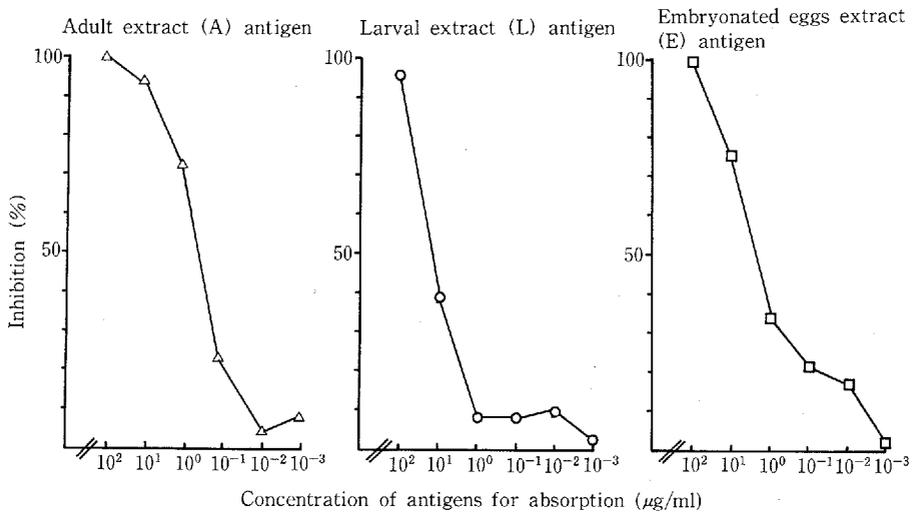


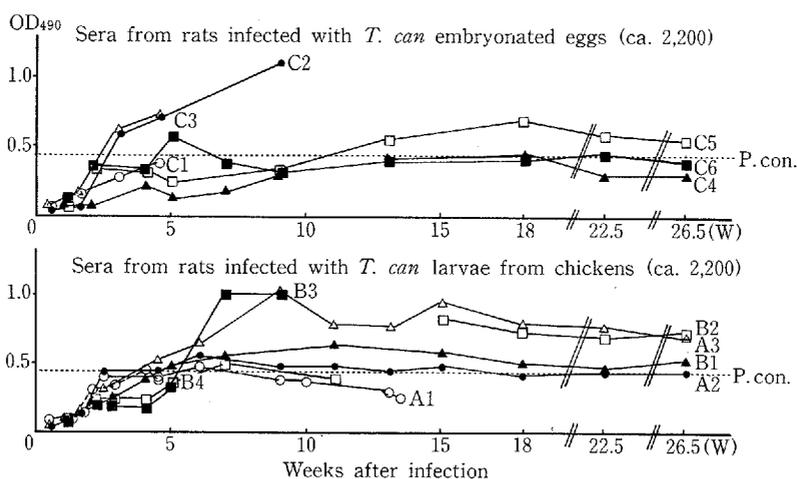
Fig. 3. Inhibition test of ELISA by *T. canis* antigen
 Serum dilution: $\times 200$
 Conjugate dilution: $\times 1,600$ (A), $\times 800$ (L, E)

した。抗原吸収後の血清 100μl を使用して、あらかじめ各抗原でコートしたプレートに注入し ELISA を行った。その結果 Fig. 3 に示す如く、0.1 μg/ml の

時はAで23%、Lで8%、Eで22%の抑制を示し、10 μg/ml の時はAで93%、Lで39%、Eで76%であって、三種抗原とも抗原量が多い程強い抑制が認められた。

Table 4. Distribution of larvae in rats after infection with *T. canis* (eggs or larvae)

Months after infection	Rats No.	No. of larvae								Total (%)
		Liver	Lung	Brain	Muscle	Kidney	Heart	Spleen	Caecum wall	
Larvae in rats after infection with embryonated eggs (ca. 2,200)										
1	C1	5	156	18	48	2	0	0	5	234(10.6)
2	C2	1	43	7	17	1	0	0	2	71(3.2)
6	C4	25	89	27	45	0	1	0	1	188(8.5)
Larvae in rats after infection with larvae obtained from chickens (ca. 2,200)										
1	B4	5	49	19	69	0	2	0	0	144(6.5)
2	B3	2	50	23	18	2	0	0	1	96(4.4)
3	A1	1	25	13	15	0	0	0	0	54(2.5)
6	A2	3	58	8	41	2	0	0	1	113(5.1)

