

## 糸状虫症の間接赤血球凝集反応用抗原の精製

### (1) 犬糸状虫感染血清における検討

山下隆夫\* 佐藤良也 大鶴正満

新潟大学医学部医動物学教室

(昭和51年1月12日 受領)

Jung and Harris (1960) がイヌ糸状虫感染を診断する目的で、イヌ糸状虫抽出抗原を用いて以来、これをヒト糸状虫症の免疫学的診断にも応用しようという試みがなされてきたが (Kagan, 1963; Pacheco, 1961, 1966; Fujita *et al.*, 1970; 多川ら, 1972; Yamanouchi, 1972; 高岡ら, 1973; Tanaka *et al.*, 1973; Shichinohe, 1973), これまで得られた結果はヒト糸状虫症およびイヌ糸状虫症において特異性ならびに反応性の点でいまだ満足すべきものではないように思われる。その理由としてヒト糸状虫の代わりにイヌ糸状虫が抗原として使用されたこと、使用抗原が粗抗原であったことなどが考えられるが、本虫の粗抗原には種々の複雑な要素が含まれ、他種寄生虫との間の共通抗原成分、また感染血清と反応しない体構成成分の存在などにより、特異性および反応性に欠けていたと思われる。著者らは今回粗抗原から反応にあづかる成分のみを精製する目的で本実験を行った。

#### 材料および方法

##### 1) 材料

イヌ糸状虫 (*Dirofilaria immitis*) 成虫は新潟市で捕獲された野犬の心臓より採取した。

##### 2) 方法

##### a) 虫体全抽出液 (WWE) の作製

虫体を生理的食塩水で充分洗浄、凍結乾燥後、乳鉢を用いて良く磨砕した。この乾燥粉末に4Cのアセトンを加え10分間脱脂したのち8,000rpmで30分遠心し、沈渣にリン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.2) を加えてスターラーで攪拌しながら4C, 48時間の抽出を行った。次いで抽出液を20,000rpmで30分遠心し、上清を凍結乾燥法により濃縮後、ピスキングチューブに入れてPBSで4C 24時間透析した。

##### b) イヌ糸状虫感染血清および全抽出液に対する免疫血清

イヌ糸状虫感染犬血清 (Inf-Di) は虫体を採取したイヌから得た。全抽出液に対する免疫血清 (Anti-WWE) はWWE (10 mg/ml) 2 ml に等量の Freund's complete adjuvant (ヤトロン) を加えて充分混和した後、体重約2 kgの家兎の背側および大腿部の皮下数カ所に接種した。同様の接種を7日間隔で3回行い、最終接種より14日後に頸動脈より全採血を行って血清を分離した。

##### c) DEAE-セルロースカラム・クロマトグラフィー

DEAE-セルロース (Brown) を1.0N NaOH, 1.0N HCl, 再び1.0N NaOHで活性化し、脱イオン水で充分洗浄してからカラム (内径2 cm, 長さ25cm) に高さ15cmになるように充填した。このカラムにpH 7.2の0.005Mリン酸緩衝液 (PB) を流して十分に平衡化した後、あらかじめ同一PBで透析したWWE (蛋白量11.45mg/ml) 20mlを適用して0.005M PBおよびこれに0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.5M, 1.0MのNaClをそれぞれ含む緩衝液を用いて溶出を行なった。溶出液は10mlあて採取し、これらのO.D. 280nmを測定した。

##### d) 間接赤血球凝集反応 (IHAT)

ヒツジ赤血球に抗原を感作する方法は既に報告したように、Boyden (1951) によるタンニン酸処理法の変法を用いた (佐藤ら, 1974)。ヒツジ赤血球をPBSで3回洗浄後、3%浮遊液とし、等量のタンニン酸希釈溶液を加えて、氷水中で15分間処理した。PBSで1回洗浄後、生理食塩水で再び3%浮遊液とし、これに等量の抗原溶液を加えて37C, 15分間混和して血球感作を行なった。感作後の血球は希釈液で4回洗浄したのち1%浮遊液として用いた。希釈液としては無感作ヒツジ赤血球で充分吸収した0.6%正常家兎血清 (NRS), 0.125%ウシ血清アルブミン溶液 (BSA) あるいは0.1%ゼラチンを含むゼラチンペロナル緩衝食塩水 (GVB<sup>++</sup>) のいずれかを

