

アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究

1. 電気泳動法による抗原の分析

鈴木 俊 夫

新潟大学医学部医動物学教室 (主任 大鶴正満教授)

(1968年 5 月 27 日 受領)

近年、海産魚介類を中間宿主とするアニサキス様幼虫の主として人体消化管壁侵入による急性あるいは亜急性腹症すなわちアニサキス症が各地からあいついで報告され、重要な寄生虫性疾患として注目されている。しかし、本症は臨床的特徴に乏しく、臨床症状から確定診断を下すことは容易でなく、ほとんどの例で胃腫瘍、局所性腸炎 (Crohn 氏病)、急性虫垂炎などの臨床診断のもとに開腹手術を受け、病理組織所見からはじめて本症と診断されている。

本症について解明されなければならない数多くの問題があるが、とりわけ本症の診断法の確立ということが重要な課題の一つである。著者は1967年以来、本症の免疫学的診断法について研究しているが、今回は電気泳動法を用いて行なった抗原の分析結果について報告する。

実験方法

1. 抗原作製

a) 材料 アニサキス幼虫は北海道産スケトウダラの内臓より採取した。ヒト回虫成虫は集団駆虫に際し、駆虫薬投与後 2 日目までに排泄されたものを集めて使用した。ブタ回虫成虫は屠畜場で採取し、微温生理的食塩水に入れて実験室に持ち帰った。

b) 全虫体抽出抗原採取した虫体は水で数回洗い、更に蒸留水で洗ったうへ汚紙で水を除き、細かく切って凍結乾燥後密栓した容器に入れて -27°C に保存した。用いの際のみ必要量だけ取り出して抽出した。乾燥虫体を乳鉢に入れ細かく磨碎して秤量した後ホモジナイザーに移し10倍量の 0.02M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) を加えて更に磨碎したうへ、ビーカーに移して 4°C の氷室内でマグネテックスターラーを用いて48時間攪拌抽出した。次いで 10,000 r.p.m., 30 分遠心し、上清をセロファンチューブに入れ 4°C の氷室内で純水で12時間透析した。更

に 25,000 r.p.m., 45分遠心し、上清をアンプルに 1 ml ずつ分注後凍結乾燥して熔解し、 -27°C に保存した。

c) 体腔液採取ヒト及びブタ回虫成虫では生きた虫体の尾端を切り、したたる液を容器に集め、純水で12時間透析した後、25,000 r.p.m., 45分遠心して沈澱を除き、0.5 ml ずつアンプルに分注し、凍結乾燥して保存した。アニサキス幼虫では生きた虫体を寸断し、20,000 r.p.m., 30分遠心してしぼり出された体液を上記の方法で保存した。体液をしぼり取ったあとの虫体に蒸留水を加えて 20,000 r.p.m., 30分遠心し、上清を捨て b) と同様の操作で虫体成分を抽出して比較した。

d) 飼養液採取 ペニシリン、ストレプトマイシンを加えた充分量の生理的食塩水を入れたビーカーに活発に運動する虫体を投入し、ガーゼで覆い、 37°C 12時間飼養した。飼養中死亡したものは速かに取除いた。次いで飼養液を集め純水で 4°C 48時間透析し、25,000 r.p.m., 45分遠心し、上清を凍結乾燥した。

2. 抗血清作製

a) 免疫動物 各抗原ともそれぞれ 3 羽の家兎を用いて感作し抗血清を作製した。

b) 免疫方法 保存した凍結乾燥抗原に 1 ml の生理的食塩水を加えて溶解し、等量の Freund's complete adjuvant を加えて良く混和し、家兎の四肢臍皮下に 0.125 ml ずつ分割接種した。3 週間経過後 1 週毎に 5 回背部皮下に同量の追加免疫を続け、最後の注射後10日目抗体価を調べ充分上昇している家兎より採血し、凍結乾燥して保存した。

c) 抗体価の測定法 寒天二重拡散法は Ouchterlony 法の変法を用いた。即ち、95 ml の生理的食塩水に 0.07 M 硼酸緩衝液 (pH 8.0) 4 ml と 1% マーゾニン水 1 ml を加えたものに 0.9% になるよう Agarose を溶かし、ガラス板に流した。抗原、抗血清の孔の大きさ、間隔は両