**Fig. 4.** Changes of antibodies titers in ELISA with adult antigenAntigen: *T. canis* adult extract (5 µg/ml)

Rats sera dilution: ×200

Conjugate (Peroxidase anti rat IgG): ×1,600

なお50% inhibition に要する抗原量は, A で 0.5 µg/ml, L で20 µg/ml, E で4 µg/ml であった。

3) A 抗原に対する ELISA 力価と Ouchterlony 反応

幼虫包蔵卵 (C1~6) と鶏肝内幼虫 (A1~3, B1~4) をラットに投与して産生される抗体の推移を示したのが Fig. 4 及び Fig. 5 である。

なお本実験に用いたラットにおける幼虫検出数は Table 4 に示す如く, 虫卵投与1ヶ月 (C1), 2ヶ月

(C2), 6ヶ月 (C4), 及び幼虫投与1ヶ月 (B4), 2ヶ月 (B3), 3ヶ月 (A1), 6ヶ月 (A2) 後で54~234匹であり, 全体の感染率は約2.5~10.6%であった。検出された部位は, 肺, 筋肉に多く, 次いで脳, 肝臓に見出され, その他の臓器にも若干検出された。

A 抗原 (5 µg/ml) での ELISA の結果は Fig. 4 の如く, 上段の虫卵投与群と下段の幼虫投与群では多少の個体差は認められるものの, 幼虫投与群の方が特異的 IgG 抗体価が高い傾向が認められ, OD 値の平均

でみると *P. con* 血清が0.437の時4.5週後よりこれを上回り、9週、15週後で0.7以上の高値を示し、6ヶ月後の26.5週後でも0.591の値が得られている。

A抗原 (10 mg/0.1 ml) で Ouchterlony を行くと Fig. 5 の如く、B2のラットで幼虫投与7~26.5週まで、B3のラットで3~9週にかけて沈降帯を認めたが、他の5匹では陰性であった。また虫卵投与群でも

C6のラットのみ7~18週にかけて陽性であった。

4) L 抗原と E 抗原に対する ELISA 力価

L 抗原とE抗原での ELISA の結果は、Fig. 6 と Fig. 7 の如くである。

L 抗原 (20 μ g/ml) の場合、Fig. 6 の如く、両群とも投与4週後より *P. con* 血清を上回り、18週で最高となりその後も高い抗体価を維持し、下段の幼虫投与

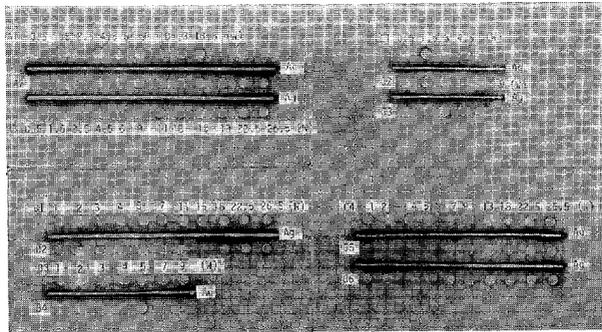


Fig. 5. Results of agar gel double diffusion test in rat sera with *T. canis* adult antigen
Ag: *T. canis* adult extract
Ab: Sera from rats infected with *T. canis* larvae (A, B), and with embryonated eggs (C)

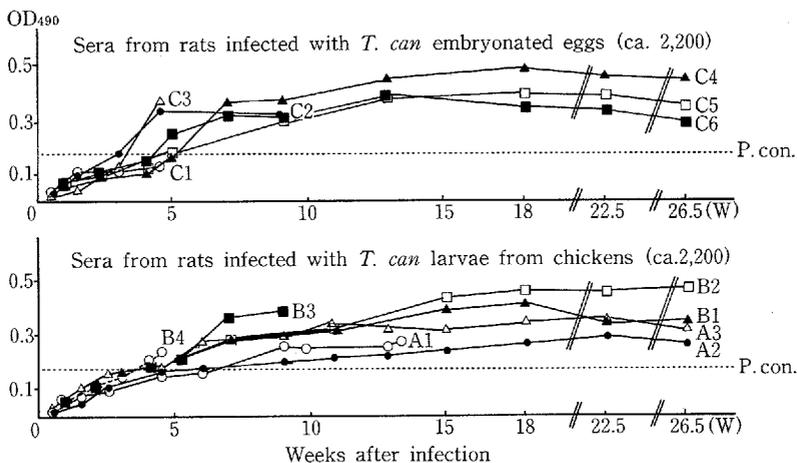


Fig. 6. Changes of antibodies titers in ELISA with larval antigen

Antigen: *T. canis* larvae extract (20 μ g/ml)

