

肝蛭(*Fasciola hepatica*)의 免疫電氣泳動法

가톨릭醫大 寄生蟲學教室 및 가톨릭寄生蟲病研究所

崔 源 永 · 李 玉 蘭

緒 言

免疫電氣泳動法이 처음으로 Grabar와 Williams (1953)에 의해서 確立된 以後에 本法를 利用한 研究가 醫學領域에서 널리 普及되기 시작하였다. 그중 寄生蟲學分野에서는 Biquet등(1961a)과 Kent(1963)는 人은 住血吸蟲에 對해서, Biquet등(1962b)은 絲狀蟲에 對해서, Kagan과 Norman(1963)은 包蟲에 對해서, Capron등(1964)은 肝蛭에 對해서, 또 Capron등(1965)과 辻(1968)는 肺디스토마에 對해서, 또 Tsuji와 Yokogawa (1972)는 日本住血吸蟲症에 對하여 免疫電氣泳動法의 利用을 各各 報告한바 있었다. 한편 우리나라에서도 李와 崔(1972)는 아나사키스, 豚蛔蟲, 肺디스토마 및 肝디스토마에 對하여 Ouchterlony法과 免疫電氣泳動法으로 沈降帶을 관찰하였고 또 崔등(1976)은 肺디스토마의 驅蟲效果를 Ouchterlony法과 免疫電氣泳動法으로 檢討하여 意義있는 結果를 얻은바 있었다. 그런데 이 免疫電氣泳動法의 特色은 寄生蟲에 따라서 泳動像이 달라서 特異沈降帶(specific band)을 證明할 수가 있으므로 免疫學的方法으로 種(species)의 鑑別에 應用될 수 있으며 또 近來에는 患者血清을 材料로 써서 免疫血清學의 診斷方法으로도 脚光을 받게 되었다. 더욱 이 免疫電氣泳動法과 Ouchterlony法은 다른 免疫血清學의 診斷法 即 皮內反應, 補體結合反應, 赤血球凝集反應, 赤血球凝集抑制反應 및 螢光抗體反應등과는 달리 判定에 使用한 泳動板을 永久保管할 수 있고 또 沈降帶의 位置에 따라서 解釋을 내릴 수 있을뿐 아니라 再現性이 또한 높다는 등 많은 長點이 있다. 그러나 免疫電氣泳動法은 熟達된 技術과 實驗하는데 約 1週間이 所要되는 등 難點도 없지 않다. 그러나 Ouchterlony法은 比較

的 手技가 簡單하므로 于先 Ouchterlony法을 實施한후 陽性反應者에 對해서 免疫電氣泳動法을 施行하는 것이 一般의 傾向이다.

著者들은 우리나라에서 各種寄生蟲에 對하여 免疫電氣泳動法을 應用할 目的으로 1次的으로 肝蛭을 材料로 抗原을 만들고 또 이 抗原을 實驗動物에 接種하고 一定期間後에 採血해서 感作血清을 作成하였다. 이들 抗原과 抗血清 사이의 Ouchterlony法과 免疫電氣泳動法을 實施하여 沈降帶形成의 樣相을 관찰하였다. 한편 이 肝蛭抗原을 Sephadex로 分離하여 分離抗原과 感作血清間의 沈降帶形成도 아울러 檢討하고자 本實驗을 企圖하였다.

材料 및 實驗方法

1. 抗 原

肝蛭成蟲의 0.1% 食鹽水抽出液을 凍結乾燥시킨 粉末을 粗抗原으로 使用하였다. 即 成蟲體를 乳鉢에서 適當量의 0.1% 食鹽水和 함께 乳鉢으로 磨碎시킨후 -20°C의 冷凍庫에서 凍結시킨후 다시 磨碎시켰다. 이 課程을 2~3日 동안에 걸쳐 6~8回 反復하였다. 이 抽出液을 10,000 rpm으로 1時間 低溫遠心시키고 上清液을 visking tube에 넣은後 4°C에서 12時間 透析한후 冷凍乾燥시켰다. 實驗은 이 乾燥抗原 20mg를 0.1ml의 蒸溜水로 溶解시켜서 使用하였다. 한편 粗抗原을 Sephadex G-200(Tris-HCl-NaCl 완충액)으로 流出시켜서 蛋白質量에 따라서 第Ⅰ 第Ⅱ 및 第Ⅲ 分割으로 分離하여 分割抗原을 만들었다(Fig. 1). 또한 對照抗原으로 肺디스토마, 肝디스토마 및 雙口吸蟲도 肝蛭抗原과 같은 方法으로 만들었다.

