HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ツベルクリン蛋白の抗原性に関する研究：II 分画成分の蛋白酵素消化試験
Author(s)	奥山, 春枝; 太田, 明彦; 森川, 和雄
Citation	結核の研究, 17-18, 7-18
Issue Date	1963-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26730
Type	bulletin (article)
File Information	17_18_P7-18.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ツベルクリン蛋白の抗原性に関する研究

II 分画成分の蛋白酵素消化試験

奥山春枝・太田明彦・森川和雄
（北海道大学結核研究所病理部）

純粋なツベルクルン活性物質を分離しようという試みは，30年以上も続けられているが，まだその目的は達せられていない。我々も数年前よりこの問題にとりくみ，その第1報はすでに発表した。[1] 即ち，結核菌培養を行つた Sauton 培地の非加熱濾液から三塩化醋酸沈澱で得た蛋白を，電気泳動と ion 交換体を用いた column chromatography で更に分離を試みたのである。そして，沈降反応抗原性の強い画分と，皮内反応抗原性の強い画分を分離したが，完全に分離するというまでには至らなかつた。結核の皮内反応，ひいては遅延型反応発来の機序を知るためには，遅延型反応のみをおこす純粋な抗原物質を得ることがどうしても必要なことであるので，今回も又同じ目的で，前回とは異なるツベルクリン lot から分離を試みた。尚更に，蛋白と結合乃至は混入している糖成分の関与の如何をみるために，蛋白酵素による消化試験を合わせ行なつた。

実験材料及び実験方法

1. ツベルクリン蛋白 (TPt 6)

人型結核菌 H37Rv を Sauton 培地で9週間培養，その非加熱培養濾液から，前報[1] と同様に三塩化醋酸 (pH 4.0) 沈澱法で蛋白画分を得た。今回用いた蛋白画分は，6番目の培養 lot から分画したものに当るので，TPt 6 と称する。これの N_2 含量は 10.29 % (micro-Dumas 法)，糖含量は 1.88 % (Anthrone 法，葡萄糖に換算) である。

2. DEAE-cellulose による column chromatography

i) Column chromatography I

使用した column は DEAE-cellulose (0.8 mq/g) を用い，4 x 35 *cm* のものである。予かじめ 0.005 M NaH_2PO_4 pH 7.0 で平衡状態に達せしめておいた。TPt 6 594 mg を同じ緩衝液 100 ml に溶解，これを 30 ml/h の速度で column の上より流し込んだ。そのあと，下記の展開液を階段状に変えて展開を行なつた。各使用展開液量は，溶出されてくる蛋白量により適宜変更した。

展開液

I. 0.005 M NaH_2PO_4 pH 6.8
II. 0.1 M phosphate buffer + 1.0 M NaCl pH 7.0
III. 0.1 M phosphate buffer + 1.0 M NaCl pH 4.0
IV. 0.1 N NaOH
V. 1.0 N NaOH
VI. 1.0 N HCl

各画分は 30 ml づつ集め，直ちに pH を中性に調整後，各々について蛋白量 (Cu-Folin 法，750 mμ)，糖量 (Anthrone 法，620 mμ) を測定し，その量により展開曲線を書いた。

ii) Column chromatography II

前述の1回目の展開でえた I～III 展開液による画分を，更に次の展開液を用いて分画した。これに用いた蛋白量は 280.9 mg である。

I. 0.005 M phosph. buffer pH 7.0
II. 0.01 M NaH_2PO_4 pH 6.0
III. 0.01 M 〃 + 0.05 M NaCl pH 5.7
IV. 〃 + 0.1 M NaCl pH 4.5
V. 〃 + 0.2 M NaCl pH 4.5
VI. 0.01 M NaH_2PO_4 + 0.4 M NaCl pH 4.5
VII. 〃 + 0.6 M NaCl pH 4.5
VIII. 〃 + 1.0 M NaCl pH 4.5
XI. 〃 + 1.0 M NaCl pH 7.0
X. 0.1 N NaOH

各 30 ml づつ分けた画分を前述と同様方法で蛋白量，糖量の測定をし，展開曲線を作製した。

iii) Column chromatography III

1回目の展開の 0.1 N NaOH で溶出した画分及び2回目の展開の最初に出た画分は，何れも展開曲線に2つの峯が形成されたので，もう1度分画した。何れも 0.1 N NaOH で溶出した。

尚以下に並べる諸反応は，これら展開曲線の peak に当る画分を抗原として行なつた。

3. 沈降反応

H 37 Rv 結核加熱死菌 10 mg を 0.5ml の生食水に溶解し，これに Arlacel 1 : Drackeol 9 の割に混じた adjuvant を等量加えた乳濁液を5日おき3回皮下注射を行なって家兎を感作し，血清抗体価が高くなってから適宜

採血して抗血清をえた。但し，同一実験で各画分間の抗原力価を測定する時は，同一血清で一度に全部を行なって比較した。沈降反応は，抗原（分画成分）稀釈と抗血清稀釈を組合わせて，重層法で行なつた。抗体価は，反応陽性を示した抗血清の最高稀釈倍数（倍数稀釈）で表わし，抗原価は同じく陽性を示した分画成分の最高稀釈（10倍数稀釈）で表わした。

4. 皮内反応

抗血清をえた同じ感作兎群の背部を用いて，分画成分を抗原として反応を行なった。分画成分は，生食水で一夜氷庫内透析後 100 γ/ml 蛋白濃度に稀釈し，その 0.1 mlを皮内注射し，1，3，6，24，48，72時間後その部分の発赤の大きさ，硬結による増加した皮膚の厚さを測定した。皮内反応部組織の顕微鏡的所見の観察のためには，上記判定時間に2個づつ反応部皮膚を切りとり，ホルマリン固定後，パラフイン切片を作製して hematoxylin-eosin 染色で観察した。

5. 蛋白酵素による消化試験

i) Trypsin 消化試験

0.65% sod. bicarb. で 10 γ/ml に溶解した Trypsin (Nutritional Biochemicals Corporation) を，蛋白量に対し 1/100 量の割合に加えて，37°C 5日間処置した。対照として，trypsin 溶液の代りに 0.65 % sod. bicarb. 溶液だけを加えて同時に処置したものをおいた。5日後，直ちにそれを抗原として沈降反応を行ない，又各画分蛋白量 100 γ/ml として皮内反応抗原性をしらべた。

ii) Pronase 消化試験

これは，分画成分が量的に不足したために，TPt 6 そのものについて行った。TPt 6 2 mg/ml に1 20 量の pronase（プロナーゼP，科研）を 0.65% sod. bicarb. に溶解した溶液を等量加え．37°C 24時間処理した。その後直ちに血清応抗原として用いた。尚対照として，pronase を入れないで 37°C 24時間おいたもの，及び血清反応を行なう直前に同じ割合に pronase を入れた画分を抗原として反応を行なった。