Rats sera dilution: $\times 200$

Conjugate (Peroxidase anti rat IgG): $\times 800$

群でみると OD 値の平均が P. con 血清で0.162の時
18週後で0.374となり26.5週後でも0.349であった。

E抗原 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の場合, Fig. 7 の如く, OD 値
の多少の変動は見られるものの4.5週後より P. con

血清の0.074を上回り, 幼虫投与群で15週後に平均
0.130と最高となり以降26.5週後でも0.114の値を示し
ていた。

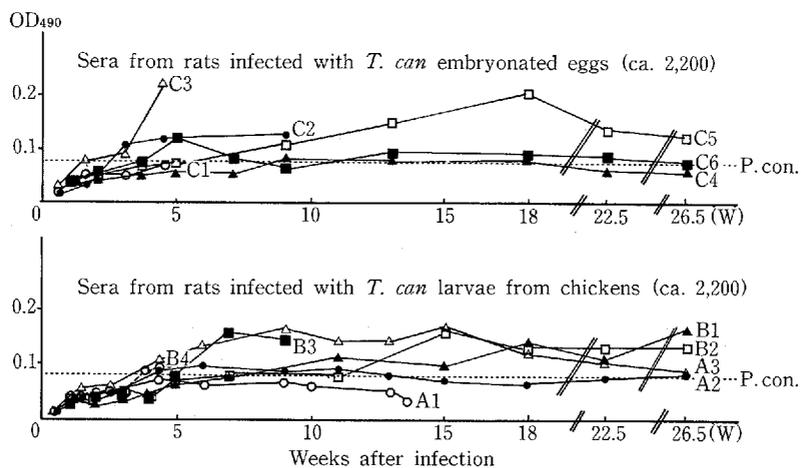


Fig. 7. Changes of antibodies titers in ELISA with eggs antigen

Antigen: *T. can* embryonated eggs extract (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Rats sera dilution: $\times 200$

Conjugate (Peroxidase anti rat IgG): $\times 800$

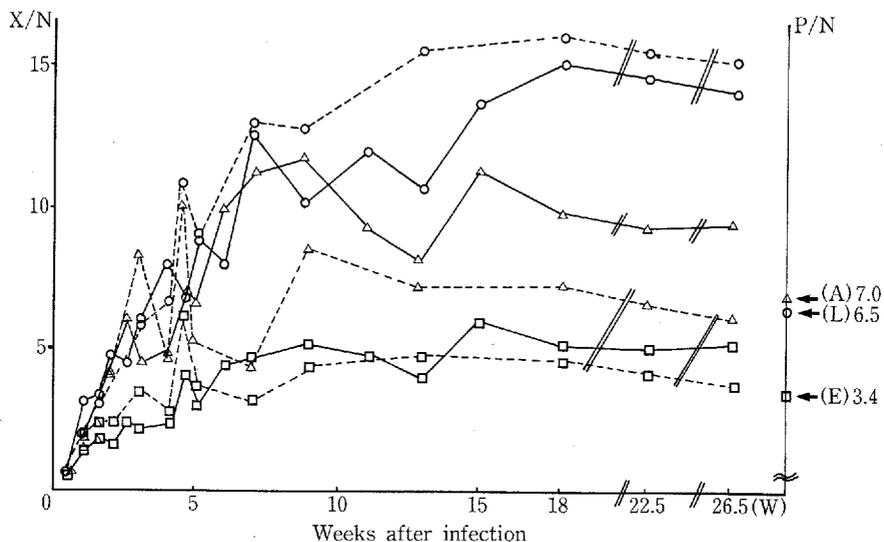


Fig. 8. Changes of X/N ratio in ELISA with 3 antigens

Antigen: Adult extract (A) \triangle — \triangle , Larval extract (L) \circ — \circ , Embryonated eggs extract (E) \square — \square

Serum: *T. can* larvae infection (—), *T. can* embryonated eggs infection (-----)

