



Title	モルモット脱感作血清中に見出される皮膚反応惹起物質の部分精製
Author(s)	柿沼, 光明; KAKINUMA, Mitsuaki; 山本, 健一 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 35, 26-33
Issue Date	1975-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26492
Type	departmental bulletin paper
File Information	35_P26-33.pdf



モルモット脱感作血清中に見出される皮膚 反応惹起物質の部分精製

柿 沼 光 明

(北海道大学免疫科学研究所血清学部門)

山 本 健 一

(北海道大学免疫科学研究所細菌感染部門)

(昭和 49 年 10 月 14 日 受付)

BCGの細胞壁(CW)ワクチン¹⁾で経皮免疫後BCGの原形質画分で脱感作されたモルモットの血清中にマクロファージ遊走阻止因子(MIF)が遊離する²⁾。Salvinらもマウスにおいて結核菌で免疫しOTで脱感作して得られた血清中にMIF, インターフェロン, リンフォトキンを見出した^{3),4)}。また彼等は結核菌の代りにBCG CWを用いて同様の成績を得ている⁵⁾。私達は、これらの実験結果がこれまで *in vitro* の実験系でのみ取り扱われてきたリンフォキ⁶⁾が *in vivo* でも生成されていることの傍証になると考えてきた。In *vitro* で生成されたリンフォキの性質は広く研究されたが、極めて微量しか得られないためにその本態はまだ謎にまつまされたままである。しかし大まかな分子量, 電気泳動性, pI, 酵素感受性などについてかなり確実な知見が得られつつある^{7),8)}。私達はモルモットの脱感作血清を種々の方法で分画し, MIF および皮膚反応惹起因子(SRF)の分布を調べたところ, 血清中のMIFはこれまで *in vitro* で生成されたMIFと似た態度を示すことを知った⁹⁾。しかし脱感作血清中のSRF(SRF-D)は必ずしもこれまで知られていたSRFと同一とは言い切れない。なぜならば, MIF活性とSRF活性を分離したのは私達の実験のみであり, *in vitro* で生成されたSRFの殆んどは, Bennetら¹⁰⁾の報告と同じく, MIF画分に見出されたものであった。そこで私達は脱感作血清中のSRF-Dの本態を追求するために脱感作血清からSRF-Dを部分精製した。

実験材料および実験方法

1) 実験動物, 抗原, 免疫方法, MIF活性およびSRF活性の測定は既報⁹⁾のごとく行った。ただし脱感作に用いた抗原はPPDsであった。

2) 脱感作血清は4 pools, すなわちD-6; 10 ml, D-8; 50 ml, D-12; 90 ml, およびD-13; 400 mlを出発

材料として用いた。対照実験として, 正常モルモット血清2 pools, すなわちN-8; 30 ml およびN-12; 20 mlを分画した。

3) SRF-D精製法の概要を図1に示す。

4) DEAEセルロースクロマトグラフィー。脱感作血清(あるいは正常血清)をまず0.02 M 磷酸緩衝液 pH 6.0で透析し, DEAEセルロース(DE 32, ワットマン社)のカラムにかけた。カラムに吸着しない部分を溶出させた後に, 同じpHの0.04 M 磷酸緩衝液, および0.2 M 磷酸緩衝液で順次溶出した。溶出液は後述する画分ごとにまとめ, Visking チューブ 8/32を用いて減圧濃縮し, 活性測定後, 次の精製段階の材料とした。

5) フォスフォセルロースクロマトグラフィー。後述するように画分A(図1参照)にSRF活性が認められたので, この画分を0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.5で透析