6. 超遠心分析

各画分の peak 画分を，最初の TPt 6 作製の時と同様に三塩化醋酸を加えて沈澱させることにより濃縮し，Spinco Type E を用いて超遠心分析を行なった。Synthetic boundary cell を使用した。

7. 寒天内沈降反応

Ouchterlony の double diffusion method を応用した，周辺の6個の孔に各画分を入れ，3枚の plate で各画分間にできる沈降線の相互関係を求めた。

成　　績

1. Column chromatography でえた展開曲線

1回目の展開でえた展開曲線を図1に示した。大きく3つの画分に分けられる。0.1 M phosphate + 1.0 M

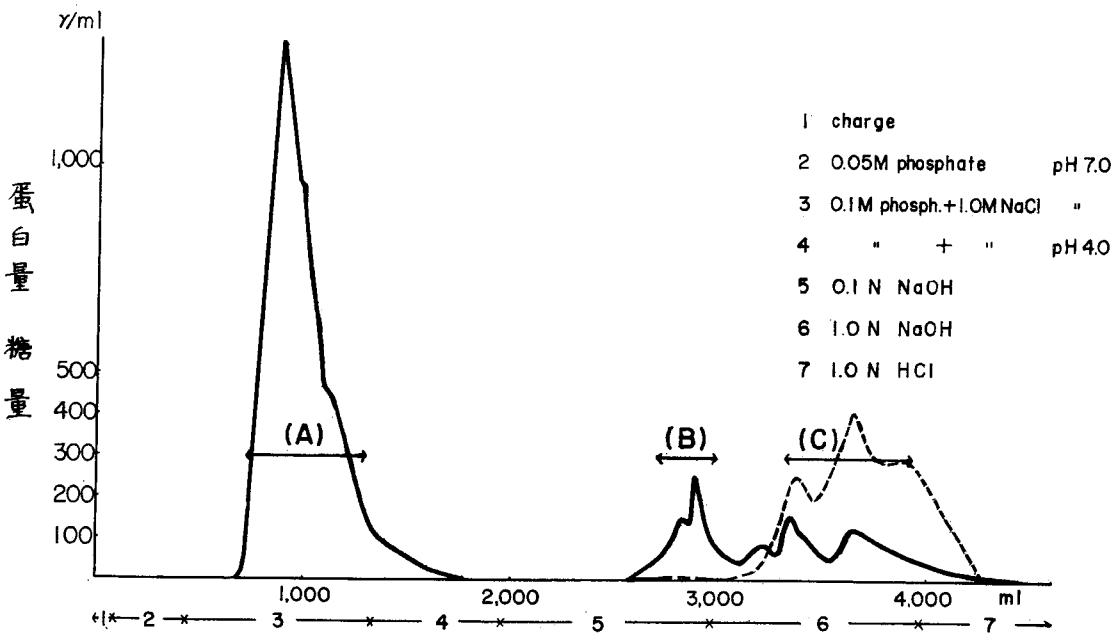

図 1　ツベルクリン蛋白(TPt 6)のDEAE-cellulose による分画（第1回）
(TPt 6　549 mg)

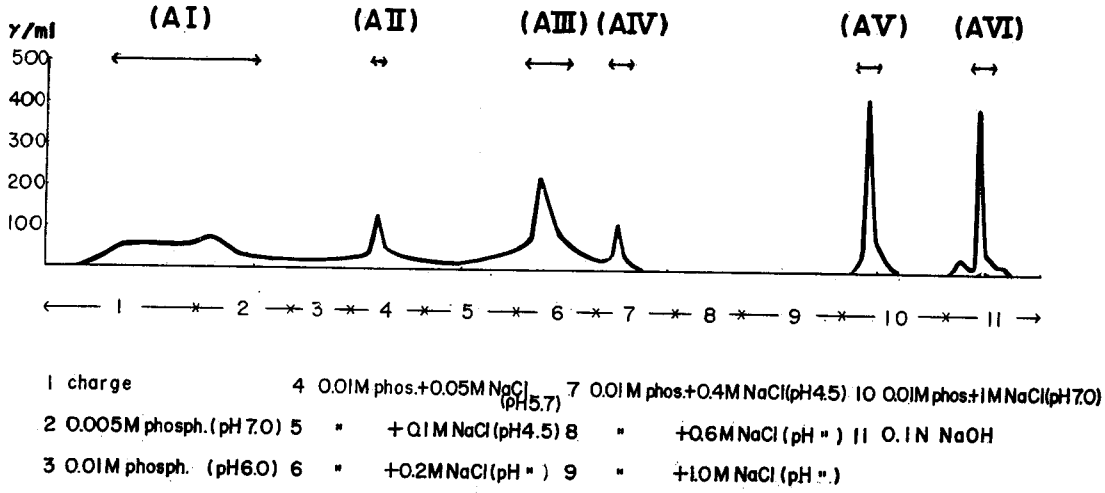

図 2　第 2 回 分 画　第 1 回分画のA画分 (280.9 mg)

NaCl pH 7.0 で溶出されたものをA画分とした。使用した蛋白量の大半はここに溶出された。0.1 N NaOH で溶出されたものをB画分とし，そのあと column に残つている蛋白を全部溶出するために 1.0 N NaOH を通して出たものをC画分とした。このC画分は蛋白の変性が高度であると思われるし，又後に述べる各血清反応，皮内反応抗原性が極度に低いことから，この研究対照から除外し，専らA及びB画分について諸反応抗原性を追求した。

A画分は展開液に 1.0 M NaCl という大量の塩を加えて溶出されたもので，これをもっと小さな段階で塩濃度を変えることにより，更に細かく分画されることが予想されるので，第2回の分画を行なつた。図2にみるように6分画をえた。それぞれ初めから，A I, A II, A III, A IV, A V, 及び A VI と名付けた。このA画分は第1回の分画で，1.0 M NaCl 濃度で溶出された画分であるが，第2回では同じ塩濃度でもなお column に残つている部分がかなりありそれを0.1 N NaOH で溶出したのが A VI 画分である。従って DEAE-cellulose による展開中にかなり蛋白質に変性をもたらすことが推定される。