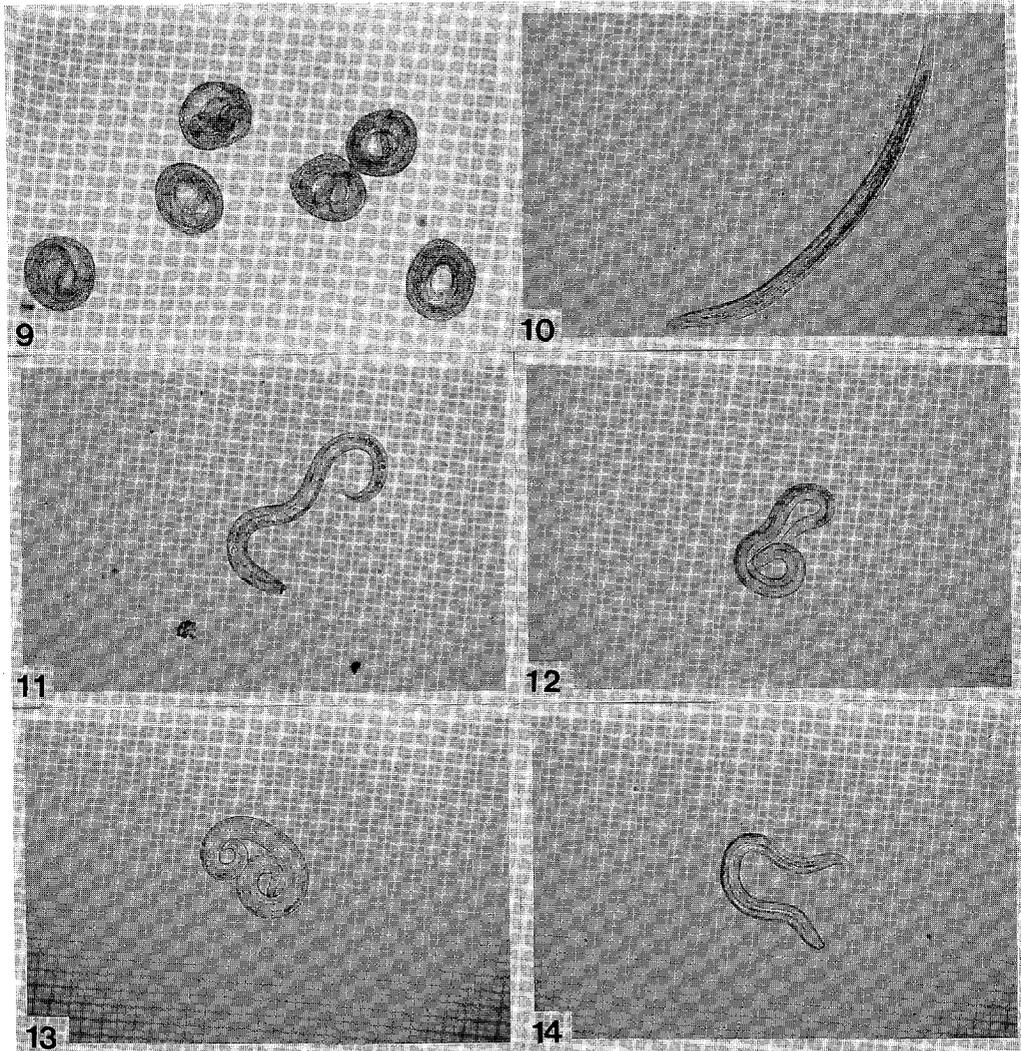


Fig. 9. *T. canis* embryonated eggs

Fig. 10. Larva in the liver of chicken on day 6 after infection with *T. canis* embryonated eggs

Fig. 11. Larva in the brain of rat on day 20 after infection with *T. canis* embryonated eggs

Fig. 12. Larva in the muscle of rat on day 30 after infection with *T. canis* embryonated eggs

Fig. 13. Larva in the rat on day 11 after infection with *T. canis* larvae from chickens

Fig. 14. Larva in the brain of rat on day 31 after infection with *T. canis* larvae from chickens

5) 三種抗原による X/N ratio の比較

各抗原による N.con 血清の OD 値(N)と被検血清の平均 OD 値(X)の比(X/N)を Fig. 8 に示した。なお N.con 血清の OD 値と P.con 血清の OD 値の比(P/N)は、それぞれA抗原で7.0, L抗原で6.5, E抗原で3.4である。

その結果、三種抗原とも投与1週後には X/N は1

以上となり既に抗体の産生が認められ、L抗原(○印)を用いた場合の X/N 比が他の抗原に比し著明に高く、かつ P.con 血清との差が明確であった。即ちL抗原では P/N=6.5 に対し X/N は18週で15~16、26.5週後でも14~15の値を示し、E抗原(□印)では X/N は最高でも6以下(P/N=3.4)、A抗原(△印)では X/N は11~12(P/N=7.0)が最高であった。