2. 感作血清

約 2kg 體重의 健康한 家兎들에게 한마리當 肝蛭抗原 20mg를 0.5ml의 生理食鹽水에 溶解시킨것과 0.5ml의 Freund's complete adjuvant의 懸濁液을 週 1回씩

本論文의 概要는 1978年度 大韓寄生蟲學會春季學會席上에서 發表하였음. 또한 이 論文의 研究는 1978年 가톨릭 中央醫療院 學術研究費로써 이루어진 것임.

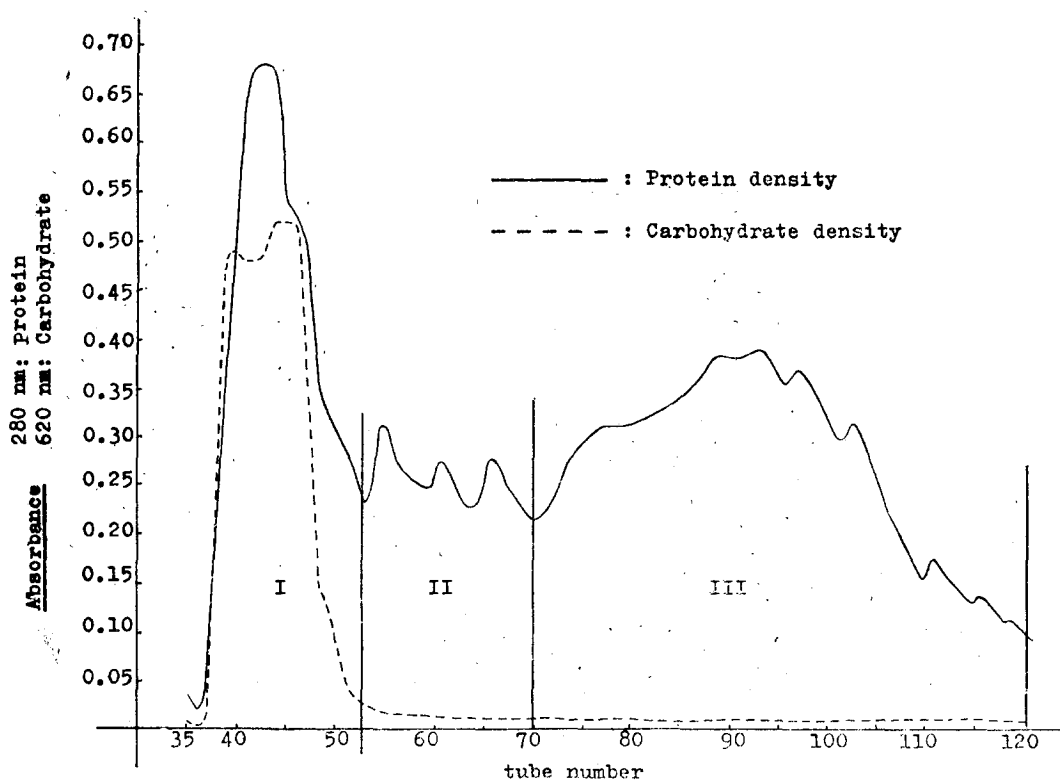


Fig. 1. Fractionation of *Fasciola hepatica* crude antigen on Sephadex G-200.

家兔의 腋窩部에 10回 注射하고 最終注射 1週口後에 全採血하여서 肝蛭感作家兔血清을 만들었다.

3. Ouchterlony法

Agarose (Hoechst製)를 barbital 완충 食鹽水(pH 8.2)로 0.9%가 되도록 섞은후 85~90°C로 重湯溶解시켜서 1邊이 4cm되는 正四角形의 유리板위에 3ml를 부어서 두께가 2mm되도록 寒天板을 만들었다. 中央에 直徑 7mm의 구멍을 만들고 5mm 거리의 周圍에서 亦是 直徑 7mm의 구멍을 만든후 抗原과 感作血清을 各各 注入하였다. 그후 이 寒天板을 moist chamber에 넣고 室溫에서 24時間 그리고 다시 4~6°C의 冷蔵庫內에 48時間 反應시킨후 barbital加 生理食鹽水로 1日 1回씩 3日間 洗滌한다음 Whatman No. 1 여과지로 싸서 風乾시키고 그후 amido black 10B로 染色하였다. 이어서 2% 醋酸液으로 餘分의 染料를 脫色하여 沈降帶를 관찰하였다.