第1回分画のB画分の展開曲線は2つの峯を作っており，又第2回分画の A I 画分は蛋白量 100 γ/ml 以下の低い，しかもはっきりとした peak を作らない曲線を示したので，この両者を更に column にかけ溶出した。何れも 0.1 N NaOH で溶出させたもので，再展開というよりも濃縮の意味が強い。ここでB画分は量は少ないが非常に高濃度の液をうることができた。

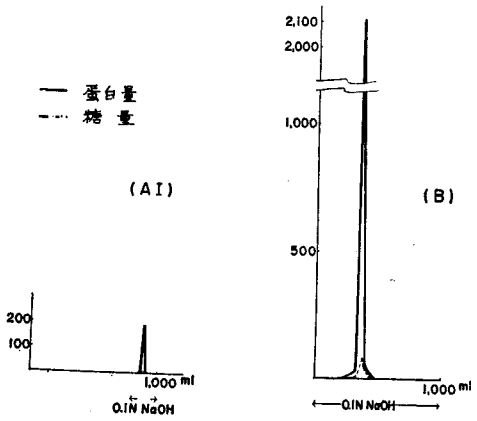

図 3　第 3 回 分 画

表 1　分 画 成 分 の 性 状

	A I (A1-31)	A II (A53)	A III (A79)	A IV (A92)	A V (A132)	A VI (A150)	B (B15)
蛋 白 量 γ/mℓ	194.0	106.0	205.0	205.0	352.0	336.0	2,400.0
糖 量 γ/mℓ (蛋白量に対する%)	7.9 (4.1)	2.5 (2.4)	3.5 (1.7)	2.9 (1.9)	0 (0)	15.7 (4.7)	23.4 (1.0)
Molisch 反 応	+	−	±	±	−	++	++

2. 分画成分の性状

各画分の蛋白量曲線で peak をなした部分だけを諸反応に用いて，その性状を表1に示した。ここに記した蛋白量は， peak の溶出したままの蛋白含量を表わしている。従つて各画分ばらばらの値を示している。糖量即ち Anthrone 法で測定した値及び Molisch 反応も，そのままの溶出液について測定したものであり，カッコ内の値が蛋白量に対する糖量の割合を示している。糖含量は各画分でかなり異なるのがみとめられる。

3. 分画成分の沈降反応抗原性

沈降反応抗原は，溶出液そのままを原液として，それの10倍数稀釈を行なつた。従ってそれぞれの抗原原液の蛋白濃度は前述の蛋白濃度であって，各画分異なる濃度である。ここに用いた抗血清の抗体価は，抗原各画分を分画する前の sample である TPt 6を抗原として,64倍稀釈陽性を示すものである。各画分の抗体価は図にみるようにばらばらの値であり， TPt 6 と同じ64倍稀釈陽性は A V 画分のみであった。従って各画分がそれぞれ異なる抗体の存在を示していることになる。抗原価は，分画成分の稀釈倍数で表わすのであるが，10倍稀釈陽性は A VI 画分のみで，他は A I を除いて原液でのみ陽性を示した。B画分は蛋白濃度が非常に高いにもかかわらず原液のみで陽性であった。A VI 画分は，A II～A V 画分の蛋白濃度と同じか或いはせいぜい1.5倍程度であるにもかかわらず，10倍まで陽性ということは，高活性因子の存在を示している。A I 画分が陰性であるのは，活性因子をもたないか，あるいは抗原濃度がうすいためと考えられる。

4. 分画成分の皮内反応抗原性

皮内反応は，実験方法で述べたように，蛋白量を100γ/ml に統一してその 0.1 ml を皮内に注射してしらべた。従って反応に用いた蛋白量は 10γ に相当する。図5にみられる TPt 6 を抗原とした反応が，48時間を頂点とする反応で，結核兎における定型的な遅延型反応と我々は判定している。そこで，各画分の反応をみると，その peak を6時間，24時間及び48時間の3種の反応に分けることが出来る。このうち6時間 peak を示すものは速時型反応に入れるべきものであり，48時間 peak は TPt 6 にみられる反応と同じであって，定型的遅延型反応とみなされる。24時間 peak は丁度この両者の混合型に相当する。従つて定型的な遅延型反応はB画分にだけみられ，しかも注射直後の局所の浮腫が消褪後1時的に反応は減弱（3時間後）し，そのあと48時間迄直線的に増強しているのは，TPt 6 よりも初期の速時型反応因子が殆んど除かれていることを示している。