考 察

犬蛔虫の幼虫による内臓移行症 (VLM) に関しては、幼虫の体内移行経路や寄生部位の病理標本による組織学的追求など多くの研究 (Beaver et al¹⁾ 1952; Sprent²⁾ 1952; Oshima²³⁾ 1961; Olson²¹⁾ 1962; 近藤¹⁴⁾ 1970; Mossalam et al¹⁸⁾ 1972; Prokopič and Figallová²⁶⁾ 1982) がなされている。特に幼虫の感染により宿主の血液像に変化が現れることから、Beaver et al¹⁾ (1952), Smith and Beaver³⁰⁾ (1953) らは本症患者の白血球数や好酸球数の経時的推移を調べ、好酸球増多が認められることを報告し、更に加藤¹¹⁾ (1972) は家兎で、Przyjalkowski et al²⁷⁾ (1978) はマウスで同様の検討を行うと共に他の血清学的追求も行っている。また Patterson et al²⁵⁾ (1975) は診断の日安として患者血清中の IgG と IgM 抗体を RIA (radio immuno assay) で調べ、Savigny and Tizard²⁸⁾ (1977) は感染家兎と患者血清で HA (hemagglutination test) と SAFA (soluble antigen fluorescent antibody test) を行い、高い抗体価を有していたと報告し、更に Galant et al⁴⁾ (1980) は好酸球増多のある幼児血清中の抗体を IHA (indirect hemagglutination), BF (bentonite flocculation), Ouchterlony 及び ELISA で測定し、後者の2方法で陽性を示したと述べている。この他動物実験では近藤^{15, 16)} (1981, 1984) が家兎を、また Koizumi et al¹³⁾ (1983) がラットを用いて種々血清反応の検討を行い、Smith et al³¹⁾ (1982) は IFAT (indirect fluorescent antibody test) と ELISA により感染家兎血清中の抗体の推移を測定している。最近では VLM の診断の為に患者血清中の特異 IgG や IgM 抗体を ELISA にて測定し、その有効性を述べている報告も多い (Cypess et al³⁾ 1977; Glickman et al⁵⁾ 1978; Clement et al²⁾ 1985)。

虫卵の培養についても種々報告があり、小津²²⁾ (1961) は蛔虫の子宮内虫卵を用いて培養方法を検討した結果、3%滅菌斜面寒天培地を用いた場合に酸素及び湿度が適当であり、他の方法に比し最も成績が良く、8日目にはすべて仔虫になるが蒸留水、水道水中の培養は発育が一定せず仔虫期に達するのに30日を要すると述べている。一般には0.5%ホルマリン水による培養が多く用いられている (Nichols²⁰⁾ 1956; Schacher²⁹⁾ 1957; 近藤¹⁴⁾ 1970) が著者は雌成虫が産出した虫卵を 30°C にて滅菌生理食塩水中で培養し、6~7日目ではほとんどが幼虫包蔵卵となり、比較的早期に発育することを認めている。

動物への感染方法としては成熟卵による経口摂取が

一般的であり、幼虫投与による感染に関しては報告が少なく、平沢⁶⁾ (1927) が成熟卵をラット腹壁に注射した後腹腔内より得られる遊離幼虫を用い、豊田³⁴⁾

(1932) が成熟卵の人口孵化幼虫を用いて動物に試食させた他、直接幼虫を犬の血管内に注入して感染実験を行った Oshima²⁴⁾ (1976) らの報告があるのみである。今回は成熟卵及び鶏よりの幼虫をラット胃内へ直接投与し、その感染能についての検討を行った。

犬蛔虫幼虫の移行経路については、既に待機宿主として考えられているマウスに関する報告は多く (Sprent³²⁾ 1952; Nichols²⁰⁾ 1956; 石井⁷⁾ 1957a; Oshima²³⁾ 1961 Olson²¹⁾ 1962; 近藤¹⁴⁾ 1970; Prokopič and Figallová²⁶⁾ 1982), 虫卵投与1日後では腸壁、1~2日で肝臓、3~4日で肺、その後脳、筋肉、全身に至ることが知られている。Mossalam et al¹⁸⁾ (1972) は虫卵をマウス・ラット・モルモット・鶏に投与後組織切片により病変を調べたところ、ラットでは4週間培養した虫卵を2000個投与した結果、肝臓に10日後、腎臓に10~30日後、肺と脳に10~40日後に病変を認め、鶏では肝臓と肺に幼虫が寄生していたと述べている。今回の実験で33~70日間培養した幼虫包蔵卵をラットに1,000~2,000個投与した予備実験の結果、1日後で小腸・盲腸・肝臓・肺・大腸・直腸、3日後では肺・肝臓・小腸の順に多く、10日後からは脳・筋肉にも存在していた。また鶏では1~31日後までほとんどが肝臓に認められ、肺にも若干存在し脳・筋肉・腸管にも稀に認められ、全体の幼虫検出率は1~18%であった。