4. 免疫電氣泳動法

本法도 역시 0.9% agarose를 重湯融解시켜서 支持體로 하였다. 1邊이 9.5cm 및 4cm의 直四角形의 유리 寒天板을 만들었다. 이 寒天板中心에서 陰極쪽으로 直

徑 4mm의 抗原孔을 만들어 여기에 抗原을 채운후 Whatman No. 1 여과지로 陽極과 陰極을 連結하여 泳動시켰다. 血清溝는 泳動方向과 平行하여 幅이 3mm 길이 9cm로 만들었다. 泳動板의 兩端 即 寒天板上의 陰陽極의 電壓差를 20±2V/11cm 길이로 되도록 tester로 調整한후 3時間 通電하였다. 泳動후 미리 잘라두었던 血清溝의 寒天을 除去하고 그溝에 感作血清을 注入하였다. 그 후 Ouchterlony法과 같은 方法으로 反應시키고 染色과 脫色후에 沈降帶를 觀察하였다.

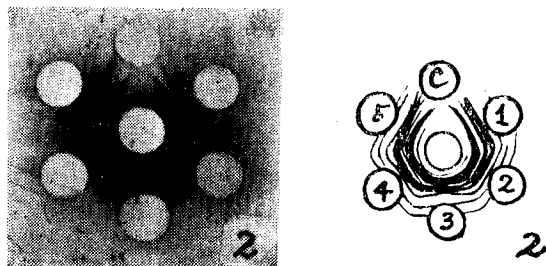


Fig. 2. Central well: *F. hepatica* crude antigen
Outer wells Control: normal rabbit serum
1, 2, 3, 4 & 5: Sensitized anti-*F. hepatica* rabbit sera.



Fig. 3. Central well: *F. hepatic* crude antigen
Trough: Sensitized anti-*F. hepatica* rabbit sera

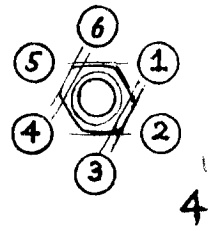
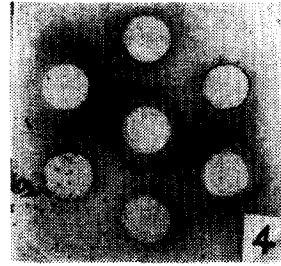


Fig. 4. Central well: Sensitized anti-*F. hepatica* rabbit serum

1 & 4: *C. sinensis* antigen
2 & 5: *Paramphistomum* anigen
3 & 6: *P. westermani* antigen

實驗成績

肝蛭粗抗原과 同種의 感作家兔血清사이의 Ouchterlony 法에서는 9個의 沈降帶를 볼수 있었다(Fig. 2). 한편 免疫電氣泳動法에서는 11個의 沈降帶를 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한 같은 吸蟲類에 屬하는 肺디스토마抗原, 肝디스토마抗原 및 雙口吸蟲抗原과 肝蛭

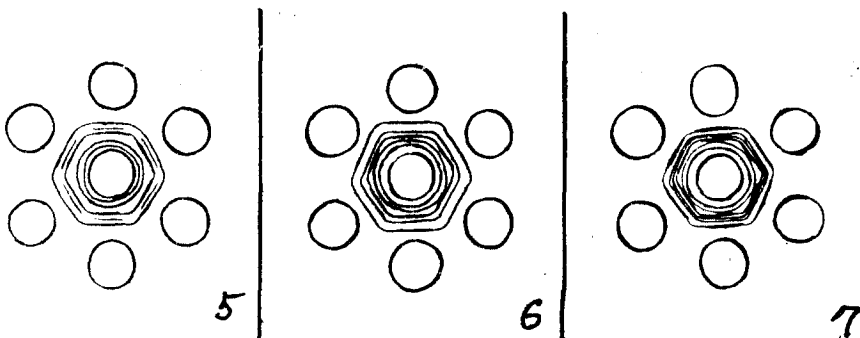
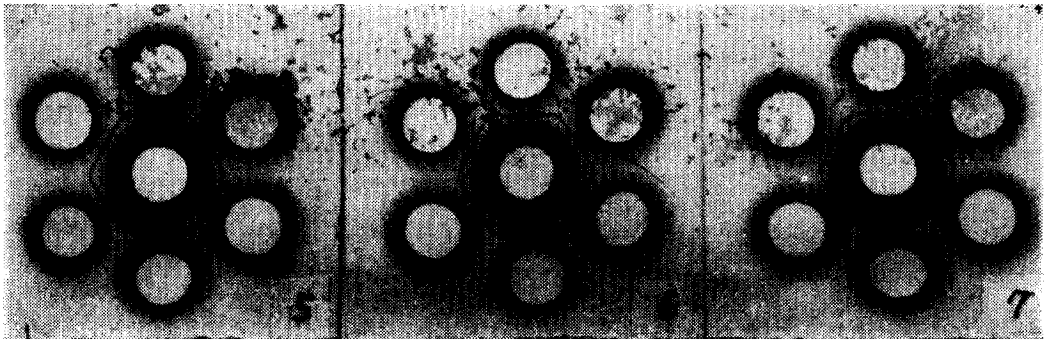