\* 現在 山形大学医学部寄生虫学教室

用いた。至適タンニン酸濃度および抗原濃度は box titration により決定した。被検血清は 56 C, 30分 で非働化し、さらに無感作ヒツジ赤血球で 1 晩吸収して用いた。

抗体の力価測定は microtiter 法によつて行なつた。すなわち V 型 microtray で被検血清 (0.025ml) を 2 倍に連続希釈した後、これに等量の 1% 感作赤血球浮遊液を加えてよく混和し、24 時間室温に放置して凝集の有無を判定した。凝集の程度は Jacobs and Lunde (1957) に準じ、5 段階に分けて 2 プラス以上を陽性とした。

#### e) Ouchterlony 法および免疫電気泳動法

Ouchterlony 法は (Ouchterlony, 1968) および免疫電気泳動法 (Scheidegger, 1955) は、Agarose (Behringwerke) を 1.2% になるようにペロナール塩酸緩衝液 (pH 8.6,  $\mu=0.1$ ) で加熱溶解し、50×76mm のガラス板上に流して固めた厚さ約 2 mm の寒天平板を用いて行なつた。

Ouchterlony 法は寒天板中央に抗血清用の溝 (巾 2 mm) を切り、これと 3 mm の間隔で直径 6 mm の抗原孔をあけ、それぞれに抗血清 (3 倍に濃縮) および抗原液 (蛋白量 80mg/ml) を入れ 48 時間室温で反応させた。この寒天板を大量の 0.9% 食塩水中で 7 日間洗浄し、乾燥後アミドブラック 10B で染色した。また免疫電気泳動法は上記と同じ寒天平板に直径 4 mm の孔をあけ、抗原を入れた後 80V 定電圧で 3 時間泳動した後、抗原孔より 3 mm の位置に抗血清用の溝をつくり、これに抗血清を満たして 48 時間反応させた。寒天平板は Ouchterlony 法の場合と同様の方法で洗浄、乾燥、染色を行なつた。

## 結 果

### 1. 反応条件の決定

Inf-Di 20 例および Anti-WWE 1 例を NRS, BSA および GVB<sup>++</sup> でそれぞれ 4 倍に希釈し、これを 5 万倍タンニン酸で処理後、抗原を感作することなしに希釈液で洗浄した 1% ヒツジ赤血球浮遊液を等量加えて混和し、凝集の有無を判定した。Table 1 に示したように、NRS を希釈液として用いた場合、Anti-WWE では凝集が認められなかつたが、Inf-Di では 11 例に凝集が認められた。BSA を用いた場合、Anti-WWE では凝集が認められず、Inf-Di 3 例において凝集が認められた。さらに GVB<sup>++</sup> を用いた場合、Anti-WWE, Inf-Di 20 例のいずれにおいても凝集が認められず、典型的な陰性パターンであつた。この結果より、イヌ血清を被検血清として IHAT を行う場合、血清を GVB<sup>++</sup> で希釈す

Table 1 Determination of diluents used for IHAT

Sera examined	Diluents		
	NRS	BSA	GVB <sup>++</sup>
Anti-WWE	—	—	—
Inf-Di	+	+	—
	*(11/20)	*(3/20)	(0/20)

Concentration of tannin 1 : 50,000, NRS : normal rabbit serum, BSA : 0.125% solution of bovine serum albumin, GVB<sup>++</sup> : gelatin veronal buffered saline, Anti-WWE : serum of rabbit immunized with whole worm extract of *D. immitis*. Inf-Di : serum of dog infected with *D. immitis*.