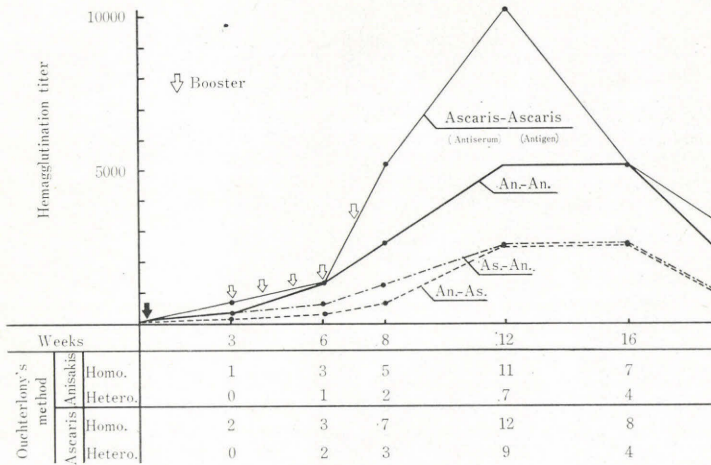


Fig. 1 Hemagglutination tests and agar double diffusion tests using rabbit antisera immunized with whole antigens of *Anisakis* larvae and *Ascaris* adult worms.

者の力価に応じて適宜変えた。赤血球凝集反応は Boyden 法の Lewis-Kessel 変法を用いた。即ち、人O型血球を用い、タンニン酸で処理したものに抗原を付着させて凝集抗原とした。

3. 免疫電気泳動法

Grabar の Macromethod を応用した。硝子板上に Veronal-Hcl (pH 8.2) に 0.9% になるように溶解した Agarose を流した。両端電圧を 22 volt の定電圧で 5 時間通電し、次いで 5mm 抗原孔より離れた溝に抗血清を入れ、適当な湿度を保たせ、20°C 3 日間静置した。沈降線の保存のため濾紙をのせ自然乾燥してアミドブラック 10B で染色した。

吸収試験は Scheidegger の Micromethod を用い、20 volt 3 時間通電した。抗原を階段状稀釈したものを作り、抗血清に等量加え、37°C 1 時間、次いで 4°C 冷蔵庫内に 24 時間静置した後、25,000 r.p.m. 15 分遠心して上清を取り、原血清の濃度に濃縮し、一定濃度の抗原との間に免疫電気泳動を行ない、至適吸収量を決定した。

4. 澱粉ゲル電気泳動法

Smithies 原法を菅野が改良した方法に準じて行なった。加水分解澱粉 29g を 200 ml の 0.045M トリス - 0.025M 硼酸 - 0.001M EDTA (pH8.5) に加熱溶解し、泳動槽に流しこみ、充分ゲル化したところで試料溝に上記緩衝液に溶解した試料を入れ、ゲルの表面をワゼリンで覆い乾燥を防ぎ、両端を 0.3M 硼酸 - 0.012M 苛性ソーダ (pH 8.45) に結合し、両端電圧 100 volt の

定電圧で 4°C, 24 時間泳動した。染色にはアミドブラック 10B を用いた。

澱粉ゲルより泳動分画の抽出は、試料間に適当な間隔で小孔をあけて目じるしとし、表面を薄く切り取って急いで染色し、目じるしに従って切り取り抽出した。ゲル片に少量の緩衝液を加えて、ホモジナイザーに入れてよく磨砕し、25,000 r.p.m., 45分遠心して上清を採取し、目的の量となるまで濃縮した。

実験成績

1. 感作家兎の抗体産生状況

アニサキス及び回虫全虫体抽出抗原で免疫した家兎の抗体産生状況について、定型的な例を第1図に示した(第1図)。

赤血球凝集反応では、全経過を通じて対応抗原での凝集価の方が非対応のものより常に高かった。寒天二重拡散法でも、赤血球凝集反応にはほぼ平行した沈降線の数の増加がみられたが、この際にも対応抗原の方が、非対応抗原より常に多いことがわかった。

2. 全虫体抽出抗原による免疫電気泳動

アニサキス抗原とその抗血清との間に24本の沈降線がみられ、回虫抗原とその抗血清間では26本数えられた。しかし、両抗原とも非対応抗血清との間にはいずれも14本の線しか数えられず、ここでも対応、非対応の差が明らかであった(第3図)。