Fig. 5. Central well: anti-*F. hepatica* serum absorbed with *P. westermani* antigen
Outer well: *F. hepatica* crude antigen

Fig. 6. Central well: anti-*F. hepatica* serum absorbed with *C. sinensis* antigen
Outer well: *F. hepatica* crude antigen

Fig. 7. Central well: anti-*F. hepatica* serum absorbed with *Paramphistomum* antigen
Outer well: *F. hepatica* crude antigen

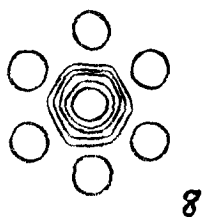
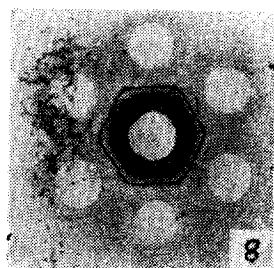
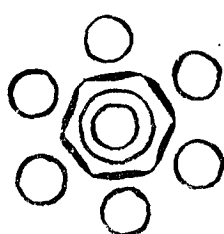
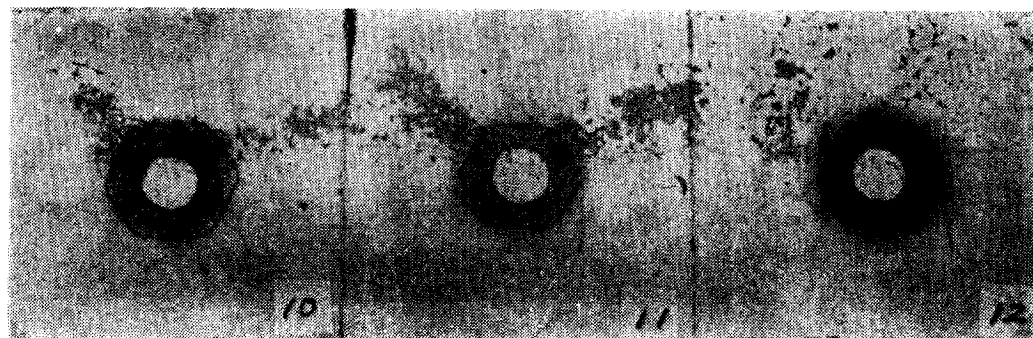


Fig. 8. Central well: anti-*F. hepatica* serum absorbed with *P. westermani*, *C. sinensis* and *Paramphistomum*
Outer wells: *F. hepatica* crude antigen

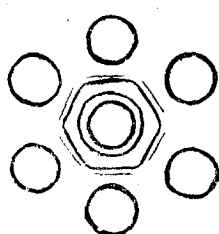
感作家兔血清과의 Ouchterlony法에서는 各各 3個씩의 沈降帶를 볼 수 있었다(Fig. 4). 또 肝蛭感作家兔血清 1ml에 肺디스토마抗原 20mg를 混合시킨후 37°C에서 3時間 反應시키고 다시 4°C에서 12時間 反應시킨후 遠心沈澱하여 上清液을 肺디스토마吸收 肝蛭血清으로 삼았다. 이와 똑같은 方法으로 各各 肝디스토마抗原에 吸收시킨 肝蛭血清과 雙口吸蟲抗原으로 吸收시킨 肝蛭血清과 肝蛭粗抗原사이의 Ouchterlony法을 實施한 結果는 各各 5個, 5個 및 6個의 沈降帶를 관찰할 수



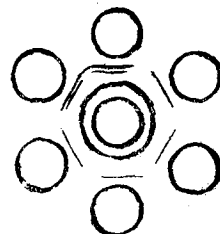
Fig. 9. Well: *F. hepatica* crude antigen
Trough: anti-*F. hepatica* serum absorbed with *P. westermani*, *C. sinensis* and *Paramphistomum*



10



11



12

Fig. 10. Central well: anti-*F. hepatica* serum
Outer wells: 1st fraction of *F. hepatica* antigen
Fig. 11. Central well: anti-*F. hepatica* serum
Outer wells: 2nd fraction of *F. hepatica* antigen
Fig. 12. Central well: anti-*F. hepatica* serum
Outer wells: 3rd fraction of *F. hepatica* antigen