\*No. of positive sera/No. of sera examined.

るのが適当であると思われたので、以下の IHAT には希釈液として GVB<sup>++</sup> を用いた。

#### b) 抗原濃度およびタンニン酸濃度

至適抗原濃度およびタンニン酸濃度を決定するために、Anti-WWE と WWE 抗原を用いて検討を行なつた。抗原濃度の検討には、Table 2 に示したように 5 万倍タンニン酸処理ヒツジ赤血球に蛋白濃度 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml の WWE をそれぞれ感作した後、Anti-WWE に対する反応性を調べた。100  $\mu$ g/ml 濃度では 4,096 倍、また 200  $\mu$ g/ml では 8,192 倍、さらに 400  $\mu$ g/ml では 4,096 倍まで陽性と判定されたが、マイクロプレート法での血清希釈における誤差を考慮に入れば大きな差はなかつた。

次に種々のタンニン酸濃度で処理したヒツジ赤血球に 200  $\mu$ g/ml 濃度の WWE を感作したのち IHAT を行なつたところ、Table 3 に示したように、3 万倍濃度で処理した赤血球は GVB<sup>++</sup>, PBS 中でも非特異的凝集が認められた。5 万~10 万倍濃度ではこのような非特異的凝集は認められず、しかも高い反応性を示した。これらの結果より、以下の IHAT には抗原濃度を 200  $\mu$ g/ml, タンニン酸濃度を 5 万~10 万倍として実施した。

### 2. WWE の抗原性

#### a) 免疫電気泳動法による検討

WWE に含まれる抗原成分を分析する目的で免疫電気泳動を行ない、Anti-WWE と Inf-Di に対する免疫電気泳動パターンを Fig. 1 に示した。WWE は Anti-WWE との間に 16 本の明瞭な沈降線が認められたが、Inf-Di とでは 5 本の沈降線が認められたのみで大部分

Table 2 Test for the optimum concentration of WWE (concentration of tannin 1 : 50,000)

Concentration of WWE ( $\mu\text{g/ml}$ )	Immunized rabbit serum 1 : 1 x											GVB <sup>++</sup> PBS	
	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	4,096	8,192	16,384		
100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	+	-	-
200	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	-	-
400	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-	-

WWE: Whole worm extract of *D. immitis*.

Table 3 Test for the adequate concentration of tannin (concentration of WWE 200 $\mu\text{g/ml}$ )

Concentration of tannin 1 : 1,000 x	Immunized rabbit serum 1 : 1 x											GVB <sup>++</sup> PBS	
	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	4,096	8,192	16,384		
30	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-	±	+
50	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
100	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-

WWE: whole Worm extract of *D. immitis*.

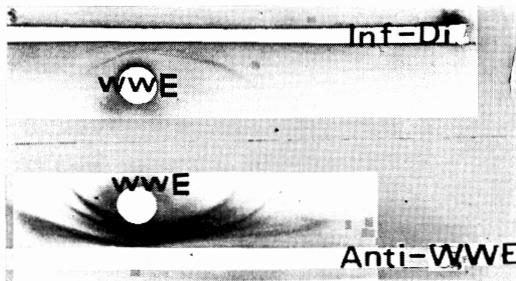


Fig. 1 Comparison in immunoelectrophoretic pattern of WWE against Inf-Di and Anti-WWE. WWE: whole worm extract of *D. immitis*, Inf-Di: serum of dog infected with *D. immitis*, Anti-WWE: serum of rabbit immunized with WWE.