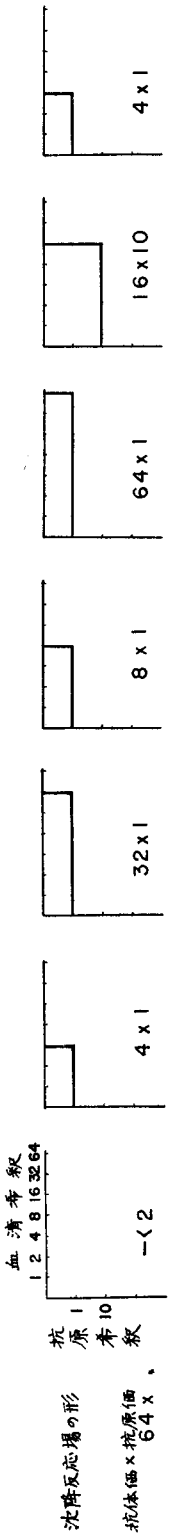

図4 分画成分による沈降反応

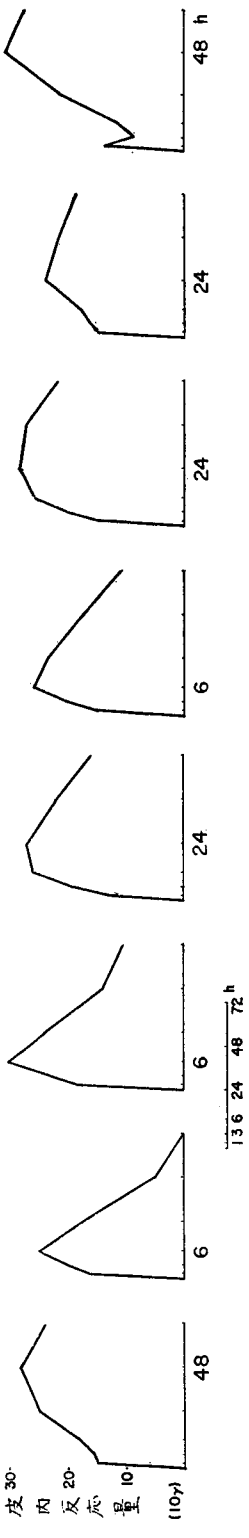

図5 分画成分による皮内反応

表 2　皮内反応組織所見

経過時間	浸潤細胞の種類						浸潤細胞変性		浮腫		血管拡張		血管内細胞集積		血管周囲細胞浸潤	
	多核球		単球		リンパ球											
	AII	B	AII	B	AII	B	AII	B	AII	B	AII	B	AII	B	AII	B
1	++	+	−	−	−	−	−	−	+++	+	+	−	+++	+	+++	+
3	+++	+	−	±	−	−	−	−	+++	+	++	−	++	+	+++	+
6	+++	++	±	+	−	−	−	−	+++	+	+	−	+	±	++	+
24	+++	++	+	++	−	±	−	−	+	++	±	+	−	+	±	+++
48	++	+	++	+++	±	+	++	−	±	±	−	±	+	+	−	++
72	+	±	++	+++	+	+	+++	−	−	−	−	±	−	−	−	−

皮内反応の組織学的所見

定型的な速時型反応を示した AII 画分と，遅延型反応を示した B 画分による皮内反応の時間的経過を，hematoxylin-eosin 染色による組織標本で追求した。表1に示したように，AII 画分による反応は，1時間目から浮腫，細胞浸潤が明らかとなってきて，最高は6時間後に達している。24時間後から減退し始め，48時間ではかなり減弱し，浮腫は殆んど消失している。浸潤細胞は多核球が主体で，6時間目に最も多く，この他浮腫が強いのが特長的である。又血管周囲の細胞浸潤が6時間迄強くみとめられる。これに反し，B 画分による反応は，6時間後からはっきりした細胞浸潤が現われ始め，48時間が最強である。6時間後では多核球が中等度に出ているが，そのあとに続く24，48，72時間の反応では，全般の細胞浸潤の程度が増強するにつれ，単球の浸潤が著明となっている。AII 画分に比し浮腫ははるかに弱く，又浸潤細胞の変性が AII 画分では48，72時間に著明となっているのに反し，B 画分では72時間に僅かにみられるにすぎない。