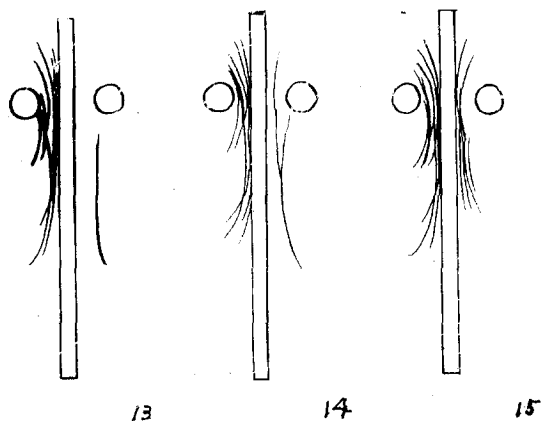


Fig. 13. Rt well: 1st fraction of *F. hepatica* antigen
Lt well: *F. hepatica* crude antigen
Trough: anti-*F. hepatica* serum

Fig. 14. Rt well: 2nd fraction of *F. hepatica* antigen
Lt well: *F. hepatica* crude antigen
Trough: anti-*F. hepatica* serum

Fig. 15. Rt well: 3rd fraction of *F. hepatica* antigen
Lt well: *F. hepatica* crude antigen
Trough: anti-*F. hepatica* serum

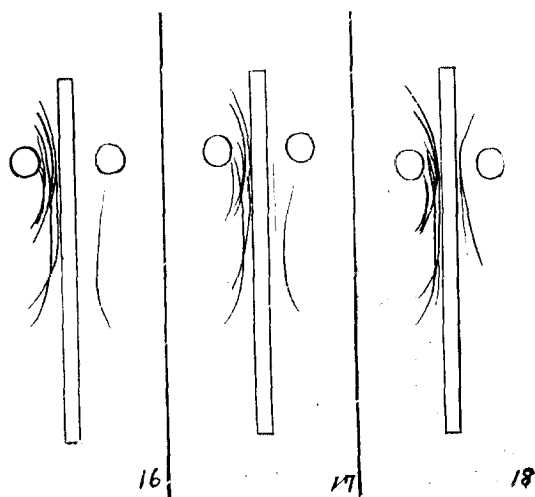
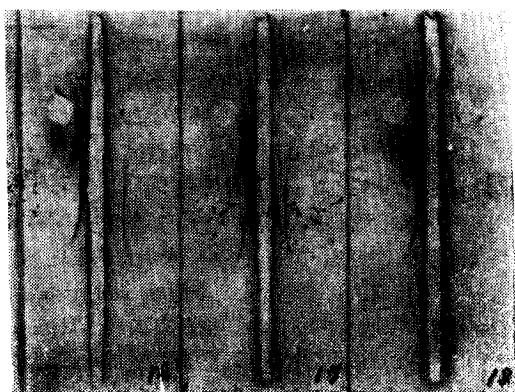


Fig. 16. Rt well: 1st fraction of *F. hepatica* antigen
Lt well: *F. hepatica* crude antigen
Trough: absorbed anti-*F. hepatica* serum

Fig. 17. Rt well: 2nd fraction of *F. hepatica* antigen
Lt well: *F. hepatica* crude antigen
Trough: absorbed anti-*F. hepatica* serum

Fig. 18. Rt well: 3rd fraction of *F. hepatica* antigen
Lt well: *F. hepatica* crude antigen
Trough: absorbed anti-*F. hepatica* serum

있었다(Fig. 5, 6 및 7). 또한 肝蛭感作血清을 肺니스토마 및 雙口吸蟲抗原으로 同時에 吸收시킨 肝蛭吸收血清과 肝蛭粗抗原사이의 Ouchterlony 法에서는 4個의 沈降帶를 볼 수 있었고 (Fig. 8) 免疫電氣泳動法에서는 7個의 沈降帶를 관찰할 수 있었다(Fig. 9). 한편 肝蛭粗抗原을 Sephadex G-200으로 流出시켜서 얻은 第Ⅰ 第Ⅱ 및 第Ⅲ分劃抗原(Fig. 1)과 肝蛭感作家兔血清사이에서의 Ouchterlony 法에서는 各各 3個씩을 그 樣相이 相異한 沈降帶를 볼 수 있었고(Fig. 10, 11 및 12), 免疫電氣泳動法에서는 各各 2個 3個 및 5個씩의 沈降帶를 볼 수 있었고 (Fig. 13, 14 및 15) 이번에는 肝蛭感作家兔血清을 肺니스토마, 肝니스토마 및 雙口吸蟲抗原으로 同時에 吸收시킨 吸收肝蛭家兔感作血清과 第Ⅰ, 第Ⅱ 및 第Ⅲ分劃抗原사이에서의 免疫電氣泳動法을 實施한바 各各 1個, 1個 및 2個의 沈降帶를 볼 수 있었다. 그중 第Ⅰ分劃抗原과 第Ⅱ分劃抗原과의 反應에서의 沈降帶는 同一한 位置에 있었다(Fig. 16, 17 및 18).