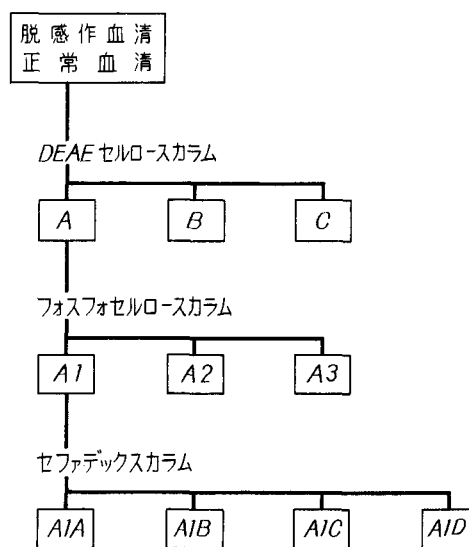


図1 血清分画法

し、フォスフォセルロース (P-11, ワットマン社) のカラムにかけた。さらに 0.2 M および 1 M の同緩衝液, pH 5.5 で段階的に溶出した。

6) セファデックスカラムによる分画。画分 A1 (図 1 参照) をグリシン緩衝液 (0.05 M グリシン, 0.1 M NaCl), pH 8.2 で透析後セファデックス G-100 あるいは G-200 のカラムで分画した。

7) アクリルアミドゲル電気泳動。Williams ら¹¹⁾ の方法により 7.5% アクリルアミドゲルおよび pH 8.9 の緩衝液系を用いて行った。1 回の泳動に 8 本のゲルを用い、そのうち 1 本をアミドブラック 10 B で染色した。残り 7 本は, pre-albumin, albumin, postalbumin の 3 画分に切断した。異なるゲルから得られた同一画分を混合し, 生食水を加えてテフロンホモゲナイザーで 2 度抽出した。抽出は低温室内で 24 時間振盪して行った。抽出液は限外濾過により濃縮し, 生食水で透析した後ミリポアフィルターで濾過した。

8) ノイラミナーゼ処理。ノイラミナーゼは WBC 社製 (0.63 単位/ml) を用いた。原血清量に比して 5 倍に濃縮された画分 AIC (D-13) を 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 5.1 中で 37°C, 1 時間ノイラミナーゼと反応させた。反応後, 直ちに氷冷し, 低温室内で一晩透析した。蛋白量は 280 nm における吸光度を $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 10$ として概算し, 酵素対基質の比が 1:50 および 1:500 になるようにした。対照実験として基質を緩衝液とのみインキュベートしたもの, および, 基質と酵素を別個にインキュベートして透析直前に両者を混合したものを作成してこれらの SRF 活性を測定した。

9) トリプシンおよびキモトリプシン処理。トリプシン (Type I, ウシ膵臓) およびキモトリプシン (Type II, ウシ膵臓) はシグマ社製のものを使用した。0.5 ml の 5 倍濃縮した画分 AIC (D-13) を同量の酵素溶液 (酵素対基質比 1:50 および 1:500) と混合し, pH 8.6 ほう酸緩衝液中で 37°C, 18 時間反応させた。反応液の取り扱いおよび対照実験はノイラミナーゼ処理の場合と同様に行った。

実験結果

1) DEAE セルロースクロマトグラフィーによる分画。既報⁹⁾ のように脱感作血清中の SRF-D を MIF から分離するにはゾーン電気泳動法がもっとも有効に見える。しかしこの方法は大量の血清を処理できない欠点があり, SRF-D 精製の第 1 段階として用いられない。そこで私達はまず DEAE セルロースカラムによるクロマトグラフィーを用いることとした。図 2 に D-6, D-8 お

よび D-12 の溶出曲線を示す。D-6 のクロマトグラフィーの場合には第 1 のピークが溶出して吸光度が最低値を示したところで 0.02 M 緩衝液による溶出を行ったが, D-8 の場合には 0.01 M 緩衝液による溶出を長時間継続した。その結果小さい明瞭なピークが 2 個えられた (図 2 B)。これらの小ピークは, しかし, SRF 活性を示さず MIF 活性を示したので, 図にみられるように画分 A (主な SRF 画分) は 0.01 M 緩衝液で溶出したときに吸光度が最低値を示すところまでとし, その後に得られた溶出液は画分 B に加えた。図中の「SRF」および「MIF」は, おのおの画分の活性を示している。画分 B は MIF 活性の大部分を含むと思われる。画分 C は脱感作血清プールによってまちまちであり, D-8 C は活性なく, D-6 C は SRF, MIF 活性ともに陽性を呈し, D-12 C は MIF 活性のみ示した。表 1 にそれぞれの画分の吸光度, 表 2 に SRF 活性, 表 3 に MIF 活性をまとめて示す。