抗血清を非対応抗原で吸収したものと比較したのが第3図である。至適吸収量の決定は前述の如くであるが、いずれもほぼ2倍稀釈の抗原を等量加えた点を最低としてその前後で沈降線が増加した。至適量での吸収では、アニサキスにはほとんど沈降線が認められないのに、回虫では6本の弱い沈降線が残った。

3. 全虫体抽出抗原の澱粉ゲル電気泳動による比較

アニサキス及び回虫全虫体抽出抗原の澱粉ゲル電気泳動パターンは第4図に示したようにいずれもほぼ20の分画に分れた。両者は一見きわめて成分を異にするもののように思われたが、詳細に解察してみると模型図に示したように各泳動帯はかなり対応することがわかった。デントンメトリーによっても両抗原の構成は量的な差は別にして、かなり近似したものであると考えることがで

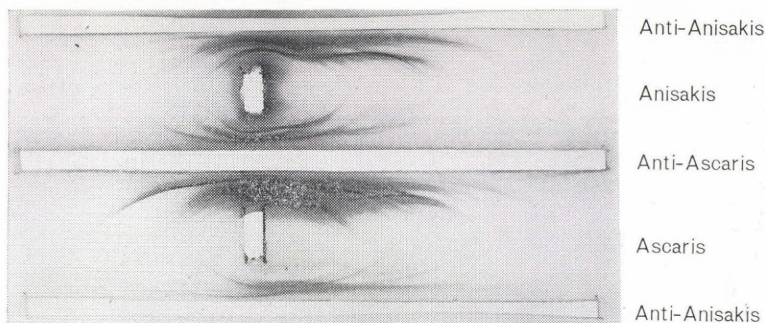


Fig. 2 Diagram of immunoelectrophoretic patterns.

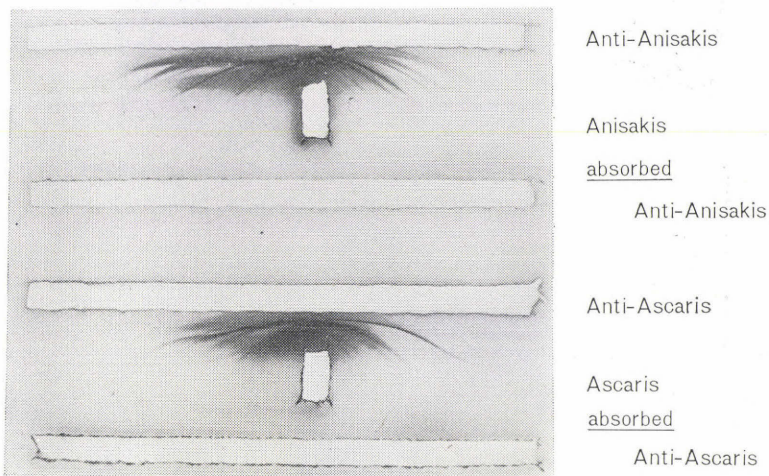


Fig. 3 Diagram of absorption test.

きた。

特徴的な点は、前記の泳動条件によると、アニサキスでは試料溝より約5 cm、回虫では約7 cm離れた点に集まる多量の分画があることである、これらに対してそれぞれ N_6, S_7 分画と名づけた。しかし、これらの両分画は各抗原に特異的なものではなく、それぞれに対応した部位に低い山を形成することから、両者の含有量の差だけであることがわかる(第4図)。

4. 澱粉ゲル泳動分画の抽出

第5図のように、濃く染った分画を標識としてゲルを切り取り、成分を抽出した(第5図)。

抽出分画の抗原性について調べたのが第6図である。全ての分画に抗原性が認められた。アニサキス抗原では N_4, N_6, N_7 が同抗血清に強く反応し、回虫抗原では S_4, S_7 が同抗血清に強く反応することを知った。特に N_6 とアニサキス抗血清との間には3本の明瞭な沈降線が見ら