考 察

1. Ouchterlony 反應에 對하여

肝蛭粗抗原과 이抗原으로 感作시킨 家兔抗血清사이에서 Ouchterlony 反應으로 9個의 沈降帶를 볼 수 있었다. 그런데 이들 沈降帶는 3個씩의 沈降帶가 그 位置와 染色程度가 相異하여 最少限 3群의 類似한 抗原抗體群으로 다시 大別되었고 各群마다 다시 3個의 沈降帶로 細分할 수 있었다. 따라서 多樣한 抗原抗體反應속에는 몇個의 類似한 抗原成分이 있음을 짐작할 수 있었다. 李와 崔(1972)가 몇가지 蠕蟲類에 對한 Ouchterlony反應에서 線蟲類인 豚蛔蟲과 아나사키스의 抗原抗體反應 및 吸蟲類인 肝니스토마와 肺니스토마의 抗原抗體反應에서 線蟲類와 吸蟲類間에서는 交叉反應이 없었으나 線蟲類사이 그리고 吸蟲類사이에서는 交叉反應을 보인 점을 감안하여 本實驗에서는 肝蛭感作家兔血清과 肺니스토마 抗原사이, 또 肝蛭感作血清과 肝니스토마抗原사이, 그리고 또 肝蛭感作血清과 雙口吸蟲사이의 本反應을 實施한 바 4個, 3個 및 3個씩의 沈降反應을 볼 수 있었으나 肝蛭感作血清과 肝蛭抗原사이에 比하여는 沈降帶數나 染色樣相이 훨씬 低下된 것을 알 수 있었다. 그러나 이들 吸蟲類사이에서도 亦是 有意한 交叉反應이 있음을 알 수 있었다. 한편 肝蛭感作血清을 肺니스토마抗原으로 吸收시킨 吸收血清과 肝蛭抗原 또 같은 方法으로 肝蛭感作血清을 肝니스토마抗原으로 吸收시킨 吸收血清과 肝蛭抗原사이, 또한 같은 方法으로 雙

口吸蟲으로 吸收시킨 吸收血清과 肝蛭抗原사이의 Ouchterlony反應의 結果는 各各 5個, 5個 및 6個의 沈降帶를 볼 수 있었는데 이들 3者 사이의 沈降帶의 樣相이 매우 類似한 pattern을 보였으나 이들 사이의 相關關係를 解析하기는 困難하였다. 또 肝蛭感作血清을 肺니스토마抗原, 肝니스토마抗原 및 雙口吸蟲抗原으로 同時에 吸收시킨 吸收血清과 肝蛭抗原사이의 本反應의 結果는 前者의 各各 別途로 吸收시킨 結果와 거의 같은 樣相을 보여주었다. 끝으로 肝蛭感作家兔血清과 肝蛭分劃抗原사이의 本反應에서는 第Ⅰ分劃 第Ⅱ分劃 및 第Ⅲ分劃과의 사이에서 모두 3個씩의 沈降帶를 보여주었는데 그 位置와 染色樣相에서 第Ⅰ分劃과의 抗原抗體反應의 가장 뚜렷하였다.