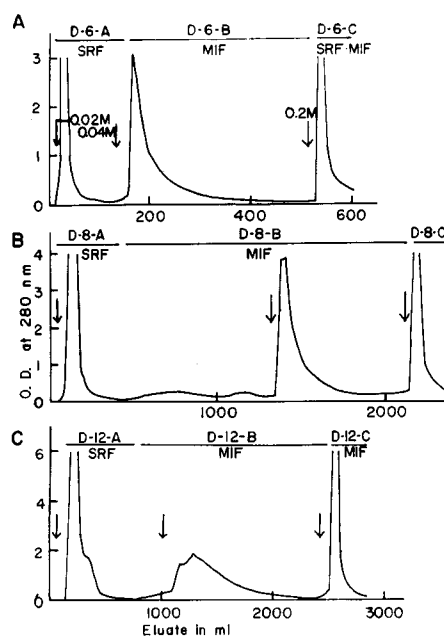


図 2 脱感作血清の DEAE セルロースクロマトグラム

- (A) D-6 を 1.7×20 cm のカラムで分画。流速 30 ml/時。4°C の低温室内で操作した。横線の下に SRF, MIF は, それぞれの画分の活性を示す。
- (B) D-8 を 2.8×33 cm のカラムで分画。流速 50 ml/時。
- (C) D-12 を 2.5×70 cm のカラムで分画。流速 50 ml/時。

表 1 分画面分の 280 nm 吸光度

血清の種類	D-6	D-8	D-12	D-13	N-8	N-13	平均
血清量	10 ml	50	90	400	30	20	
A	8.0	10.8	10.0	12.7	13.0	11.8	11.05 ± 1.83
B	7.5	N. D. ¹⁾	12.8	9.5	N. D.	14.5	11.08 ± 3.16
C	8.5	12.0	15.0	10.8	6.8	10.9	10.67 ± 2.84
A 1	0.26	0.80	0.56	1.58	0.575	1.02	0.80 ± 0.45
A 2	3.8	4.0	3.0	3.4	3.5	5.0	3.78 ± 0.69
A 3	1.6	3.0	4.0	4.5	6.7	2.9	3.78 ± 1.74
AIA	N. F. ²⁾	}0.24	}0.38	1.1	}0.25	}0.82	}0.59 ± 0.45
AIB	N. F.			0.18			
AIC	N. F.	}0.08	0.08	0.093	}0.13	0.087	}0.137 ± 0.037
AID	N. F.		0.015	0.027		0.040	

1) 測定しなかった。 2) 分画しなかった。

表 2 正常・脱感作血清の画分の皮膚反応活性

画 分	皮膚反応 (発赤直径の平均値 ± S. D. ¹⁾)	
	脱感作血清	正常血清
全 血 清	16.9 ± 2.4 mm	N. D. ²⁾
A	17.1 ± 2.5	6.0 ± 6.9
B	5.0 ± 6.0	6.7 ± 6.1
C	9.1 ± 7.8	5.0 ± 5.6
A 1	17.9 ± 3.4	11.8 ± 2.5
A 2	5.4 ± 7.3	5.0 ± 6.0
A 3	6.1 ± 7.2	8.0 ± 5.8
AIA, AIB	8.7 ± 5.5	10, 0
AIC, AID	17.1 ± 2.6	0, 10

1) 9時間目の反応。 2) 測定しなかった。

2) フォスフォセルロースクロマトグラフィーによる分画。画分 A, B および C はさらにフォスフォセルロースのカラムにより分画した。画分 B の主成分は血清アルブミンであり、このものは 0.2 M 酢酸緩衝液で完全に溶出された。この血清アルブミンを含む画分に MIF 活性が認められた。これまで試みた種々の方法のうち、MIF 活性と血清アルブミンの分離に有効なものは見当たらなかったこと⁹⁾ から血清を材料として MIF を精製することは困難であろうと思われる。