れ、回虫抗血清との間には不明瞭な線が1ないし2本みられた。 S_7 と回虫抗血清との間には1本の明瞭な線と2本の不明瞭な線がみられ、アニサキス抗血清との間には2ないし3本の不明瞭な線がみられた。 N_6, S_7 とも対応抗血清にはきわめて著明な反応がみられるが、非対応抗血清には弱い反応しか認められなかった。しかし、これらの分画と抗血清との間に数本の沈降線がみられることは、これらが単一の成分からなるものではないことを示している(第6図)。

3. 各種抽出物の電気泳動による比較

absorbed

Anti-Anisakis

アニサキスの飼養液、全虫体抽出液、体液、体液をしぼり取ったあとの虫体からの抽出液を比較したのが第7図である。 N_6 は体液および飼養液にきわめて多く含まれ、実質抽出液中には少なかった。試料溝より陰極側に向う成分は実質中に多く含まれていた。

Anti-Ascaris

Ascaris

absorbed

Anti-Ascaris

回虫と比較したのが第8図である。体液および飼養液中には S_7 がきわめて多く、陰極側に向う成分は少なかった。

分画は少なかった。

アニサキス、回虫ともに体液(または体腔液)と飼養液とでは電気泳動上きわめて類似することもわかった。

考 按

アニサキス症の発生機序はアニサキス幼虫の機械的障害のみでは理解され難く、幼虫の出す分泌・排泄物または虫体崩壊中のある種の抗原性物質によるアレルギーの関与がかなり重要な要因と考えられるようになった。

Kuipers (1964), 大鶴ら (1966), 横川ら (1966), 山口ら (1966), 白谷ら (1966), 小島ら (1966), 小柳ら (1967) がアニサキス幼虫で感作した動物に生きた幼虫を経口的に投与し、人体に見られるのときわめて類似した所見を得ている。

発症の前提として人体がアニサキス幼虫によって感作された状態にあるとすると、免疫学的方法によって抗体

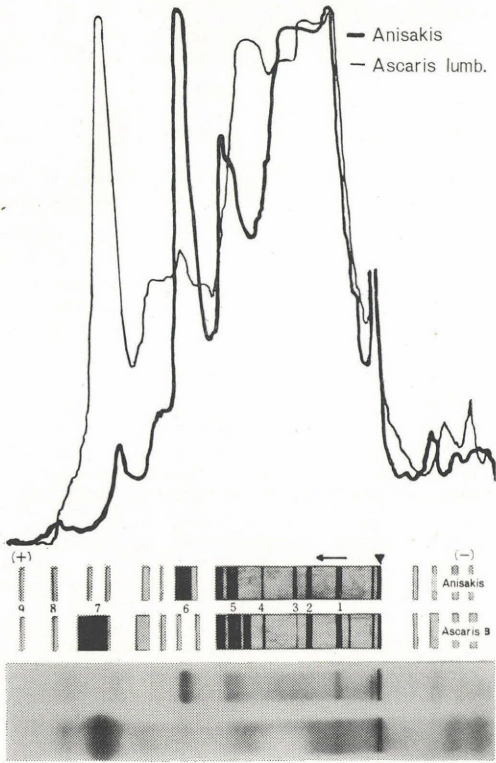


Fig. 4 Comparative electrophoretic patterns of the whole worm antigens isolated from *Anisakis* larvae and *Ascaris* adult worms.

が検出されるはずである。Kuipers (1962), Merkelbach (1964), 吉村 (1966) らは症例について補体結合反応を行ない、抗体価の上昇を認め、本症の免疫学的診断に期待が持たれるとした。しかし、*Anisakis* 幼虫の粗抗原を用いた血清反応ではブタ、イヌ回虫 (吉村, 1966, 谷口, 1966), 犬糸状虫 (山本, 1966) などとの間に交叉反応の起ることが知られているし、今後の調査によってはその他の寄生虫との間にも交叉反応を起す可能性が考えられる。

著者の粗抗原を用いた実験では、皮内反応、赤血球凝集反応、Ouchterlony 法、Passive cutaneous anaphylaxis のいずれにおいても *Anisakis* 幼虫はヒト、ブタ回虫との間に交叉反応がみられた。したがって、免疫学的に特異的な診断法を確立するためにはこのような交叉反応を可及的排除するような努力が必要であるが、そのためには使用抗原の特異性が重要になってくる。

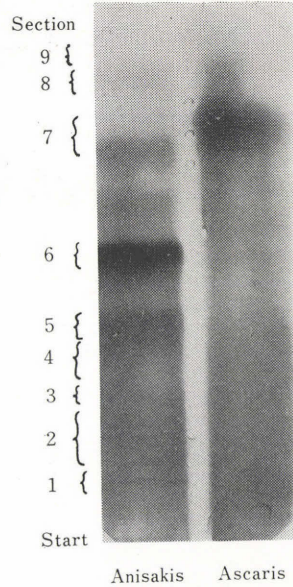


Fig. 5 Location of isolated fractions.