このようなツベルクリン蛋白画分による速時型の反応が，非特異的な刺戟によるものではないかを検討するために次の実験を行なった。

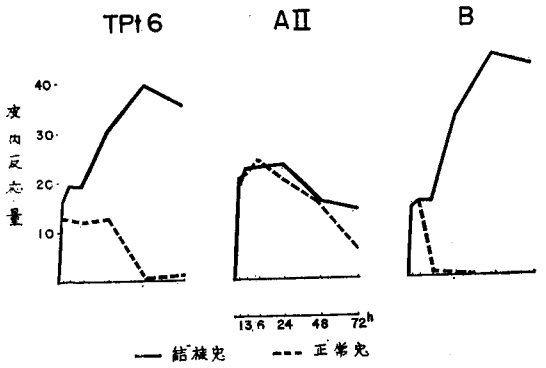

図 6　結核兎と正常兎の皮内反応

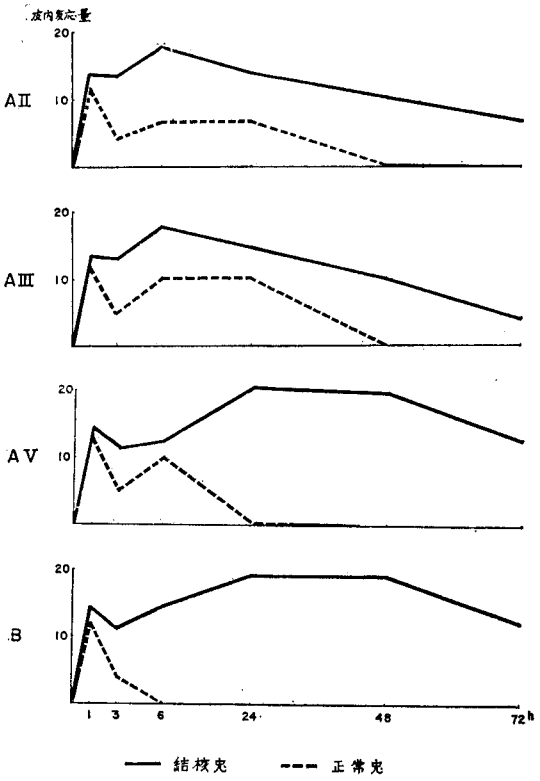

図 7　分画成分による皮膚の特異的反応と非特異的反応の分離

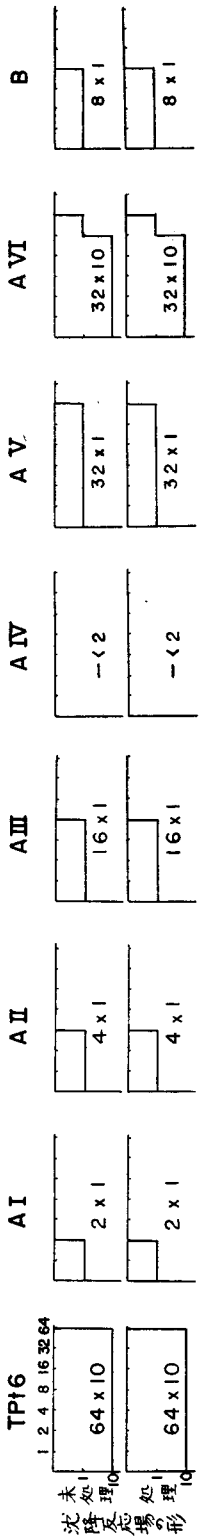

図8　Trypsin 消化成分による沈降反応

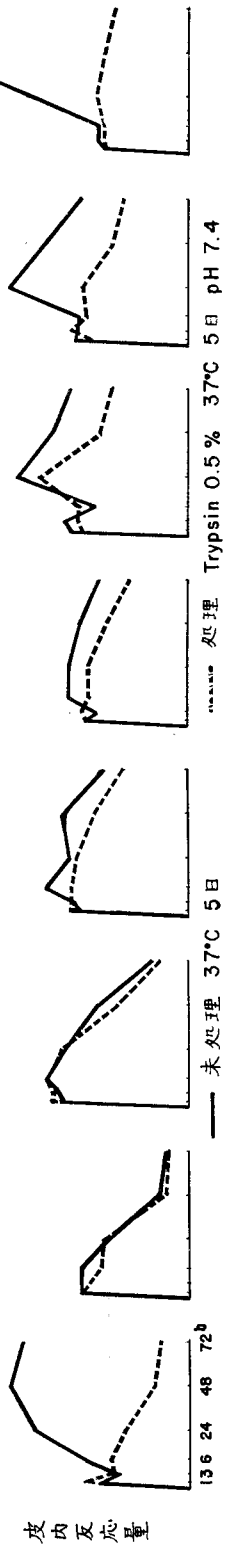

図9　Trypsin 消化成分による皮内反応

5.　分画成分による速時型反応原性の吟味

先ず，TPt 6，A II 画分及びB画分について今迄我々の用いた抗原量 10γ を，正常兎と結核兎の両者の皮内に注射して，その時間的経過を追ってしらべた。図6にみるように，A II 画分では正常兎と結核兎の反応が全く同じであるが，B画分では3時間まで同じであるが，そのあと正常兎では全く反応が消失し，結核兎における反応だけが強くなっている。TPt 6 では，正常兎における反応はB画分より長びくが，A II 画分よりは弱い。従って A II 画分にみられた反応が，非特異的反応と区別がつかないので，抗原液を更に稀釈したもので反応をしらべた。

A II，A III，A V，B画分のそれぞれ 10γ，1γ，0.1γ，0.01γ を正常兎及び結核兎の皮内に注射した。図7には 0.1γ 注射時の反応の時間的経過を示した。注射局所の1時間目の浮腫を除いては，3時間，6時間後においても明らかに結核兎の方が強い反応を示した。即ち非特異的刺戟とは別に速時型反応の抗原物質が確かにあることを示している。

6.　蛋白酵素による消化試験

1) Trypsin 消化試験

実験方法で述べた条件で，分画成分を消化した後直ちに反応性をしらべた。図8にみられる沈降反応抗原性は，trypsin 処理をしたものと，trypsin を入れないで同じ条件においた対照と全く同じ抗体価及び抗原価を示した。即ち，trypsin 消化は沈降反応抗原性には全く影響を与えない。この際の trypsin 消化の程度は，消化後画分の三塩化醋酸による沈澱上清の Cu-Folin 法測定から計算すると，約70～90％である。

処理後の分画成分 10γ で皮内反応を行うと，24時間以後の反応，即ち遅延型の反応に明らかに減弱がみられた。即ち，速時型の反応，これには前に述べたように非特異的反応もかなり含まれているが，全く影響なく，遅延型反応原物質のみが消化されたことを示している。

2) Pronase 消化試験

Pronase は trypsin よりも広範囲に作用するといわれるので，これによる消化試験を試みた。沈降反応抗原性に蛋白酵素が全く影響しないのかどうかを再度確かめるために行ったのであるが，分画成分が少なくて使用できなかつたので，分画する前の sample である TPt 6 を直接消化した。

結果は図 10にみるように全く抗原性の減弱はみられなかった。抗体価ではむしろ試験管1本の上昇を示した。この上昇の理由ははっきりしないが，pronase 処理により抗原活性部分の露出ということも一応考えられるであろう。

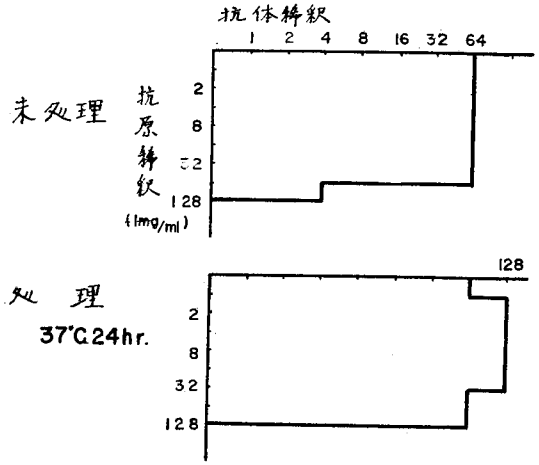

図 10　TPt 6 の Pronase 消化試験—沈降反応

7.　分画成分の超遠心分析

Chromatography で溶出されたままの濃度ではうすくて分析には不向きであるので，実験方法で述べたように三塩化醋酸で沈降させて濃縮した回転は 22 × 10^4 g で，0 分と 20 分後の写真を図 11 に示した。どの画分にも塊の分離はみられないが，A IV 画分では 20 分で左右の傾斜がかなり異なるのがみられた。又この画分だけが特に沈降恒数が高い値を示した。

Sw 20	A II	0.68
	A III	0.62
	A IV	1.96
	A V	0.56
	A VI	0.56
	B	0.43

8.　寒天内沈降反応

我々の用いた Ochterlony 法での，抗原成分にかなりの蛋白濃度と，量を要するので，今回えた sample には限りがあるために，この実験は予備的なものである。3つの plate を用いて，周辺の6つの抗原槽に分画成分を入れる組合わせを変えることにより，各画分間の沈降線の関係をしらべた。それによって判定しえた線を a～g と命名した。A II 及び A VI 画分では線を証明することができなかつたが，これは抗原濃度がうすいためと考えられる。A III，AIV，A V 及び B 画分でそれぞれ2乃至

表 3　寒天内沈降反応線の解析

	A II	A III	A IV	A V	A VI	B
		a	a			
		b				
			c	c		
		d	d	d		d
			e	e		
			f	f		
						g
蛋白質	80γ	460γ	520γ	1060γ	170γ	1344γ/ml

5本の線を識別できたが，お互に共通した線が多くみられる。特に d は全部に通じてみられた。即ち，抗原成分がまだかなりまざり合っていることを示している。A III 画分の b，B 画分の g は単独にみられた。しかし前述のように sample の都合上各々の性格をこれ以上詳しくしらべることができなかった。

総括及び考按

結核菌培養を行なった Sauton 培地から，三塩化醋酸沈澱法でえたツベルクリン蛋白を，我々は TPt と称して，数年前よる旧ツベルクリンの代りにツベルクリン反応抗原として使用している。この力価は，兎の皮内反応では 10γ で丁度旧ツベルクリンの 40 倍稀釈液と同程度の反応の強さを示すので，この量を用いてきた。又このTPt は沈降反応原としても旧ツベルクリンに比し判定の容易な明瞭な反応を示す。しかしこれは専ら重層法を用いた場合の抗原としてであって，定量沈降反応に用いる場合には，きれいな最適点をうることができないために，この反応への使用は満足されない。皮内反応抗原としても，24 乃至 48 時間を頂点とする遅延型反応ではあるが，3 乃至 6 時間の速時型反応の混合もあり，純粋な遅延型反応のみとはいわれない。従って，遅延型反応の機転を研究するためツベルクリン反応を利用しようとするには，必然的に抗原の純粋さということが問題となってくる。又，血清反応と皮内反応の抗体間の問題の追求も重要な課題であるが，これにも又抗原の純粋さが第一の難関となることである。