画分 A および C のフォスフォセルロースクロマトグラムを図 3 に示す。D-6 A に存在する SRF-D は主と

表 3 正常・脱感作血清画分の MIF 活性

画 分	MIF 活性 (平均遊走指数 % ± S. D.)	
	脱感作血清	正常血清
全 血 清	55.8 ± 23.4%	N. D. ¹⁾
A	100.0 ± 5.5	N. D.
B	54.5 ± 9.7	106.0 ± 14.8
C	72.6 ± 14.0	90.3 ± 17.9
A 1	N. D.	103
A 2	101.0 ± 13.4	103.5 ± 6.5
A 3	99.0 ± 14.2	105.5 ± 7.5
AIA, AIB	102.3 ± 9.4	106
AIC, AID	109.0 ± 24.0	120 ± 14.1

1) 測定しなかった。

して画分 A 1 に溶出されたが画分 A 2 も活性が認められた (図 3 A)。D-13 A の分画の場合には画分 A 1 へのみ活性を認めた (図 3 C)。画分 D-6 A 2 に活性があったことは溶出が不完全であったためと思われる。また図 3 C で 0.1 M 緩衝液で素通したピークの後に出現した小ピーク (溶出量 600 ml から 1,000 ml にかけてみられた) にも SRF 活性があり、したがって 0.1 M 緩衝液により溶出されたもの全てを画分 A 1 とした。アクリルアミドゲル電気泳動による分析では画分 A 2 は微まんに易動する γ -グロブリンがほぼ純粋に染色された。A 1 は微量の γ -グロブリンと 10 本以上のバンドが散在していた。画

分Cのフォスフォセルロースクロマトグラフィーでは主成分は1.0 Mの緩衝液で溶出され(C3), この主成分には血清アルブミンも γ -グロブリンも認められなかった。D-6 CのSRF活性はこのC3に存在していた(図3B)。したがって脱感作血清プールD-6には2種類のSRF様因子が存在し, 画分A1の活性は検索した脱感作血清全てに再現よく見出されたのに反し, 他のSRF活性(C3)は再現性の乏しいものと考えられた。

3) セファデックスカラムによる分画。画分A1をさらにゲル濾過法により分画した。図4はD-13 A1をセファデックス G-100 カラムにかけたときの溶出曲線を示す。4つのピークが得られ SRF 活性はその中の最後の2つ(AICとAID)に見出された。図5は画分AIA, AICおよびAIDによる皮膚反応を経時的に表わしたものである。画分AICおよびAIDによる反応は6~9時

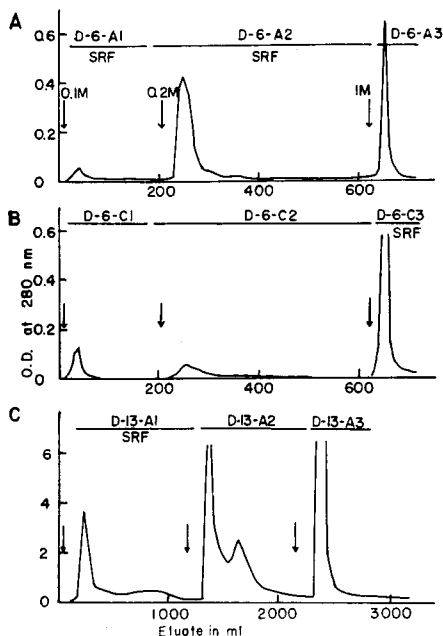


図3 SRF 活性を有する画分のフォスフォセルロースクロマトグラム

- (A) 4 ml の D-6 に由来する画分 A(D-6-A) を 1.7×15 cm のフォスフォセルロースカラムで分画した。低温室内で 30 ml/時の流速で行った。横線の下に SRF は相当する画分の活性を示す。
- (B) 4 ml の D-6 に由来する画分 C(D-6-C) を 1.7×15 cm のフォスフォセルロースカラムで分画した。流速は 30 ml/時
- (C) 375 ml の D-13 に由来する画分 A(D-13-A) を 5×50 cm のフォスフォセルロースカラムで分画した。流速は 50 ml/時

間が最大であり, 画分 AIA による反応の最大値は注射後 3 時間に認められた。したがって AIA による反応は SRF-D によるものではないと判断した。

4) アクリルアミドゲル電気泳動による分析ならびに分画。D-13 AIC および AID のアクリルアミドゲル電気泳動像を図 6 に示す。画分 AID は γ -グロブリンを殆ど含まないが, 画分 AIC は少量含んでいた。血清アルブミンよりも早く泳動するバンドが 4 本見出され, とく