は Inf-Di とは反応しない成分であった。

#### b) IHAT による検討

WWE を用いて先に決定した条件で IHAT を行った結果を Table 4 に示した。この感作赤血球は Anti-WWE には 8,192 倍という良好な反応性を示したが、Inf-Di に対しては 20 例中 5 例が 8 倍以下、12 例が 16~64 倍で、わずか 3 例のみが 128 倍から 256 倍の力価を示したにすぎなかった。これらの Inf-Di はいずれも Ouchterlony 法により WWE との間に明瞭な沈降線が認められた血清であったことから WWE で感作した赤血球のこれら Inf-Di に対する反応性は必ずしも良好ではなかった。

#### 3. DEAE-セルロースカラム・クロマトグラフィーによる抗原の分画

Inf-Di に対する WWE の反応性の低さが WWE 中に含まれる感染血清と反応しない成分によるものであるかどうかを検討する目的で、DEAE-セルロースカラムによる WWE の分画を行った。Fig. 2 はその際の蛋白溶出パターンを示したものである。得られた各画分を濃縮し、ついで PBS で透析後、Inf-Di との間で Ouchterlony 法を行ない、その結果を Fig. 3 に示した。Inf-Di と沈降線が画分 3~6 にみられたが、その中で比較的明瞭に沈降線が認められたのは 0.5M NaCl 濃度で溶出された画分 5 であった。WWE と画分 5 を免疫電気泳動で比較した結果を Fig. 4 に示した。WWE の Anti-WWE に対する沈降線が 16 本であったのに対し、画分 5 では 5 本の沈降線しか認められなかった。

#### 4. 分画抗原による IHAT

画分 5 (蛋白量 200 $\mu\text{g/ml}$ ) を抗原として IHAT を実施し、同一条件で行った WWE と比較した結果を Table 4 に示した。画分 5 の Anti-WWE に対する反応は 4,096 倍であり、WWE を用いた場合の 8,192 倍よりやや低い力価を示したが、反対に Inf-Di に対する反応は 20 例のすべてが WWE の場合より高かった。WWE が 128 倍から 256 倍の反応性を示した Inf-Di は画分 5 を用いた場合、4,096 倍とかなり高い力価の上昇が認められた。同様に WWE が 16 倍から 64 倍の反応性を示した 12 例の感染血清は画分 5 では 16~4,096 倍となり、WWE で

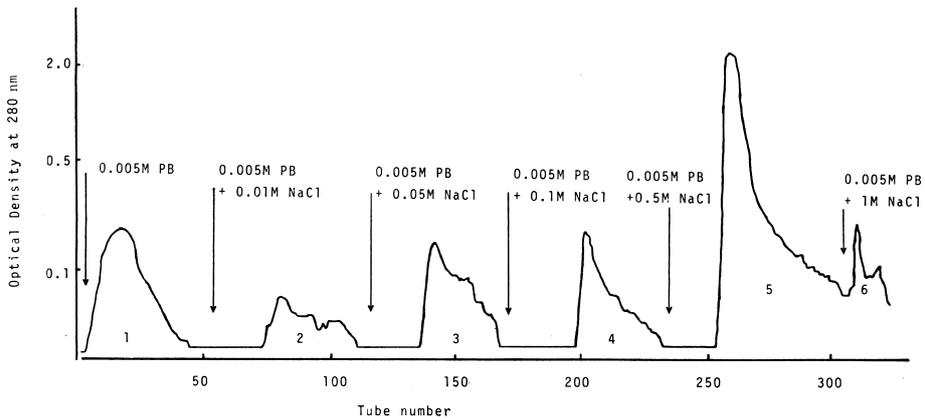


Fig. 2 DEAE-cellulose colum chromatography of whole worm extract.



Fig. 3 Immunodiffusion reaction of each fraction against Inf-Di. WWE: whole worm extract of *D. immitis*, 1, 2, 3, 4, 5, 6: number of each fraction by DEAE-cellulose column chromatography infected with *D. immitis* Inf-Di: serum of dog infected with *D. immitis*.