2. 免疫電氣泳動法에 對하여

本法에 對해서 辻(1975a)는 肺니스토마患者 46名이 本法으로 100% 陽性이었다고 하였고 그중 38名(82.6%)에서는 特異沈降帶를 認定하였다고 한다. 또 日本住血吸蟲症患者 21名에 對해서도 本法은 100%의 陽性反應을 보였고 그 중 17名(81.0%)에서는 亦是 特異沈降帶를 볼 수 있었다고 한다. 또 辻(1975, b)는 여러가지 蠕蟲抗原에 對하여 同種感作血清間의 沈降帶를 관찰하였더니 많은 沈降帶를 볼 수 있었고 異種抗原抗體間에서는 同種間에서 보다 적은 沈降帶를 관찰할 수 있었다고 한다. 卽 이제까지의 分類學的으로 遠近關係라고 생각된 바와 같은 樣相이 本反應에서도 認定할 수 있었다고 한다. 著者들은 肝蛭粗抗原과 同種感作家兔血清사이의 免疫電氣泳動法에서 11個의 沈降帶를 보았고 한편 肝蛭感作家兔血清을 肺니스토마抗原, 肝니스토마抗原 및 雙口吸蟲抗原으로 吸收시킨 吸收血清과 同種抗原의 免疫電氣泳動法에서는 9個의 沈降帶를 관찰하여 一部交叉反應을 除去할 수는 있었다고 하나 特異沈降帶를 決定할 수는 없었다. 特異沈降帶를 決定하려면 共通抗原으로 豫想되는 多數의 各種抗原으로 感作血清을 吸收시키는 한편 抗原도 보다 精製할 必要가 있을 것으로 생각된다. 그리하여 이번에는 肝蛭抗原을 Sephadex G-200으로 流出시켜서 얻은 分離抗原을 第Ⅰ, 第Ⅱ 및 第Ⅲ分劃으로 나누었고 이들 分離抗原과 肝蛭感作家兔血清 및 이血清을 肺니스토마抗原 肝니스토마抗原 및 雙口吸蟲肝蛭으로 吸收시킨 吸收血清사이의 免疫電氣泳動法을 實施한 結果는 兩者사이에서 有意한 相異點을 發見할 수 없었으나 第Ⅰ分劃과 第Ⅱ分劃에서는 共通的인 沈降帶를 볼 수 있었다.

要 約

肝蛭에 對한 特異抗原物質의 究明과 抗原分離에 따른 分劃別 沈降帶의 Ouchterlony法과 免疫電氣泳動像을 관찰하였다. 即 肝蛭粗抗原을 Sephadex G-200 (Tris-HCl NaCl 완충액)으로 流出시켜 蛋白質量에 따라서 第Ⅰ, Ⅱ 및 Ⅲ分劃으로 나누었다. 이들 各分劃과 肝蛭粗抗原으로 免疫시킨 家兔感作血清 사이의 沈降帶 形成의 樣相을 Ouchterlony反應과 免疫電氣泳動法으로 관찰하였고 한편 肺니스토마抗原, 肝니스토마抗原 및 雙口吸蟲抗原을 對照로 하였다. 同時에 肝蛭感作家兔 血清을 이들 對照抗原으로 各各 單獨으로 또는 同時에 吸收시킨 吸收血清과 各抗原사이의 特異沈降帶形成與 否도 아울러 檢討하였다.

1. 肝蛭感作家兔血清과 肝蛭粗抗原사이의 Ouchterlony反應은 9個, 그리고 免疫電氣泳動法으로는 11個의 沈降帶를 관찰할 수 있었다.

2. 肝蛭感作家兔血清과 肺니스토마抗原 肝니스토마抗原, 그리고 雙口吸蟲抗原사이의 Ouchterlony反應에서는 各各 4個, 3個, 3個의 沈降帶形成을 觀察할 수 있었다.

3. 肝蛭感作家兔血清을 肺니스토마抗原 肝니스토마抗原, 그리고 雙口吸蟲抗原으로 各各 吸收시킨 吸收肝蛭血清과 肝蛭粗抗原사이의 Ouchterlony反應에서는 各各 5個, 5個 및 6個의 沈降帶를 觀察하였다.

4. 또한 肝蛭感作家兔血清을 肺니스토마抗原 肝니스토마抗原 그리고 雙口吸蟲抗原으로 同時에 吸收시킨 肝蛭吸收血清과 肝蛭粗抗原사이에서 Ouchterlony反應은 5個의 沈降帶를 보였고 免疫電氣泳動法에서는 7個의 沈降帶를 볼 수 있었다.

5. 肝蛭作家兔血清과 肝蛭抗原의 第Ⅰ, 第Ⅱ 및 第Ⅲ分劃과의 免疫電氣泳動法은 各各 2個, 3個 및 5個의 沈降帶를 보여주었다.

6. 肝蛭感作家兔血清을 肺니스토마抗原 肝니스토마抗原 및 雙口吸蟲抗原으로 同時에 吸收시킨 吸收肝蛭血清과 肝蛭抗原의 第Ⅰ, 第Ⅱ 및 第Ⅲ分劃사이의 免疫電氣泳動法사이에서는 各各 1個, 2個 및 2個의 沈降帶를 觀察하였는데 그중 第Ⅱ分劃과 第Ⅲ分劃의 一個 沈降帶는 同一部位에 位置하였다.

參 考 文 獻

Biguet, J., A. Capron et P. Tran Van Ky (1962a). Les antigènes de *Schistosoma mansoni*, I. Étude

électrophorétique et immunoélectrophorétique. Caractérisation des antigènes spécifiques. Ann. Inst. Past., 103: 763-777.