Anisakis 幼虫の抽出物中に特異的な抗原成分が認められるか否かについて横川ら (1967, 1968) は免疫電気泳動法を用いて検討した。それによるとブタ、イヌ回虫成虫抗原で吸収した *Anisakis* 抗血清中に残存する 1 本の特異的沈降線を認めた。

著者も千葉大の方法に準じて免疫電気泳動を行ない、対応する抗原、抗血清間では *Anisakis* 幼虫 24 本、回虫成虫 26 本、非対応の間では各 16 本の沈降線を認めた。次いで行なった非対応抗原での吸収試験では、*Anisakis* 抗血清中には残存する沈降線がみられなかったが、回虫では 6 本の弱い沈降線が認められた。このことから著者は *Anisakis* 幼虫の抽出物中には、このような方法で検出される充分な特異的抗原性成分が恐らく含まれていない、したがってそうしたものの分離は困難であろうと判断した。もちろん微量の成分では支持体に吸着されて拡散するにいたらないか、吸収操作中に沈降物中に吸着されて共沈するという事実もあるため、この成績のみから特異的抗原成分はないと即断することは危険である。

回虫成虫に 6 本の沈降線が認められたことから、回虫成虫が *Anisakis* 幼虫に比べてかなり異なった抗原性成分を持っていることは確かであるが、これは幼虫、成虫と発育時期の相違によることも充分考えられるため今後検討してみたい。ヒト回虫、ブタ回虫との違いは今回の実験では認められなかった。

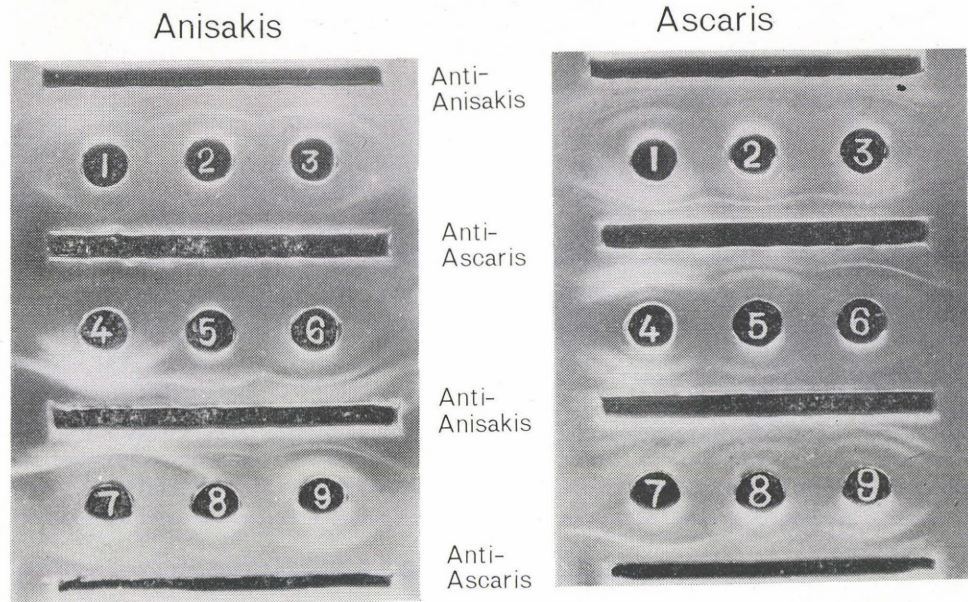


Fig. 6 Agar double diffusion patterns of fractions isolated by starch-gel electrophoresis.