待機宿主内に生育している犬蛔虫の幼虫は、終宿主である幼犬に取り込まれると発育して成虫となり得る (Sprent³³⁾ 1958)。待機宿主内幼虫の再感染能については、豊田³⁴⁾ (1932) が虫卵投与3~5日後のモルモット肝臓及び肺内幼虫をマウスに試食させ、人工孵化幼虫を直接試食させたものとの感染能と比較した結果、後者の方が遥かに容易に感染すると述べ、石井⁸⁾ (1959b) はマウス内幼虫をマウスへ、石井と橋本⁹⁾ (1963) はミミズ内幼虫をマウス口腔内へ投与し感染を成立させている。著者は、人体摂取の可能性のある鶏肉幼虫をラット胃内に投与し、再感染能と移行経路を調べた。幼虫投与1~2日後では胃・肝臓・肺に多く、小腸・盲腸・大腸・直腸・心臓・腎臓にもわずかに認められ、6日後からは脳、10日後からは筋肉にも存在していた。幼虫検出率は感染初期は10~19%と高かったが、20日後では2.4%とかなり低下した。

待機宿主内犬蛔虫幼虫の発育に関しては、Nichols²⁰⁾ (1956) は虫卵からの圧出虫体の大きさが

360~434(404)×18 μ であり、感染1~180日のマウス体内幼虫が357~445×18~20 μ であると述べ、Schacher²⁹⁾(1957)は培養6日目のI期幼虫は396~494(445)×19~21(20) μ であり、9日日位で348~532(385)×18~21(19) μ となるとし、犬体内のII期幼虫は402×19 μ であると述べており、Sprent³³⁾(1958)は圧出虫体が390~440 μ で、犬体内II期幼虫は340~440 μ であると述べている。今回の実験結果によると28日間培養卵よりの圧出虫体が396~426(411)×14.9~19.8(17.4) μ m, 虫卵投与1ヶ月後ラット内幼虫は391~453(417)×17.8~21.0(19.8) μ m であり、鶏内幼虫は464~484×25~29 μ m と若干大きく、鶏内幼虫をラットに投与した1ヶ月後では391~468(442)×20.0~20.6(20.3) μ m であって、これらの幼虫はII期幼虫であると考えられた。

以上の成績より鶏内幼虫のラットへの再感染が認められ、これら幼虫が肝臓・肺を移行するという通常の移行経路をたどることが確認された。移行方法としては、能動的方法として腸壁を穿通して腹腔内にいた幼虫が肝臓表面より実質に侵入し一定期間発育した後再び腹腔に出て横隔膜を穿通し胸腔に入り肺に侵入するもの、あるいは肝静脈を介して肺に侵入するものが考えられる。受動的方法としては幼虫が胃腸壁の血管や淋巴管に穿入し血流によって門脈から肝臓・肝静脈・心臓を経て肺に至るものが考えられる。今回虫卵を投与したラットでは2~3日後で腹腔内に総幼虫数の9~15%の幼虫が証明され、小腸壁にもかなりの幼虫が存在していたことから、腸壁を穿通して主に能動的方法で移行したと考えられるが、鶏内幼虫を投与したラットでは腹腔にはほとんど遊離せず胃壁にかなりの幼虫が存在していたことから血流にそって受動的に移行し、肝臓、肺への移行が早期に行われたのではないかと考えられる。

犬蛔虫幼虫の感染によりラットに産生されるIgG抗体価をELISAにて測定し、抗原として成虫、幼虫、幼虫包蔵卵の各抽出物を用いて経時的推移を調べたところ、感染1週後より抗体が産生され始め、15~18週で最高となりその後6ヶ月後でもかなり高い抗体価の持続が認められた。なお同時に行った成虫抗原によるOuchterlonyでは、7例中2例のみが陽性であって満足すべき成績が得られなかった。Smith et al³¹⁾(1982)は感染家兎血清中のIgG抗体を調べているが、虫卵抽出物抗原を用いた場合、感染28日後までは低値のままであるがその後35日後まで急上昇し42日後まで低下せず、幼虫分泌排泄物(ES)抗原を用いた場合は、14日後から急上昇し21日後に最高となり28日後