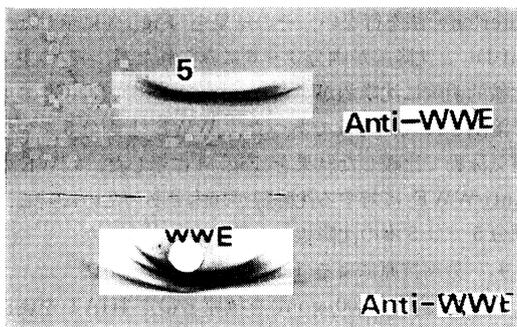


Fig. 4 Immuno-electrophoretic analysis of WWE and Fr. 5. WWE: whole worm extract of *D. immitis*, Inf-Di: serum of dog infected with *D. immitis*, Anti-WWE: serum of rabbit immunized with WWE, 5: fraction number.

Table 4 Antigenic analysis of fractionated antigen in IHAT

Sera examined	IHAT titer	
	WWE	Fraction 5
Anti-WWE	8,192	4,096
Inf-Di	16	2,048
	16	256
	—	256
	16	32
	—	1,024
	—	32
	—	32
	32	64
	32	256
	16	2,048
	64	4,096
	128	4,096
	32	256
	16	16
	32	1,024
	64	64
—	512	
64	256	
128	4,096	
256	4,096	

Anti-WWE: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *D. immitis*, Inf-Di: serum of dog infected with *D. immitis*.

陰性だった 5 例も 32~1,024 倍の力価を示した。

考 察

糸状虫症の確実な診断は血液中にマイクロフィラリアを

検出することであるが、多くの住民を対象として検査を実施する場合、これを免疫学的に screening する試みが数多く行われてきた。特に皮内反応は現地でも容易に

実施でき、特定地域での流行状況を推測する screening test としての利用価値が高く、これまでに多数の研究がみられる。しかし、この反応に関与する因子については、まだ十分な解明がなされておらず、また相当長時間にわたって陽性反応が存続するなどの点から、検査実施時における流行状況の推測や個々の症例の診断にはどの程度の意義をもつかは疑問である。

他方、赤血球凝集反応は血清中の IgG および IgM 抗体が主として関与する反応であり、これらの抗体分子は産生から消退までの期間が比較的短かく、現在の感染の有無についての診断法として利用価値がかなり高いと思われる。IHAT を糸状虫症の診断に応用しようという試みはこれまでに多数みられるが (Jung and Harris, 1960; Kagan, 1963; Pacheco, 1961, 1966; 沢田ら, 1967; Tanaka *et al.*, 1968; Fujita *et al.*, 1970; 佐藤ら, 1970; Ymanouchi, 1972; 多川ら, 1972; Kan-konkar, 1973; 高岡ら, 1973; Shichinohe, 1973; Tanaka *et al.*, 1973), *Litomosoides carinii* 感染コントロールを用いて 90% 以上の一致率をみた Tanaka *et al.* (1968) の報告以外、ミクロフィラリアの存在と IHAT 陽性とが必ずしも一致せず、特にヒト血清においては非特異的反応が強いことが知られている。これらの報告で使用された抗原は沢田ら (1967), 佐藤ら (1970) を除けば WWE が使用されており、種々の複雑な要素が非特異反応に関与しているものと考えられる。著者らが WWE を用いて行なった予備実験でも、赤血球に感作する抗原量が少なければ Inf-Di に対する反応性は著しく低下するし、抗原量を多くすれば非特異的凝集が多くなるなどの結果が得られた。また著者らは広東住血線虫を材料として行なった IHAT においても同様の結果を得ており、これを抗体結合 immunoabsorbent カラムを用いて精製した結果、反応性を著しく高めることができたことから、WWE 中に多量に含まれる宿主血清成分や感染血清と反応しない成分が感作赤血球の感染血清に対する反応性を著しく阻害するか低下させたためと考えられた (佐藤ら, 1974; Sato, 1975)。

今回、著者らの行なった免疫電気泳動による検討でも、イヌ糸状虫 WWE には Inf-Di と反応しない体構成成分を多く含んでいるようであった。このことから WWE を DEAE-セルロースで分画し、Ouchterlony 法によつて Inf-Di と強い反応の認められた画分 5 について IHAT を実施した結果、分画した抗原の蛋白濃度を WWE の場合の濃度と等しくした場合は Inf-Di に対する反応が良好であった。従つてイヌ糸状虫抗原を用