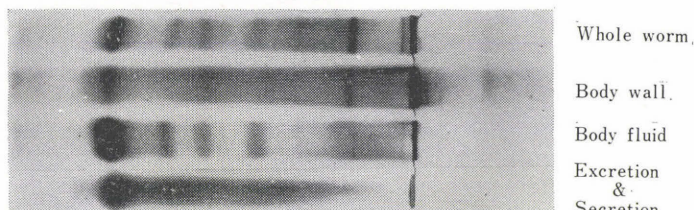


Fig. 7 Comparative electrophoretic patterns of *Anisakis* larval antigens.

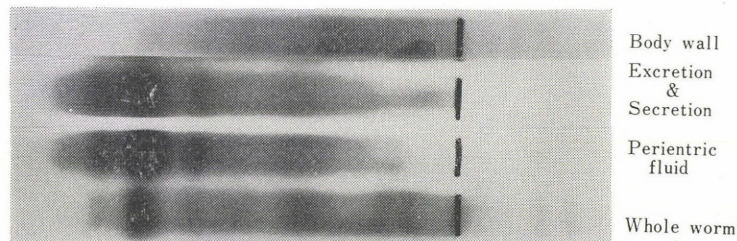


Fig. 8 Comparative electrophoretic patterns of *Ascaris* adult worm antigens.

アニサキス幼虫抽出抗原の分離精製法についての報告は未だみられない。Kagan (1958, 1959) はイヌ、ネコ回虫幼虫による visceral larva migrans の免疫学的診断を目的とした一連の研究成果を報告した。それによると虫体の各部を分離したものや、虫卵などを化学的に処理したものについて寒天二重拡散法、赤血球凝集反応、

絮状反応等を行ない、そのいずれにも属特異性がみられず、さらに精製して非特異的成分を取り除く必要があるとしている。

カラムクロマトグラフィーやゲル濾過法を用いた寄生虫抗原の分析についての報告も多い。しかし、これらは主として抗原活性に重点を置き、特異性という点に関してはあまり検討されていない。山本 (1967) は回虫抗原をカラムクロマトグラフィーによって分析して活性成分を得ているが、これでも犬糸状虫との交叉はまぬがれ得なかったと報告している。

免疫学的診断法に用いる抗原は、言うまでもなく抗原としての活性をもつ上に、特異性が強いという二つの条件を充すものでなくてはならない。

著者は分離能が最もすぐれ、しかも分離した分画をほぼ 90% 以上も回収できる澱粉ゲル電気泳動法を用いて分析してみた。実験成績に示したように、アニサキス幼虫、回虫成虫とも20の分画に分かれ、しかもかなり対応する部位に集まることがわかった。このことから前記の免疫電気泳動の結果からも考え合せて、アニサキス幼

虫抽出物中から特異的抗原成分の分離は困難であろうと考えた。ただ、アニサキス幼虫と回虫成虫の泳動分画の比較で、各分画の含有量にかなりの差がみられることから、ある成分を用いれば免疫反応の量的差異（抗体価の差）として表われるのではないかとの期待が持たれた。事実、感作動物を用いた実験では、分画によってはアニサキス幼虫抗血清に、または回虫成虫抗血清により強く反応するものがあつた。最も差の明らかな分画は著者が N₆, S₇ と名づけた分画で、N₆ はアニサキス幼虫抗血清に、S₇ は回虫成虫抗血清に特に強く反応することがわかつた。しかも N₆ はアニサキス幼虫の体液ならびに飼養液中に、S₇ は回虫成虫の体腔液ならびに飼養液中に多く含まれるという興味ある事実がわかつた。したがって、もし人体での感作が虫体の出す分泌・排泄物中のある種の抗原性物質によるとする推定が正しければ、このような分画を用いての免疫学的診断法はかなり意義あるものとなる可能性が強い。しかし現段階では、これらの分画も未だ単一の成分よりなるものではなく、今後更に精製して種々の検討を加えてみたい。

結 語

著者は実験動物を用いてアニサキス症の免疫学的診断法の研究を行ない、次の結果を得た。

1) アニサキス幼虫ならびに回虫成虫抽出粗抗原で感作した家兎の抗体産生の状況を赤血球凝集反応で追跡すると、全経過を通じて対応抗原による方が非対応抗原による抗体価より高かつた。