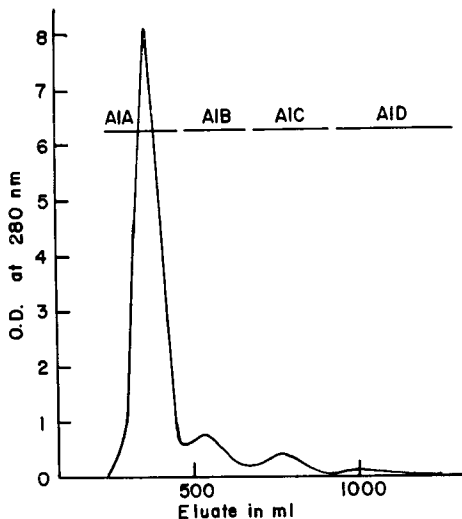


図4 SRF 活性画分のゲル濾過像

350 ml の D-13 に由来する画分 A1(D-13-A1) を 4×120 cm のセファデックス G-100 カラムで濾過した。流速は 30 ml/時で低温室内で行った。

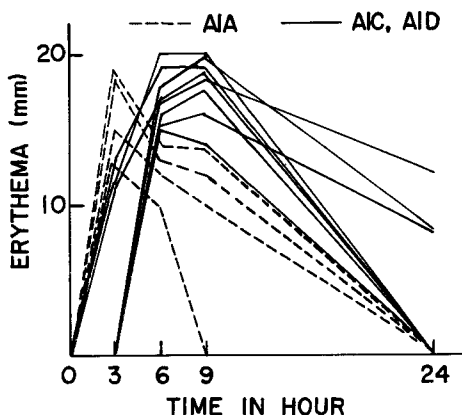


図5 セファデックス G-100 による分画画分による皮膚反応

図4で得られた画分による皮膚反応を経時的にプロットした。破線はAIAによる反応, 実線はAIC, AIDによる反応。

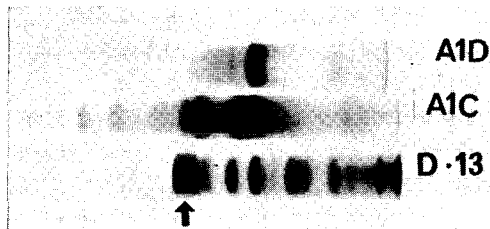


図6 AIC, AIDのアクリルアミドゲル電気泳動像

50倍に濃縮したD-13-AIC, D-13-AIDと1/20に稀釈したD-13全血清をそれぞれ0.1mlずつ7.5%ゲルで泳動した。

表4 アクリルアミドゲル電気泳動画分の皮膚反応活性

画分	濃度	皮膚反応 ¹⁾	
D-13血清 prealbumin	1/200稀釈	0(-)	0(-)
D-13血清 albumin		7(-)	9(-)
D-13血清 postalbumin		10(±)	0(-)
D-13-AIC prealbumin	5倍濃縮	18(++)	21(++)
D-13-AIC albumin		15(+)	11(-)
D-13-AIC postalbumin		15(+)	14(±)
D-13-AID prealbumin	5倍濃縮	21(++)	17(++)
D-13-AID albumin		13(±)	0(-)
D-13-AID postalbumin		13(±)	0(-)

1) 数字は平均発赤直径(mm), カッコ内は硬結の程度。

にAICでは鮮明に染色されていた。

表4にアクリルアミドゲルより抽出した画分のSRF活性を示す。SRF活性は全ての画分に見出されたが、とりわけ pae-albumin 画分の活性が著明であった。pre-albumin 領域には4本のバンドが染色され、それらはAICでは濃度が高くAIDでは低いことから(図6)、これらのバンドはSRF-Dとは無関係であろうと考えられる。また画分AICの蛋白量は80~93 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 画分AIDのそれは15~27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と推定され、しかもアクリルアミドゲル電気泳動像からも明らかのようにアミドブラック10Bで染色されない微量成分が有効因子と推察される。すなわちSRF-Dは極めて微量に存在する活性因子であることを示唆している。