いて IHAT を行う場合、感染血清に対して反応性の成分が非反応性成分よりも相対的に多く含まれるようにある程度の精製を行ない、さらに濃度を調整した抗原液を得ることが必要であると考えられた。またイヌ血清を用いての IHAT では希釈液の選定が重要な因子になることが明らかになった。従来、ヒト血清を被検血清として用いた場合には抗原感作後の血球の洗浄や血清の希釈には NRS が一般に用いられ、結果も良好であるが、今回イヌ血清を検査するために NRS さらに 0.125% BSA を希釈液として用いたところ、多くの偽陽性反応が認められた。一方 GVB<sup>++</sup> ではこの偽陽性反応はなかった。今後さらに適切な希釈液の選定を行なうために詳細な検討を行う必要があると思われた。

今回の成績は抗原として画分 5 のみであるが、他の画分にもわずかながらも沈降線が認められることから、これらの画分についてはさらに検討していきたい、また被検血清としてイヌ血清を用いて得られたものであり、今後はヒト血清についても検討を行う所存であるが反応性の高い結果が得られるかどうかは明らかでなく、また他種寄生虫感染との交差反応の程度などについても更に検討してゆかねばならない。そしてさらにはイオン強度による分画のみではなく、Sephadex カラムなども通してより精製した抗原についての検討も行いたいと考えている。

## 結 語

イヌ糸状虫抗原の精製、それによるイヌ糸状虫感染血清との間の間接赤血球凝集反応を実施した。得られた結果を要約すると次の通りである。

- 1) 全抽出液感作赤血球は感染イヌ血清に対して十分な反応性を示さず、20例中 5 例が 8 倍以下、12 例が 16~64 倍、わずかに 3 例が 128~256 倍の力価を示したにすぎなかった。
- 2) 全抽出液を免疫電気泳動法で検討した結果、これには感染イヌ血清とは反応しない成分が多く含まれ、この非反応性成分が全体として感染血清に対する反応性を著しく阻害または低下させると考えられた。
- 3) 全抽出液を DEAE-セルロースカラム・クロマトグラフィーにより分画し、Ouchterlony 法で感染血清と反応の認められた画分のみを用いて間接赤血球凝集反応を実施したところ、同じ 20 例の感染血清中 6 例が 16~64 倍、8 例が 256~1,024 倍、6 例が 2,048 倍以上の力価を示し、全抽出液を用いた場合と比べて著しく反応性が高められた。