前回の報告[1] で我々は，電気泳動と DEAE-cellulose column chromatography の組合わせで TPt を更に分画して，遅延型皮内反応原性の強い画分と，沈降反応抗原性の強い画分に或程度迄分離しえた。そして，血清反応抗原性も皮内反応抗原性も蛋白成分と関聯しているであろうと推定した。今回は，DEAE-column chromatography だけで分離できるかどうか，又特に沈降反応抗原性の点で蛋白成分のみが関与しているのかどうかを他の方

面から追求しようとして実験を行なったのである。

DEAE-cellulose column chromatography による分画方法は，蛋白質の分画方法として障碍性の少ない方法として広く用いられているが，今回の結果よりみると，或程度の変性がおこると思われる。それは，再展開の際，同じ緩衝液で完全に溶出してしまうことができなかつたことから推定される。即ちＡVI 画分の存在である。但し，その１部は，急激に異なる緩衝液で一度に溶出した時には，余分の蛋白も同時に溶出されるということによるものも含まれていると思われる。各画分で Anthrone 法及び Molisch 法何れも反応陰性を示した画分はＡV 画分のみで，他は1.0～4.7％程度に糖成分を含んでいた。DEAE-chromatography のみでは両者の完全な分離はむずかしいと思われる。この少量に含まれる糖成分は糖蛋白として含まれると考えるのがよいであろう。

さて，各画分による沈降反応をみると，全く各画分ばらばらの値である。抗原の力価という場合は，抗原稀釈をもつて判定されるが，何れも同程度，ＡVI 画分だけが10倍稀釈陽性で最高であつた。このうちＢ画分は蛋白濃度が他に比し非常に高いにもかかわらず10倍稀釈陰性であることから，この画分が最も活性が低いといえる。又抗体価についてみると，各々異なる価であることは，各々異なる抗原抗体系で反応していることを示している。我々が結核血清で抗体形成の程度を知るのはこの抗血清稀釈の価をみているのであるから，その意味では抗体価最高を示す抗原が反応原として使用するのに最も優秀なわけで，その点ではＡV 画分が最も高値を示した。この値は分画前の TPt 6 を抗原とした場合と同じである。このように，結核兎には非常に多種類の沈降反応性抗体が作られているのがわかる。この沈降反応の抗原物質が純粋な蛋白によるものか，或は少量に含まれる糖成分によるものか，それを判定する１つの方法として蛋白酵素による分解を試みた。8，10図に示したように，trypsin 消化，pronase 消化 何れにも全く影響されない成績が出た。 pronase は広範囲の蛋白の消化に利用しうるし，又強力である，我々の TPt の分解も75％に達した。従って倍数稀釈による試験方法では少くとも抗原価で1/4になることが予想されるが，全く変動がなく，むしろ抗体価において１段階の上昇を示した。このことは，この反応における蛋白の関与を否定し，蛋白と結合している何かが反応原となっていることを考えさせる。この決定群が何であるか，多糖体成分ではないかと考えるのが自然であるが，現在のところ直接的な証明ができなかつたので推論の域にとどまっている。しかし，我々が蛋白画分をえたツベルクリンから分離した多糖体画分による沈降反応では，抗原性が非常に弱く，又抗体価も低いことから考えると，蛋白成分と結合している多糖体成分に抗原性がある。即ち，反応の場ではなくて，抗体産生の場において蛋白と結合していることが大きい作用をなしているのではないかと考える。

次に皮内反応抗原性であるが，各画分 10γ でそれぞれ異なる又応型式を示しているが，その最高の強さは大体同程度であり，Ｂ画分だけは他よりかなり強い反応であった。前回の報告と同様に，展開の初期に出てくる画分は速時型で，中間型を経て，最後のＢ画分では定型的な遅延型反応を示している。この反応型式は，組織所見でも遅延型を示している。速時型即ち６時間 peak の反応は，組織学的には多核球性反応であった。これは又非特異的反応と区別することがむずかしい。そのために，抗原稀釈という方法で非特異的反応を出来るだけ除外してみると，確かに６時間 peak の速時型アレルギー反応の存在を認めることができた。速時型と遅延型反応物質の違いが，分子の大きさの差によるものかどうか，今回我々は分子量の測定まではできなかったが，沈降恒数では差異が認められなかった。又抗原成分としての蛋白の役割について，蛋白酵素消化の影響をみると，trypsin 消化だけについての観察であるが，24時間以後の反応に明らかな低下を示した。これより，少なくとも遅延型反応は蛋白成分によるものといえる。

Ｂ画分による反応が，我々は純粋な遅延型反応であると判定するのであるが，前報の場合と同様，この画分は0.1 N NaOH で溶出される成分である。そのことは，燐酸緩衝液と異なり，或程度の変性がおきるであろうことが考えられる。 gelatin や変性蛋白による遅延型反応に関する研究が最近多数[2]みられるが，ツベルクリン蛋白においても同様なことがいえるかどうか，抗原活性を低下しない程度の変性の影響ということが今後の実験的証明を必要とするであろう。我々の用いている三塩化燐酸沈澱蛋白の活性が強いということが，この変性蛋白の活性ということと連がりがあるかもしれないと考えている。

最後に，抗原分析の面で最近広く応用されている寒天内沈降反応法を，我々も各分画成分で試みたが sample が少ないことから，濃度が充分に高く出来ないため，ＡIII，ＡIV，ＡV，Ｂ画分しか反応線の分析が出来なかった。これらの４画分についてみると，かなり沢山の抗原成分が混合していることがわかる。完型的遅延型反応を示したＢ画分においてさえも２本の線が明らかに識別できた。各々の線を構成する抗原成分の性格は，今回の実験では追求することができなかった。

最近米田ら[4,5,6]は，硫安分画でえたツベルクリン蛋

白を，電気泳動及び ion 交換 chromatography で精製をくり返し，純粋な蛋白成分を分離したと報告している。これらの純粋な蛋白画分が沈降反応或は皮内反応で如何なる抗原性を示すか興味のあるところであるが，それに関する実験の報告にはまだ接していない。我々の行なった DEAE-column chromatography のみでの分画では，純粋な蛋白成分にするということには成功しなかったが，遅延型皮内反応抗原物質としてはかなり優秀な画分をうることが出来る。今後もっと他の方法との組合わせを考え，生物学的活性との関連性をもたせて追求していきたいと思っている。