5) SRF-Dの酵素感受性。表5に画分AICの酵素感受性を示す。トリプシンは酵素対基質比1:50でも活性を低下させなかった。キモトリプシンおよびノイラミニダーゼは1:500活性を低下させ、1:50では失活させた。酵素と基質を別々に37°Cでインキュベートした後に混合して皮膚試験を行った結果では、ノイラミニダーゼ1:50の場合にのみ反応が低下し、他の場合には対照として行った基質と緩衝液のみのインキュベーションと同程度の反応を示した。

6) モルモットの個体差による影響。これまでの実験において皮膚反応の強さは個体差により大きく左右されることが判明した。この点をさらに検討するために、5匹のモルモットを免疫・脱感作し、免疫前(正常)血清および脱感作血清を採取し、個体別にSRFおよびMIF活性を調べた。図7に皮膚反応の時間経過を示す。実線

表5 SRF活性の酵素感受性

酵素処理法	皮膚反応 ¹⁾			
	1:50 ²⁾		1:500 ²⁾	
(D-13-AIC+pH 8.6 緩衝液)	18(++)	19(++)	19(++)	22(++)
(D-13-AIC+トリプシン)	15(++)	17(++)	17(+)	21(++)
(D-13-AIC)+(トリプシン) ³⁾	19(++)	18(++)	17(+)	21(++)
(D-13-AIC+キモトリプシン)	0(±)	0(±)	13(+)	14(+)
(D-13-AIC)+(キモトリプシン) ³⁾	19(++)	15(++)	22(++)	21(++)
(D-13-AIC+pH 5.1 緩衝液)	18(+)	19(++)	19(+)	21(++)
(D-13-AIC+ノイラミニダーゼ)	0(-)	0(±)	13(+)	13(+)
(D-13-AIC)+(ノイラミニダーゼ) ³⁾	17(++)	(±)	20(++)	24(++)

1) 9時間目の皮膚反応。発赤直径mmとカッコ内は硬結。

2) 酵素対基質比。

3) 酵素と基質を別個にインキュベートし、透析直前に混合した。

は脱感作血清による反応、破線は正常血清による反応を示す。上図と下図は同じ血清群を異なるモルモットでテストしたものである。正常血清による反応は3時間目を頂点とし24時間後まで継続するかあるいは途中で消失

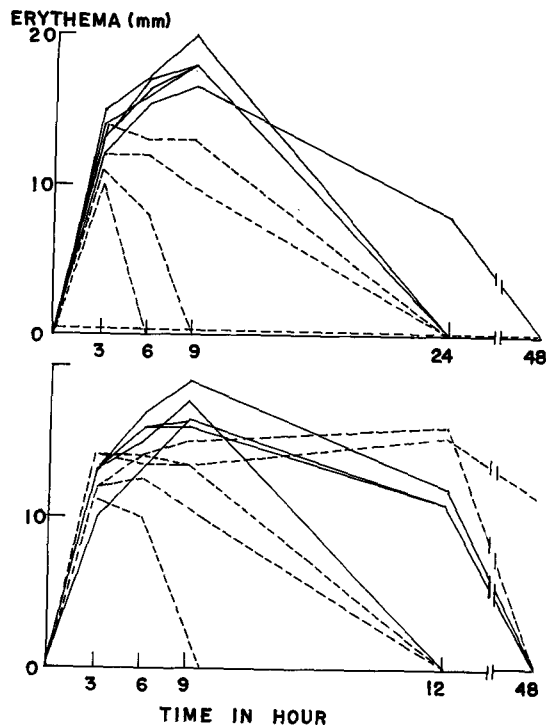


図7 正常血清および脱感作血清による皮膚反応の個体差

実線は脱感作血清による発赤直径の時間推移を示し、破線は正常血清によるそれを示す。図7Aと図7Bは皮膚反応に用いたモルモットの個体が異なる。

表6 正常血清および脱感作血清のMIF活性

モルモット番	血清の種類	遊走面積 (mm ²)				遊走指数 (%)
対照 (正常モルモット血清プール)		21	22	21	18	100
1	正常血清	22	26	22	22	109
2		21	22	22	19	101
1	脱感作血清	13	14	11	13	60
2		9	10	13	17	58
3		11	13	11	10	53
4		7	8	10	8	39
5		12	19	8	9	45