## 文 献

- 1) Boyden, S. V. (1951) : The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.*, 93, 107-120.
- 2) Fujita, K., Tanaka, H., Sasa, M., Shichinohe, K., Asai, Y. and Kurokawa, K. (1970) : Cross reaction among filarial species in hemagglutination test. *Jap. J. Exp. Med.*, 40, 67-77.
- 3) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.*, 43, 308-314.
- 4) Jung, R. C. and Harris, F. H. (1960) : Human filarial infection in Louisiana. *Archs. Path.*, 69, 371-373.
- 5) Kagan, I. G. (1963) : A review of immunologic methods for the diagnosis of filariasis. *J. Parasit.*, 49, 773-798.
- 6) Kankonkar, S., Gatlewar, W. N. and Sant, M. V. (1973) : Diagnosis of filariasis by indirect haemagglutination test. *Indian J. Med. Res.*, 61, 1413-1415.
- 7) Ouchterlony, O. (1958) : Diffusion-in-gel methods for immunological analysis 11. *Prog. Allergy*, 5, 1-58.
- 8) Pacheco, G. (1961) : Studies on the serology of *Dirofilaria immitis* infections. *Diss. Abstr.*, 22, 1308.
- 9) Pacheco, G. (1966) : Progressive changes in certain serological responses to *Dirofilaria immitis* infection in the dog. *J. Parasit.*, 52, 311-317.
- 10) 佐藤久美子・佐藤重房・沢田利貞(1970) : フィラリア症の赤血球凝集反応抗原について, 抗原のFPSD 4 硫安分画および Disc electrophoresis による分画精製について. *寄生虫誌*, 19, 402.
- 11) 佐藤良也・鈴木俊夫・山下隆夫・関川弘雄・大鶴正満・陳秀男・李松玉・劉国輝(1974) : 広東住血線虫症の免疫診断に関する研究. 4. Immunoadsorbent を用いた抗原の精製. *寄生虫誌*, 23, 42-52.
- 12) Sato, Y. (1975) : Applications of the immunoadsorbent to the purification and preparation of specific antigens immunological reactions in helminth infections. *Acta med. biol.*, Niigata, 23, 109-148.
- 13) 沢田利貞(1967) : 抗原分析. *医学のあゆみ*, 61, 321-325.
- 14) Scheidegger, J. J. (1955) : Une micro-methode de l'immuno-electrophoreses. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7, 103-110.
- 15) Shichinohe, K., Tagawa, M. and Kurokawa, K. (1973) : Studies on the diagnosis of canine filariasis with special reference to the comparison of hemagglutination test and skin test. *Jap. Vet. Sci.*, 35, 1-10.
- 16) 多川政弘・七戸和博・黒川和雄(1972) : 犬糸状虫症の診断に関する実験的研究. *日獣医畜産大紀要*, 21, 193-201.
- 17) 高岡正敏・田中寛・神谷正男・城間祥行(1973) : 人糸状虫症の異種糸状虫抗原に対する免疫反応. *寄生虫誌*, 22, 222-228.
- 18) Tanaka, H., Kobayashi, J., Matsuda, H. and Sasa, M. (1968) : Hemagglutination test with *Litomosoides carinii* antigen in the diagnosis of cotton rat filariasis. *Jap. J. Exp. Med.*, 38, 19-25.
- 19) Tanaka, H., Fukui, M., Tagawa M., Kamiya, M., Adachi, T. and Akaike, I. (1973) : Immunologic reactions of filaria-free beagle sera to *Dirofilaria* antigen. *Jap. J. Exp. Med.*, 43, 353-355.
- 20) Yamanouchi, S. (1972) : Immunological studies on filariasis. 1. The relationship between intradermal reaction and hemagglutination. *Kurume Med. J.*, 19, 105-112.

**Abstract**

PURIFICATION OF ANTIGEN FOR THE INDIRECT  
HEMAGGLUTINATION TEST FOR FILARIASIS  
(1) ON THE IMMUNO-DIAGNOSIS OF CANINE FILARIASIS

TAKAO YAMASHITA, YOSHIYA SATO AND MASAMITSU OTSURU  
(*Department of Medical Zoology, Niigata University, School of Medicine,  
Niigata, Japan*)

Purification of high responsible antigens from the whole worm extract of *Dirofilaria immitis* and indirect hemagglutination test using them have been performed against the infected dog sera. Results obtained are summarized as follows.

1) Sheep red blood cells sensitized with the whole worm extract did not show so high response to 20 sera of infected dogs, indicating serum titers under 1 : 16 in 5 sera, 1 : 16-1 : 64 in 12 sera and 1 : 128-1 : 256 in 3 sera.

2) The result of immunoelectrophoretic analysis of the whole worm extract indicated that a large amount of components in whole worm extract did not react the sera from infected dogs and components decreased the sensitivity of IHA test.

3) After fractionation of the extract by DEAE-cellulose column chromatography, the fraction which was clearly reactive to the infected dog sera in Ouchterlony method was used as antigen for indirect hemagglutination test against the same 20 sera mentioned above. The responses to these sera were always much higher than those with the whole worm extract, indicating serum titers of 1 : 16-1 : 64 in 6 sera, 1 : 256-1 : 1,024 in 8 sera and over 1 : 2,048 in 6 sera.