結　　論

1．H37 Rv 結核菌の Sauton 培養濾液から三塩化酢酸沈澱でえたツベルクリン蛋白を DEAE-cellulose column chromatography で更に分画し，7画分をえた。

2．沈降反応抗原性の高い画分と，遅延型皮内反応抗原性の高い画分を分離することが出来た。

3．沈降反応抗原性は，蛋白酵素により消化されず，非蛋白性状であることを示した。

4．遅延型皮内反応抗原性は，蛋白酵素の作用を受け，著明な反応活性の減弱を示した。

5．皮内反応抗原性については，「ツ」蛋白画分には遅延型のみでなく速時型反応を惹起する抗原成分も認められた。

6．寒天内沈降反応により，各分画成分はまだかなり沢山の抗原成分からなることが証明された。

文　　献

1) 奥山，太田，森川：結核の研究，**15**，45 (1961)
2) Ouchterlony, Ö.: Progress in Allergy, p. 1, vol. 5, Basel, New York (1953)
3) Gell, P. G.H. & Benacerraf, B.: Advances in immunology, p. 319, vol. 1, Academic Press, New York (1961)
4) Yoneda, M. & Fukui, Y.: Biken's J., **4**, 25 (1961)
5) Yoneda, M. & Fukui, Y.: Biken's J., **4**, 121 (1961)
6) Fukui, Y. & Yoneda, M.: Biken's J., **4**, 187 (1961)

写 真 説 明

分画成分皮内注射時の組織学的所見。(H. E. 染色)

