



Title	ツベルクリン蛋白の抗原性に関する研究
Author(s)	奥山, 春枝; OKUYAMA, Harue; 太田, 明彦 他
Description	
Citation	結核の研究, 15, 45-55
Issue Date	1961
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26720
Type	departmental bulletin paper
File Information	15_P45-55.pdf



ツベルクリン蛋白の抗原性に関する研究

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)

(昭和36年6月1日受付)

結核症の皮膚反応に旧ツベルクリンが用いられることは衆知のことであるが、その中の蛋白成分が、ツベルクリン反応を特徴づける遅延型反応をおこす活性因子であることが認められ、実際に1941年にSeibertは purified protein derivative (PPD)¹⁾ と名づけた活性の高いツベルクリン蛋白を精製し、このPPDは現在も実用に供されている。一方菌体蛋白²⁾ 又はツベルクリン蛋白¹⁾ は感作原性を持っており、これらを抗原として沈降素を証明出来ることが報告されている。しかしこのような活性を示す蛋白成分は、更に化学的にも又生物学的にも異なるいくつかの成分からなることがSeibert³⁾ の実験で明らかとなっている。

われわれは、ツベルクリン蛋白から種々の精製法の組合せで多くの分画成分をえて、その各々について皮膚反応原性、血清反応原性特に沈降反応原性をしらべた。

I. ツベルクリン蛋白の Zone Electrophoresis による分画

1. 実験材料及び実験方法

i. ツベルクリン蛋白 (TPt 2, TPt 3)

ツベルクリン蛋白は次のようにして精製した。(なおわれわれの精製した蛋白を TPt と名づけたので以下このように記す。又その培養の lot によって TPt 2, TPt 3 と記載する。) H 37 Rv 人型結核菌の Sauton 培地 9 週間培養濾液を非加熱のまま Seitz 濾過して菌体を除去し、それを 40°C 以下で flash evaporator を用いて速やかに 1/10 量に濃縮した。これを流水で一夜透析後 50% 三塩化醋酸を加えて pH 1.0 として沈澱させ、この沈澱を pH 8.0 で水に溶解し、遠心して沈澱を除いた。この上清に再び 50% 三塩化醋酸を加えて pH 4.0 とし、その遠心沈澱物を pH 8.0 で溶解、この沈澱、溶解の操作を 3 回繰返し、最後の溶液を一夜流水で透析後、凍結乾燥して保存した。これを随時適当量溶解して用いた。

今回の実験に用いた TPt 2 及び TPt 3 の化学的組成は次のようである。

	N%	P%	Hexose%*
TPt 2	9.9	0.1	2.0
TPt 3	8.6	0.3	2.0

(micro-Kjeldahl) (Bartlett) (Anthrone)

* Hexose は葡萄糖に換算した値

ii. 分画電気泳動法

方法は萩原⁴⁾ が行なったと同じ方法であるが、ただ支持体として澱粉の代りに塩化ビニール TK 1000 (信越化学) を用いた。これは溶出液の糖量測定に際し、澱粉の混入による測定誤差を避けるためである。一回の泳動蛋白量は 240 mg で、4% の割合に緩衝液に溶解し、その 6 ml を用いた。緩衝液は veronal 醋酸ソーダ緩衝液、pH 8.6 $\mu=0.045$ である。30 mA 定電流で 16 時間通電、初電圧 210 volt、終末電圧 170 volt、氷庫内で泳動を行なった。泳動完了後、支持体を 1 cm 毎に切って 5 ml の生理的食塩水 (生食水) の中でよく混合、それを濾過して溶出液をえた。

各溶出液について蛋白量 (Biuret 法, 540 $\mu\mu$)、六炭糖量 (Anthrone 法, 620 $\mu\mu$)、五炭糖量 (Orcin 法, 660 $\mu\mu$) を測定した⁵⁾。

iii. 血清反応

H 37 Rv 加熱死菌 30 mg を Adjuvant (Drackeol, Arla-cel) と共に皮下注射して免疫した家兎の血清を分離して抗体側として、各溶出液の各種血清反応における抗原力価を測定した。

沈降反応: 抗原稀釈, 抗血清稀釈を組合わせて、重層法で行なった。

感作血球凝集反応: Middlebrook-Dubos 法, Boyden 法、及びこれに補体を加えた Middlebrook 溶血反応を行なった。方法は小野、高橋⁶⁾ の記載に準じたが、血球感作の条件は、溶出液の蛋白量 0.3 mg で、0.025 ml の血球を感作した。

iv. 皮膚反応

各溶出液の蛋白濃度を 10 r/0.1 ml に稀釈し、その 0.1 ml を、H 37 Rv 死菌免疫兎背部皮内に注射して、24, 48 時間後発赤の大きさ、浮腫の強さを測定した。

v. 免疫電気泳動法

方法は Scheidegger⁸⁾ の微量法に準じて行なった。Veronal 醋酸ソーダ (pH 8.6, $\mu=0.045$) を緩衝液とし、組織学的検索用スライドを3列2段にして、20 mA, 135 volt 3時間通電した。泳動完了後直ちに抗血清を中央の溝に流し込んで密閉した硝子容器中に入れて観察した。

2. 成績

i. 分画電気泳動

TPt2の電気泳動図を、縦軸に蛋白量、糖量をとって描くと図1のようである。図にみられるように、蛋白量曲線を見ると、大半は陽極側に移動する1つの peak を作っていて、陰極側には僅かの量がみられるにすぎない