した。反応の強さは血清により、あるいは被験動物により異なっていた。脱感作血清による反応は6~9時間が最高であり血清の個体差による影響は少ないことが知られた。

表6は、上記の正常血清および脱感作血清の一部のMIF活性を示している。正常血清にはMIF活性はなく、脱感作血清は一様に強い活性を示した。

考案

以上の実験成績は前報で述べた結果、すなわち脱感作血清中のMIF活性とSRF活性は分離するという考えを支持している。SRF-Dは2,000倍程度に精製されたが、最終的な部分精製画分であるAIC, AIDにはMIF活性は認められなかった(表3)。本文中に含まれてはいないがAICおよびAIDを5倍に濃縮してそれらのMIF活性を調べた結果でもやはり活性がなかった。したがって脱感作血清中に含まれるSRF活性物質(SRF-D)はこれまで知られていたSRFと一致しない。なぜならばSRF活性はMIF画分に見出され、両活性は分離しえないと考えられてきたから^{10),12)}。また物理化学的性質からもこのことは裏付けされる。SRF-Dはβ-グロブリン様の挙動を示し⁹⁾、40%飽和硫酸で沈殿⁹⁾さらにDEAEセルローズに吸着し難い(図2)。In vitroで生成されたSRFを研究したPickら¹³⁾はSRFは66%の飽和硫酸で沈殿し、DEAEセファデックスカラムからの溶出はγ-グロブリンよりも遅いと報告している。また電気泳動的にはアルブミンの直後(α-グロブリンの位置)に易動するという。Pickらの報告したSRFの性質でMIFの性質と矛盾するところは全くない¹⁴⁾。

脱感作血清中のMIFはこれまで知られていたMIFと同じ因子と考えられる。In vitroで生成されたMIFのセファデックスカラムからの溶出は血清アルブミンと同じ位置かその後にくる^{10),15)}といわれ、DEAEセルローズによる分画でも血清アルブミンと同じ挙動とすることが知られている¹⁴⁾。通常MIF画分はSRF活性を伴うが、私達が脱感作血清に見出したMIFはSRF活性がなかった。このことは種々の議論を呼ぶことになる。血清中でMIFは本来持ち併せているSRF活性を失うのか、あるいはMIFにはSRF活性を持たないのか、あるいはまた私達のMIF画分(画分B)にもSRF活性が存在しているが検出できなかったかの何れかであろう。画分Bはその中に多量の血清アルブミンを含み、このものを濃縮して反応を試みることは難しい。MIFと血清アルブミンを分離する手段の開発を待つて今後これらの疑問に答えたいと考える。しかしSRF活性の有

無に拘らず脱感作血清中の MIF はこれまで知られていた MIF と同一因子と考えて良からう。

SRF-D はアクリルアミドゲル電気泳動で血清アルブミンよりも早く泳動し(表4)、酵素感受性試験ではノイラミニダーゼおよびキモトリプシンにより失活し、トリプミンによっては失活しない(表5)。これらの性質は MIF のそれと全く一致し^{12),16)}、SRF-D が比較的分子量の糖蛋白質であることを示唆している。皮膚反応の個体差および SRF-D の β -グロブリン様の挙動は、SRF-D が Battisto らによって報告された SF 抗原と同一物質か否かという疑問を提起する^{17),18),19)}。1960 年に Battisto は正常モルモット血清中に免疫現象とは無関係の遅延型皮膚反応を惹起する物質を見し、この物質は β -グロブリンとして挙動すると述べた¹⁷⁾。さらに彼はこの物質を SF と名づけ、SF はアロ抗原で SF⁻ のモルモットに SF を含む血清を注射すると皮内反応陽性になること、SF に対する特異免疫が成立することおよび SF に対する皮内反応の惹起能もまた遺伝制御をうけていることを報告した¹⁹⁾。私達の実験に用いた動物はハートレイ系のモルモットであり、SF 抗原の関与を否定することはできない。しかし SF と SRF-D が同一物質であることを証明する積極的事実も存在しない。SF を部分精製した報告は 1960 年代の初期で物理化学的性質は充分解明されて居らず、SF の血清中の含量は SRF-D に比して極めて大きいと思われる¹⁸⁾ ことなどから考えるとむしろ SF と SRF-D は異なる物質である可能性が強い。この疑問に答えるためには近交系動物で産生された SRF-D の研究が要求されよう。