2) 同血清について Ouchterlony 法を行なつてみると、反応線の数は対応抗原の方が非対応抗原より常に多かつた。

3) 免疫電気泳動を行なうと、対応抗原抗血清間には、アニサキス幼虫24本、回虫成虫26本の沈降線が認められ、非対応抗原抗血清間ではいずれも16本の沈降線がみられた。

4) 非対応抗原で吸収すると、アニサキス幼虫抗体は殆んど吸収されてしまうが、回虫成虫抗体では6本の弱い沈降線がみられた。

次いで、澱粉ゲル電気泳動法を用いてアニサキス幼虫、回虫成虫粗抗原の分析を行ない、下記の結果を得た。

1) 両抗原とも澱粉ゲル上ではほぼ20の分画に分かれ、かなり一致したパターンを示した。

2) 特に濃く染色する分画を目標に9 sectionsに分けると、アニサキス幼虫では section 6, 回虫成虫では

section 7 が特徴的な分画であつた。

3) section 別に抽出して抗血清と反応させると、section 6 はアニサキス幼虫抗血清に、section 7 は回虫成虫抗血清に強く反応した。

4) section 6, section 7 とともにそれぞれアニサキス幼虫、回虫成虫の体腔液（あるいは体液）ならびに飼養液中に多く含まれる分画であり、体実質抽出液中には少なかつた。

稿を終るに当り、ご指導、ご検閲をうけた大鶴正満教授、理学部菅野浩教授、生化学教室緒方規矩雄教授に感謝するとともに、免疫電気泳動法についてご指導いただいた千葉大学辻守康講師（現広島大学教授）、アニサキス幼虫の提供をうけた石倉肇博士ならびにご協力いただいた超遠心室渡辺イク助手に感謝いたします。

なお本論文の要旨は第37回本寄生虫学会総会（1968）シンポジウム「アニサキス症について」の追加として発表した。

文 献

- 1) Ashby, B. S., Appleton, P. J. and Dawson, I. (1964): Eosinophilic granuloma of gastrointestinal tract by herring parasite *Eustoma rotundatum*. Brit. Med. J., 5391, 1141-1145.
- 2) Campbell, D. H. et al. (1964): Methods in immunology, Benjamin.
- 3) Kagan, I. G. (1958): Hemmagglutination tests with *Ascaris* antigens. J. Immunol., 80, 396-399.
- 4) Kagan, I. G., Jeska, E. L. and Gentzkow, C. J. (1958): Serum-agar double diffusion studies with *Ascaris* antigens. J. Immunol., 80, 400-406.
- 5) Kagan, I. G. (1959): Studies on the serology of visceral larva migrans. J. Immunol., 83, 297-301.
- 6) 小島国次・小柳武久・白木公(1966): アニサキス症（消化管の寄生虫性膿瘍）の病理学的研究。日本臨床, 24, 2314-2323.
- 7) 小柳武久(1967): アニサキス幼虫消化管移行症に関する実験的研究。寄生虫誌, 16, 470-493.
- 8) Kuipers, F. C. (1964): Eosinophilic phlegmonous inflammation of the alimentary canal caused by parasite from the herring. Pathologia et Microbiologia, 27, 925-930.
- 9) Kuipers, F. C. (1962): Eosinofiele flegmone van de Dunne Darm. T. Gastro-Enterology, 5, 320-327.
- 10) Merkelbach, J. W. C. (1964): Een visser met heringwormziekte (anisakiasis) van het rectum.