には急減したと述べている。同様に近藤ら¹⁶⁾(1984)もES抗原を用いて検討しており、感染1~2週にかけて急増し26週まで徐々に上昇し続けると報告している。また河村¹²⁾(1983)は犬蛔虫成虫より抽出精製した抗原を用いて患者血清中の抗原測定用radioimmunoassay及び抗体測定用antigen-binding assayについて検討を行い、両方の組合わせが犬蛔虫症の感染初期から長期に及び経過観察及び診断に有力な手段であると報告している。これらの実験による抗体の動態の差は、動物の種類や個体差、感染に使用する虫卵及び幼虫の感染能の差異、感染方法、検査の為に使用する抗原など種々実験条件の違いによるものと思われる。今回の著者の実験では、成虫、幼虫、虫卵の三種抗原のうち、陰性と陽性の差が明確であったのは幼虫抗原、成虫抗原、虫卵抗原の順で、ELISA用抗原としては幼虫抗原を使用することが好ましいという成績が得られている。

以上鶏内の幼虫をラットに感染させた場合の感染経路及び血清学的検討の成績から、待機宿主内幼虫がその体内で生存している間は次の宿主への感染の可能性があることが証明され、伊藤ら¹⁰⁾(1986)が推察している如く感染予防の面からも肝に限らず動物の生食は危険であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました辻守康教授に深甚なる謝意を表しますと共に、本研究に関し種々御協力下さいました寄生虫教室員各位に深謝します。また材料を供与下さった利田亮史先生、福本幸夫先生、アキタ産業(福山)に御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第55回(1986、北海道)、第56回(1987、横浜)日本寄生虫学会大会において発表した。

参 考 文 献

1. Beaver, P. C., Snyder, C. H., Carrenna, G. M., Dent, J. H. and Lafferty, J. W. 1952. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases. *Pediatrics*. 9: 7-19.
2. Clemett, R. S., Hidajat, R. R., Allardyce, R. A. and Stewart, A. C. 1985. Toxocaral infection in hydatid control officers: diagnosis by enzyme immunoassay. *N. Z. Med. J.* 98(786): 737-739.
3. Cypess, R. H., Karol, M. H., Zidian, J. L., Glickman, L. T. and Gitlin, D. 1977. Larva-specific antibodies in patients with visceral