結 語

モルモットの脱感作血清に見出される SRF 活性因子(SRF-D)はこれまで知られている SRF と比較してその性質に違いが見られた。即ち電気泳動的、クロマトグラフ上の挙動から SRF-D は SRF よりも正の荷電が多いように思われる。そこで脱感作血清から SRF-D を部分精製して血清蛋白の含量を 1/2,000 にまで減らした。部分精製された SRF-D はポリアクリルアミドゲル電気泳動で pre-albumin に泳動し、ノイラミニダーゼ、キモトリプシンにより失活した。したがって SRF-D は比較的分子量の糖蛋白質と思われる。SRF-D が遅延型

アレルギーの発現に何らかの役割を持っているか否かについては言及しうる段階ではないが、正常モルモット血清中に含まれているアロ抗原 SF と SRF-D との異同について考察を加えた。

参 考 文 献

- 1) Ribi, E., Anacker, R. L., Brehmer, W., Goode, G., Larson, C. L., List, R. H., Milner, K. C. and Wicht, W. C.: *J. Bacteriol.*, **92**, 869, 1966.
- 2) Yamamoto, K. and Takahashi, Y.: *Nature New Biol.*, **233**, 261, 1971.
- 3) Salvin, S. B., Youngner, J. S. and Lederer, W. H.: *Infect. and Immunity*, **7**, 68, 1973.
- 4) Youngner, J. S. and Salvin, S. B.: *J. Immunol.*, **111**, 1914, 1973.
- 5) Salvin, S. B., Ribi, E., Granger, D. L. and Youngner, J. S.: 1974, 印刷中.
- 6) Dumode, D. C., Wolstencroft, R. A., Panayi, G. S., Matthew, M., Morley, J. and Howson, W. T.: *Nature*, **224**, 38, 1969.
- 7) David, J. R. and David, R. A.: *Progr. Allergy*, **16**, 300, 1972.
- 8) Sorg, C. and Bloom, B. R.: *J. Exp. Med.*, **137**, 148, 1973.
- 9) 柿沼光明・山本健一: 結核の研究, **33**, 1, 1973.
- 10) Bennet, B. and Bloom, B. R.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **59**, 756, 1968.
- 11) Williams, D. E. and Reisfeld, R. A.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 373, 1964.
- 12) Bernstein, I. D., Thor, D. E., Zber, B. and Rapp, H. J.: *Science*, **171**, 1729, 1971.
- 13) Pick, E., Krejci, J., Cech, K. and Turk, J. L.: *Immunology*, **17**, 741, 1969.
- 14) Bloom, B. R., and Bennet, B.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **169**, Part I, 258, 1970.
- 15) Yoshida, T. and Reiofeld, R. A.: *Nature*, **226**, 856, 1970.
- 16) Remold, H. G. and David, J. R.: *J. Immunol.*, **107**, 1090, 1971.
- 17) Battisto, J. R.: *Nature*, **187**, 69, 1960.
- 18) Battisto, J. R.: *Nature*, **198**, 598, 1963.
- 19) Follet, D. A. and Battisto, J. R.: *J. Immunol.*, **101**, 753, 1968.

Partial Purification of a Skin Reactive Factor in Sera of Desensitized Guinea Pigs

Mitsuaki KAKINUMA and Ken-ichi YAMAMOTO

By uses of DEAE-cellulose chromatography, phosphocellulose chromatography and Sephadex gel filtration a skin reactive factor, or possibly skin reactive factors, in desensitized guinea pig sera (SRF-D) was purified approximately 2,000 fold. SRF-D fractions thus obtained did not inhibit migration of normal peritoneal macrophages. SRF-D was sensitive to neuraminidase and chymotrypsin, but resistant to trypsin digestion. SFR-D migrated to prealbumin region on disc electrophoresis.