- Ned. T. Geneesk, 108, 2131-2132.
- 11) 大鶴正満・小柳武久・白木公・堀田猛雄・初鹿野高好, 監物実(1966): 寄生虫性肉芽腫の研究. 41年度文部省研究報告集録(医学及び薬学編) 306.
 - 12) 大鶴正満・小柳武久・白木公・監物実(1966): アニサキス様幼虫のウサギおよびイス感染実験. 寄生虫誌, 15, 546.
 - 13) Ouchterlony, O. (1953): Antigen-antibody reaction in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 32, 231-240.
 - 14) Scheidegger, J. J. (1955): Une micro-méthode de l'immuno-electrophorèse. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7, 103-110.
 - 15) Smithies, O. (1959): An improved procedure for starch-gel electrophoresis: further variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.*, 71, 585.
 - 16) Smithies, O. (1961): Molecular size and starch-gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.*, suppl., 1, 125-131.
 - 17) 菅野浩 (1967): 澱粉ゲル電気泳動法. 代謝, 2, 604-611.
 - 18) 菅野浩 (1967): 澱粉電気泳動法. 電気泳動実験法, 275-302, 光文堂.
 - 19) 谷口正明 (1966): *Anisakis* の研究 (1) 抗原性. 寄生虫誌, 15, 502-506.
 - 20) 白谷直純 (1966): アニサキス症の実験的研究. 四国医誌, 22, 486-503.
 - 21) Grabar, P. and Williams, C. A. (1953): Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 193-194.
 - 22) 山口富雄 (1966): アニサキス症の実験的研究. 41年度文部省研究報告集録(医学及び薬学編), 413.
 - 23) 山本隆一 (1967): 寒天ゲルを用いた回虫の抗原性の研究. 長崎大風土病紀要, 8, 203-209.
 - 24) 横川宗雄・吉村裕之 (1966): アニサキス様幼虫感染症の臨床病理学的ならびに実験的研究. 41年度文部省研究報告集録(医学及び薬学編), 310-311.
 - 25) 横川宗雄・吉村裕之・辻守康・荒木国興 (1968): *Anisakis* の免疫電気泳動像について. 第37回寄生虫学会総会抄録, 14.
 - 26) 吉村裕之 (1966): 人消化管の好酸球形肉芽腫を起因するアニサキス様幼虫移行症について. *Minophagen Medical Review*, 11, 105-114.
 - 27) 吉村裕之 (1967): アニサキス症の臨床病理と発生機序. 医学のあゆみ, 61, 252-258.

Abstract

STUDIES ON THE IMMUNOLOGICAL DIAGNOSIS OF ANISAKIASIS I. ANTIGENIC ANALYSIS
OF *ANISAKIS* LARVAE BY MEANS OF ELECTROPHORESIS

TOSHIO SUZUKI

(Department of Medical Zoology, Niigata University
School of Medicine, Niigata, Japan)

Anisakiasis is characterized by acute abdominal symptoms which are caused by eating of *Anisakis* larvae parasitized marine fishes and cuttlefishes. It is no doubt that allergic reactions may play important parts in these manifestations. However, the clinical characteristics are so poor that it is hard to diagnose this disease exactly with the symptoms only.

The author has studied on the immunological diagnosis of anisakiasis and obtained some interesting results. In the present paper were reported the electrophoretic analysis of the antigens from *Anisakis* larvae and the serological investigation by agar double diffusion technique. Cross reactions between *Anisakis* larvae and *Ascaris* adults which appear to belong to the closely allied genus were also observed in this experiment.

The results obtained were summarized as follows :

- 1) Titers in indirect hemagglutination test on rabbit sera immunized with whole worm extracts were obviously higher by homologous than heterologous antigen.
- 2) In Ouchterlony's test with the same sera as above were revealed some differences between homologous and heterologous correspondences.
- 3) Immuno-electrophoresis of those antigens and antisera have shown that antigenic components contained more than 24 in *Anisakis* and more than 26 in *Ascaris*.
- 4) By the absorption test with heterologous antigens the number of precipitin bands decreased obviously in comparing with original pattern, namely, *Anisakis* antibodies were mostly absorbed with *Ascaris* antigen but *Ascaris* antibodies left more than 6 weak bands after absorption with *Anisakis* antigen.

Subsequently, the author isolated the antigenic fractions from the extracts of *Anisakis* with starch-gel electrophoresis and examined the antigenicity of them, and obtained following results :

- 1) On the starch-gels, the whole extracts of *Anisakis* and *Ascaris* gave at least 20 fractions as the corresponding pattern to each other.
- 2) In those fractions 9 sections were marked by expressly deep stained bands, and section 6 was characteristic of *Anisakis* and section 7 of *Ascaris* antigen.
- 3) The gels were cut in transversal slices by marks and each fraction was extracted by high speed centrifugation, and the Ouchterlony's technique was applied. Consequently, section 6 was strongly reacted against *Anisakis* antisera and section 7 against *Ascaris* antisera.
- 4) Both section 6 and section 7 were contained in large quantities in peritric fluids and excretion-secretion collections of worms, but fewer in parenchymal extracts.