Biguet, J., R. D'haussy, A. Capron, Tran Van Ky P. et M. Aubry (1962b). Les antigènes de *Onchocerca volvulus*. I. Étude immuno-electrophorétique Préliminaire. Bull. Soc. Path. exot., 55: 845-855.

Capron, A. J., Biguet P., Tran Van Ky et G. Rose (1964). Possibilités nouvelles dans le diagnostic immunologique de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica*. Mise en évidence d'anticorps sériques par immunoélectrophorèse. Press Méd., 72: 3103-3107.

Capron, A., M. Yokogawa, J. Biguet, M. Tsuji et Luffau, G. (1965). Diagnostic immunologie de la paragonimose humaine. Mise en évidence d'anticorps sériques spécifiques par immunoélectrophorèse. Bull. Soc. Path. exot., 58: 474-487.

崔源永·木村公彦·辻守康(1976). 實驗的 肺니스토마 症의 驅蟲效果判定을 爲한 免疫電氣泳動法, 기생충학잡지, 14: 94-102.

Grabar, P. et C.A. Williams (1953). Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de Protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. Biophys Acta, 10: 193-194.

Kagan, I.G. and L. Norman (1963). Analysis of helminth antigens (*Echinococcus granulosus* and *Schistosoma mansoni*). Ann. N.Y. Acad. Sci., 113: 130-153.

Kent, N.H. (1963). Comparative immunochemistry of larval and adult forms of *Schistosoma mansoni*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 113: 100-113.

李玉蘭·崔源永(1972). 몇가지 蠕蟲類의 免疫電氣泳動 自然, 3: 1-10.

辻守康(1968). 免疫電氣泳動法による寄生蟲學領域の研究. 醫學のあゆみ, 67: 531-536.

Tsuji, M. and M. Yokogawa (1972). Studies on the immunodiffusion tests of *Schistosoma japonicum*. Research in Filariasis and Schistosomiasis, 2. Univ. Tokyo Press. 165-177.

辻守康(1975a). 寄生蠕蟲症의 免疫學的 診斷法. 綜合醫學, 24: 2113-2118.

辻守康(1975b). 數種寄生蠕蟲類의 感作血清による免疫電氣泳動像의 比較研究. 寄生蟲學雜誌, 24: 227-236.

=Abstract=

Immunoelectrophoresis for *Fasciola hepatica*

Won-Young Choi & Ok-Ran Lee

Department of Parasitology, Catholic Medical College &

Catholic Institute for Parasitic Diseases

In an attempt to investigate the specific antigenic substance of *Fasciola hepatica*, Ouchterlony tests and immunoelectrophoretic analyses were carried out. Crude *Fasciola* antigen was prepared and fractionated by sephadex G-200 column to Antigen I, II and III according to protein content. Crude antigens of *Paragonimus westermani*, *Clonorchis sinensis* and *Paramphistomum* sp. were also prepared for control and absorption study. Antiserum was prepared by injecting 0.5ml of crude *Fasciola* antigen with same amount of complete Freund's adjuvant in rabbits, 10 times at an interval of 1 week.

The results obtained in this study were as follows:

1. Crude *Fasciola* antigen reacted with antiserum with 9 precipitin bands by Ouchterlony test and with 11 bands by immunoelectrophoresis.

2. Cross reaction was observed between *Paragonimus*, *Clonorchis* and *Paramphistomum* antigens and anti-*Fasciola* rabbit serum respectively. By Ouchterlony test, 3-4 cross reacting bands were found.

3. Anti-*Fasciola* sera which were absorbed with respective *Paragonimus*, *Clonorchis* and *Paramphistomum* antigens, reacted with *Fasciola* crude antigen. Ouchterlony test gave 5-6 precipitin bands. Further reaction between *Fasciola* antigen and antiserum absorbed with the above 3 antigens concomitantly gave 5 precipitin bands by Ouchterlony test and 7 bands by immunoelectrophoretic analyses.

4. Fractionated *Fasciola* antigens (Antigens I, II & III) reacted with anti-*Fasciola* rabbit serum in immunoelectrophoresis. Antigen I, II and III gave 2, 3 and 5 precipitin bands respectively. Anti-*Fasciola* rabbit serum which was absorbed with 3 trematodes antigens gave, by immunoelectrophoresis, 1 band with Antigen I, 2 bands with Antigen II & III of *Fasciola hepatica*.

From the above results, it is concluded that *Fasciola hepatica* possessed the specific antigenic substance not cross-reacted with other trematodes.