- larva migrans. J. Infect. Dis. 135:633-640.
4. Galant, S. P., Glickman, L. T., Loscialpo, A. E. and Klein, G. 1980. Serologic diagnosis of *Toxocara canis* infection. South. Med. J. 73(4):435-437.
 5. Glickman, L., Schantz, P., Dombroske, R. and Cypess, R. 1978. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27(3):492-498.
 6. 平沢一三 1927. 蛔虫の外界脱殻仔虫の経口的感染に関する実験的研究, 特に固有宿主及非固有宿主に於ける発育経路に就て. 東京医事新誌 2532: 1350-1356.
 7. 石井俊雄 1959 a. Larva migrans に関する研究 (1), 犬蛔虫感染幼虫の期 (Stage) について. 寄生虫誌 8(2): 204-208.
 8. 石井俊雄 1959 b. Larva migrans に関する研究 (2), 犬および豚蛔虫のマウス体内移行幼虫の行動と形態の比較, ならびにこれら幼虫の再感染能との関連について. 寄生虫誌 8(4): 558-566.
 8. 石井俊雄, 橋本 魁 1963. Larva migrans に関する研究(4), ミミズ体内で孵化した犬蛔虫幼虫のマウスへの投与実験. 寄生虫誌 12(3): 222-225.
 10. 伊藤孝一郎, 酒井健二, 岡嶋泰一郎, 大内和弘, 船越頭博, 西村純二, 井林 博, 辻 守康 1986. 鶏肝や牛肝の生食により発症したと考えられる内臓幼虫移行症の3例. 日内会誌 75(6): 39-46.
 11. 加藤信博 1972. 実験的犬蛔虫症の研究(1), 感染ウサギの血球および血清成分の変動. 岐阜医紀 20(6): 633-642.
 12. 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. 広大医誌 31(2): 265-274.
 13. Koizumi, T., Hayakawa, J. and Kondo, K. 1983. *Toxocara canis*: Immunogenic sources of *Toxocara canis* in infected rats. Jap. J. Parasit. 32(5):379-386.
 14. 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(1): 32-56.
 15. 近藤力王至, 小泉 勤, 坪田宣之, 大田義博, 吉村裕之 1981. 実験的移行性幼線虫症の研究(3), 犬蛔虫幼虫感染家兎の抗体価の推移. 寄生虫誌 30(6): 549-556.
 16. 近藤力王至, 赤尾信明, 小西喜彦, 吉村裕之 1984. 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. 寄生虫誌 33(2): 99-104.
 17. Lowry, O. H., Rousebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
 18. Mossalam, I., Atallah, O. A. and Hosney, Z. 1972. Experimental studies on visceral larva migrans of *Toxocara canis* in laboratory animals. Acta Vet. Acad. Sci. Hung., Tomus. 22(1):71-80.
 19. 中尾 稔, 松田 肇, 田中 寛, 永田 傳 1981. 日本住血吸血症の ELISA プレート法におけるペルオキシターゼ標識抗体用の三種基質の比較. 寄生虫誌 30: 197-204.
 20. Nichols, R. L. 1956. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae. J. Parasit. 42(4):349-362.
 21. Olson, L. J. 1962. Organ distribution of *Toxocara canis* larvae in normal mice and in mice previously infected with *Toxocara*, *Ascaris* or *Trichinella*. Tex. Repts. Biol. Med. 20:651-657.
 22. 小津茂弘 1961. 蛔虫卵の培養方法に対する検討. 附, 滅菌斜面寒天培地と他培地との比較. 寄生虫誌 10(2): 240-248.
 23. Oshima, T. 1961. Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. J. Parasit. 47:652-657.
 24. Oshima, T. 1976. Observation of the age resistance, eosinophilia, and larval behavior in the helminth-free beagles infected with *Toxocara canis*. Jap. J. Parasit. 25(6):447-455.
 25. Patterson, R., Huntley, C. C., Roberts, M. and Irons, J. S. 1975. Visceral larva migrans: Immunoglobulins, precipitating antibodies and detection of IgG and IgM antibodies against *Ascaris* antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24(3):465-470.
 26. Prokopič, J. and Figallová, V. 1982. Migration of some roundworm species in experimentally infected white mice. Folia parasit. (Praha). 29:309-313.
 27. Przyjalkowski, Z., Zapart, W. and Starzyński, S. 1978. Investigation of intravital diagnosis *Toxocara canis*. larva migrans in experimentally infected mice. Bull. Acad. Pol. Sci. [Biol]. 26(12):875-880.
 28. Savigny, D. H. and Tizard, I. R. 1977. *Toxocaral* larva migrans: The use of larval secretory antigens in heamagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71(6):501-507.
 29. Schacher, J. F. 1957. A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. J. Parasit. 43(6):599-612.
 30. Smith, M. H. D. and Beaver, P. C. 1953. Persistence and distribution of *Toxocara* larvae in the tissues of children and mice. Pediatrics. 12:491-497.
 31. 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 *Toxoascaris leonina*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **76**(1):89-94.
32. **Sprent, J. F. A.** 1952. On the migratory behavior of the larve of various *ascaris* species in white mice. J. Inf. Dis. **90**:165-176.
33. **Sprent, J. F. A.** 1958. Observations on the development of *Toxocara canis*. (Werner, 1782) in the dog. Parasitology. **48**:184-209.
34. **豊田一長** 1932. 寄生虫卵（特に蛔虫卵）の人工孵化に関する研究（第2回報告）、蛔虫の経口的並に皮膚的感染に就て、大阪医学会雑誌 **31**(8): 2823-2880.
35. **辻 守康** 1974. 寄生蠕虫類の免疫電気泳動法について、寄生虫誌 **23**: 335-345.
36. **吉田幸雄** 1987. 図説、人体寄生虫学、第3版。南山堂、東京。

Studies on Visceral Larva Migrans—Infectivity of *Toxocara canis* Larvae from Paratenic Host and Antibody Titers in Rats—

Hiroko INOUE

Department of Parasitology, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Moriyasu TSUJI)

The infectivity of *Toxocara canis* to rats was studied using embryonated eggs or larvae from chickens, and the resulting antibodies titers were determined by ELISA. The results are summarized as follows.

- 1) In chickens infected with eggs, the infection rates from eggs incubated 21-25 days were 5-18% on days 1 to 10, and 1.7% on day 31.
- 2) In rats infected with larvae from chickens, the larvae were mostly found in stomach wall, liver and lung on days 1 to 3, and also found in brain and muscle on day 10 after administration. The infection rates were 10-19% on days 1 to 2 and 2-4% on days 10 to 31. The size of 31 days old larvae were 391-468 μm in length and 20.0-20.6 μm in width.
- 3) The specific IgG of *Toxocara canis* were detected from 1 week after administration in rats infected with either eggs or larvae. The peak antibody titers occurred at 15 to 18 weeks and were kept up to 26.5 weeks after infection.
- 4) Among the three kinds of antigens, larval extract, adult extract or embryonated eggs extract, the larval antigen showed the highest ELISA titers. From the above mentioned results, it was found that larvae of *Toxocara canis* from the chicken as paratenic host was equally infections for rat as eggs.