Fig 1：A II 画分注射後3時間，血管内の多核球集積と，瀰漫性の多核球浸潤がある。浮腫が強い。

Fig 2：同上6時間。細胞浸潤は更に強さを増し，殆んどが多核球である。浮腫着明。

Fig 3：同上24時間。浸潤細胞は多核球が主で，僅かに単核細胞の出現がある。

Fig 4：同上48時間。浸潤細胞は変性壊死におち入り，集塊状をなして来ている。全体の細胞浸潤は減弱している。

Fig 5：B 画分注射後3時間。軽度の多核球浸潤が瀰漫性にみられる。浮腫は殆んどみられない。

Fig 6：同上24時間。単球を主とした細胞集団が多数みられる。多核球が僅かにみられる。

Fig 7：同上48時間。血管を中心にした単核細胞集積が更に高度にみられる。

Fig 8：同上48時間皮膚深層の単球性細胞集団。

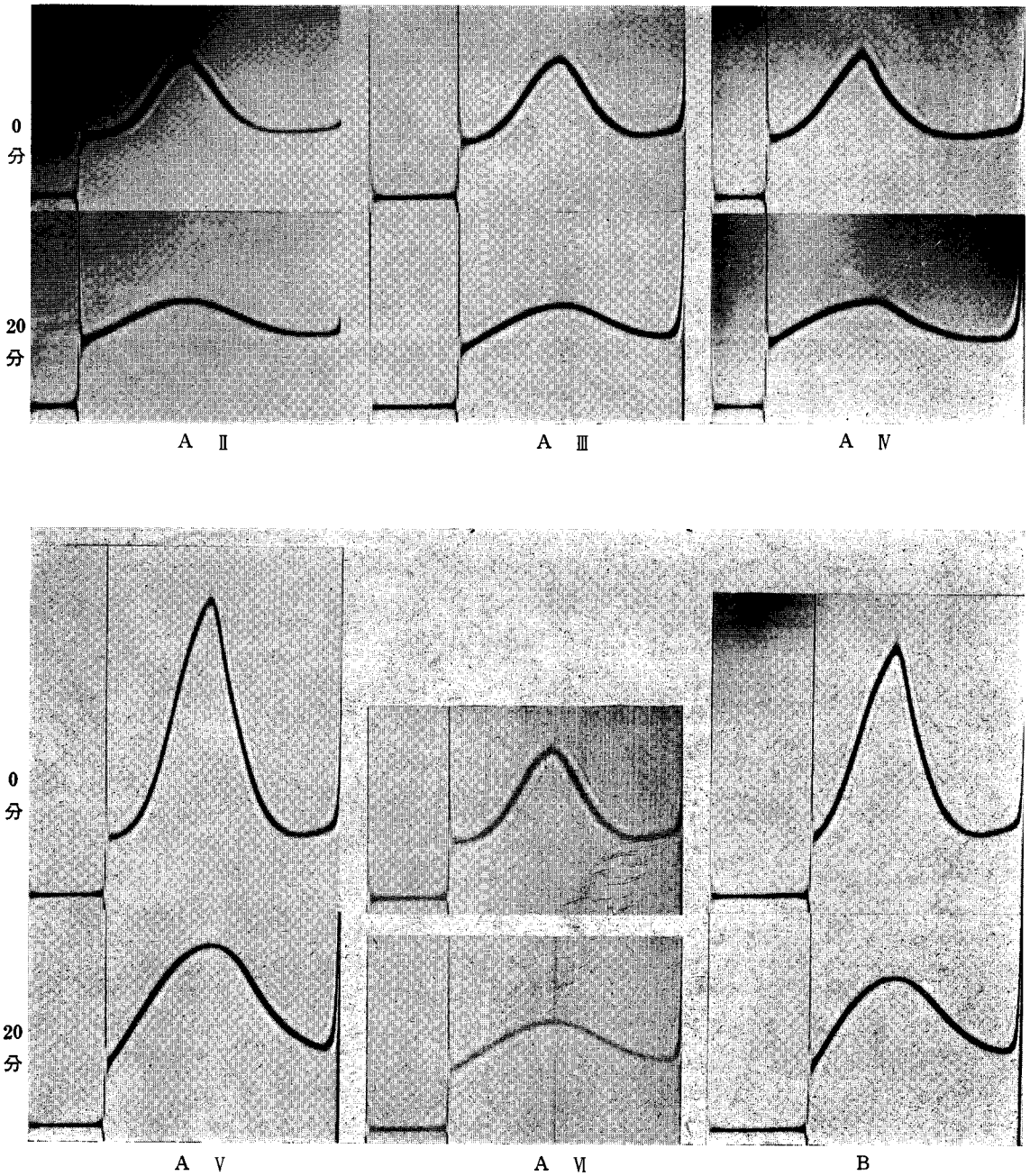

図 11　分画成分の超遠心分析図

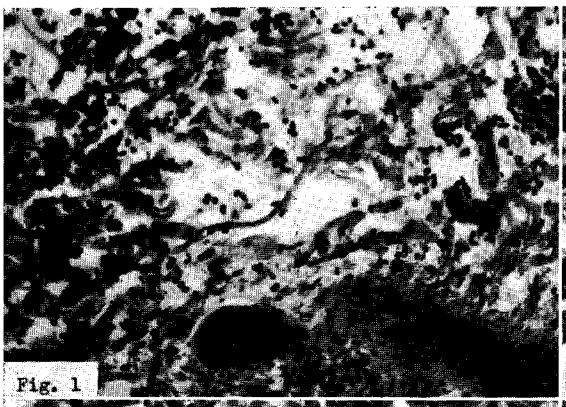
Fig. 1

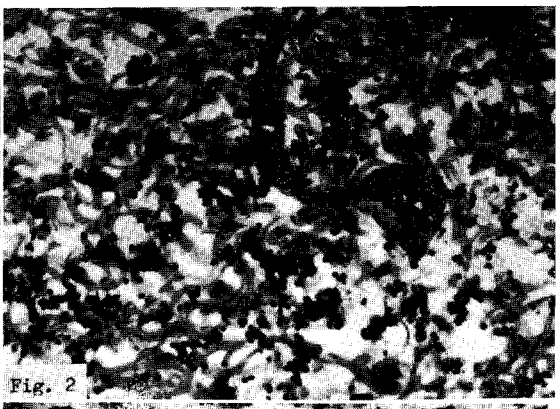
Fig. 2

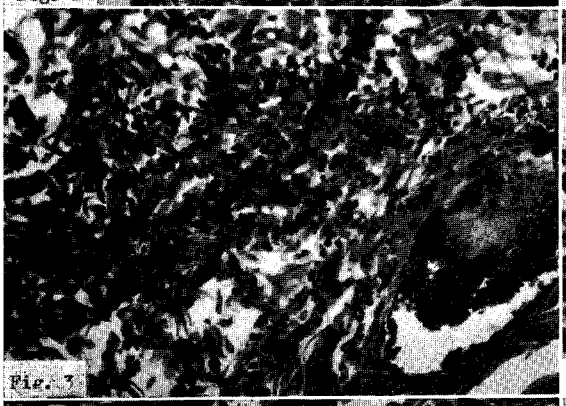
Fig. 3

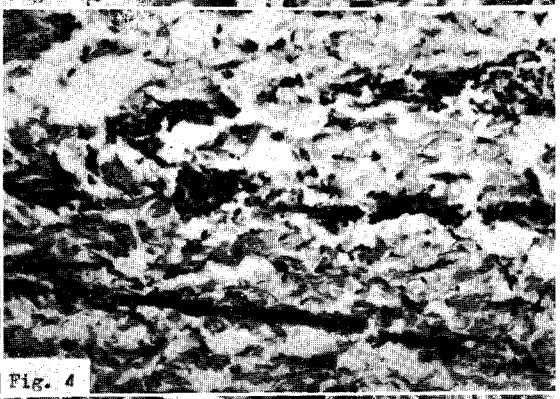
Fig. 4

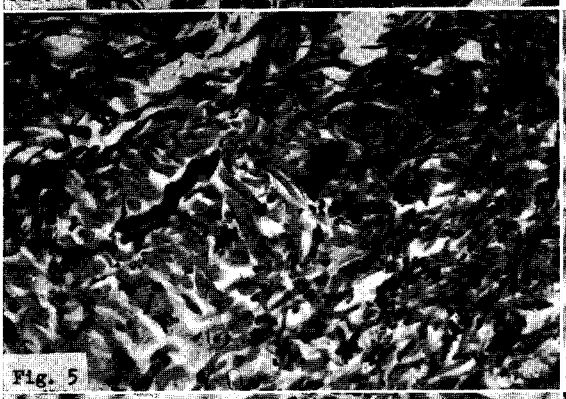
Fig. 5

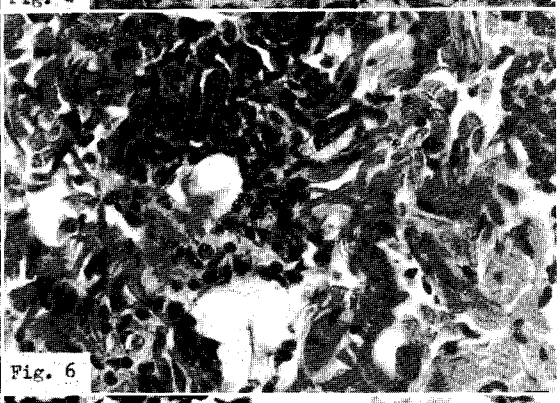
Fig. 6

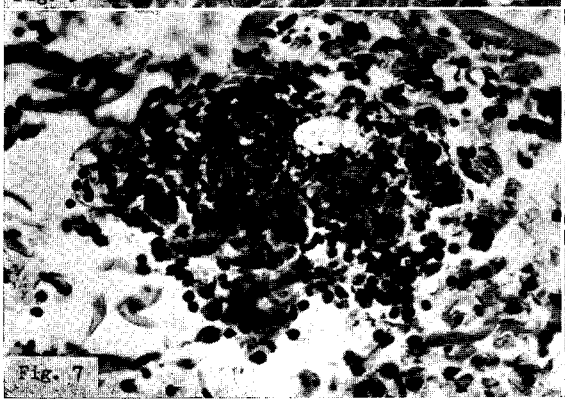
Fig. 7

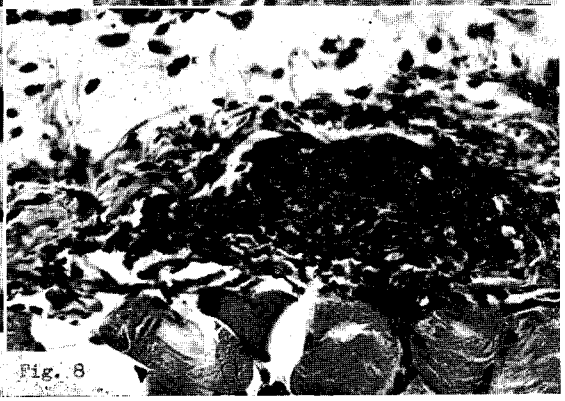
Fig. 8