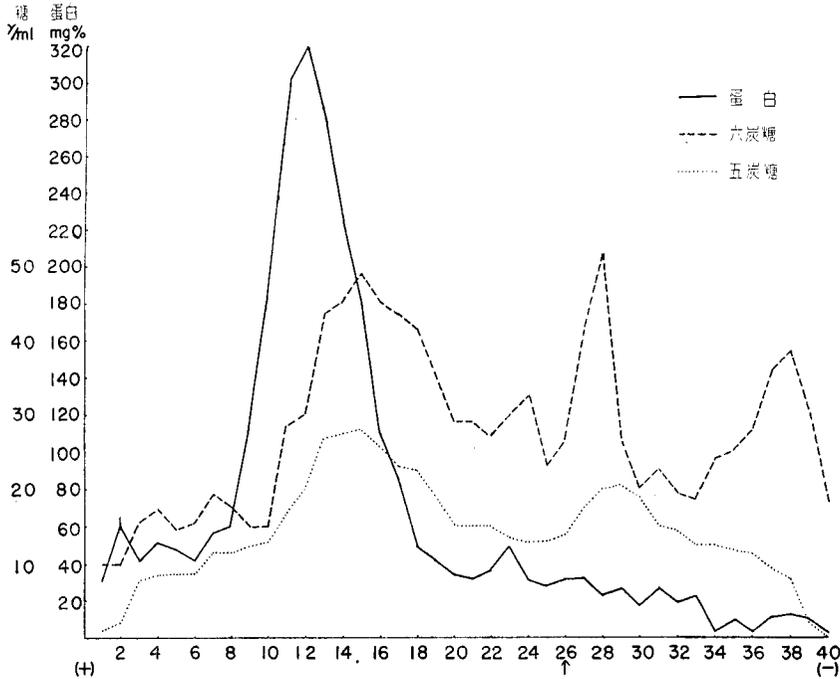


図1. TPt2の分画電気泳動曲線

い。これに反し、hexoseは3つの peak を作り、その最大のものは蛋白 peak より僅かに低易動度側に偏っている。pentose 曲線は2つの peak を作り、これらは hexose の高易動度側の2つの peak と一致している。又その最大のものは、hexose と同様に最も高い易動度を持っている。これらの糖曲線はツベルクリンの lot により必ずしも同じではないが、この主 peak と蛋白 peak との位置的關係は全く同じであった。しかし量的には蛋白に比し、糖量はごく微量に混じているにすぎない。

ii. 血清反応

各種血清反応における抗原活性は図2, 図3に示した。まず Boyden 反応についてみると、その最高値は Tube No. 11~14で、蛋白 peak の10~12, 糖 peak の13~16であることから、丁度この中間に位置している。これに反し、Middlebrook-Dubos 反応では Tube No. 10~22に広く認められるがその値は低く、最高値は Tube No. 18~20で蛋白量の少なくなった所に相当する。この傾向

は Middlebrook 溶血反応においても同じであって、これら両者の抗原性は糖 peak に一致していることが認められる。沈降反応抗原活性についてみると、抗原稀釈による抗原価と、抗血清稀釈による抗体価とは一致していない。まず抗原価をみると、Tube No. 13, 14が最高値で蛋白及び糖 peak の中間に相当している。一方抗体価は、Tube No. 14~24の広い範囲にわたり最高値を示している。即ち蛋白量が少量しか認められない画分でも高い抗体価がえられている。

iii. 皮膚反応

皮膚反応抗原活性は、図4にみるように、その強さは蛋白曲線と全く平行して認められる。従って前述の各種血清反応の抗原性と皮膚反応抗原性の高い画分の分布が明らかに異なることが認められた。

iv. 免疫電気泳動

図5にみるように、蛋白成分は塩化ビニール支持体を用いた zone electrophoresis と同様に陽極側に移動して

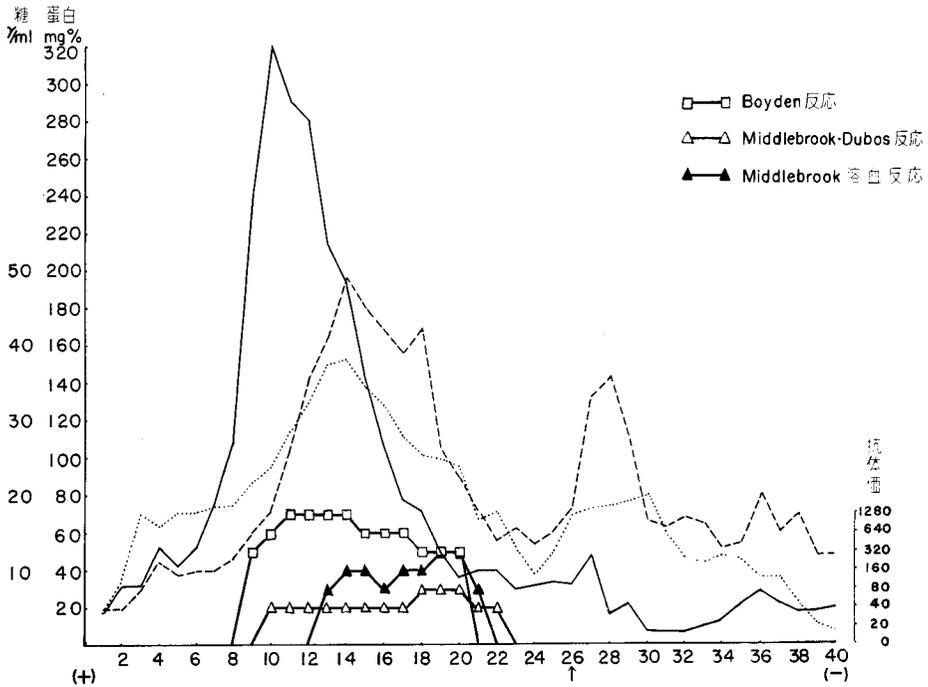


図2. Boyden, Middlebrook-Dubos 凝集反応及び Middlebrook 溶血反応抗原活性の分布

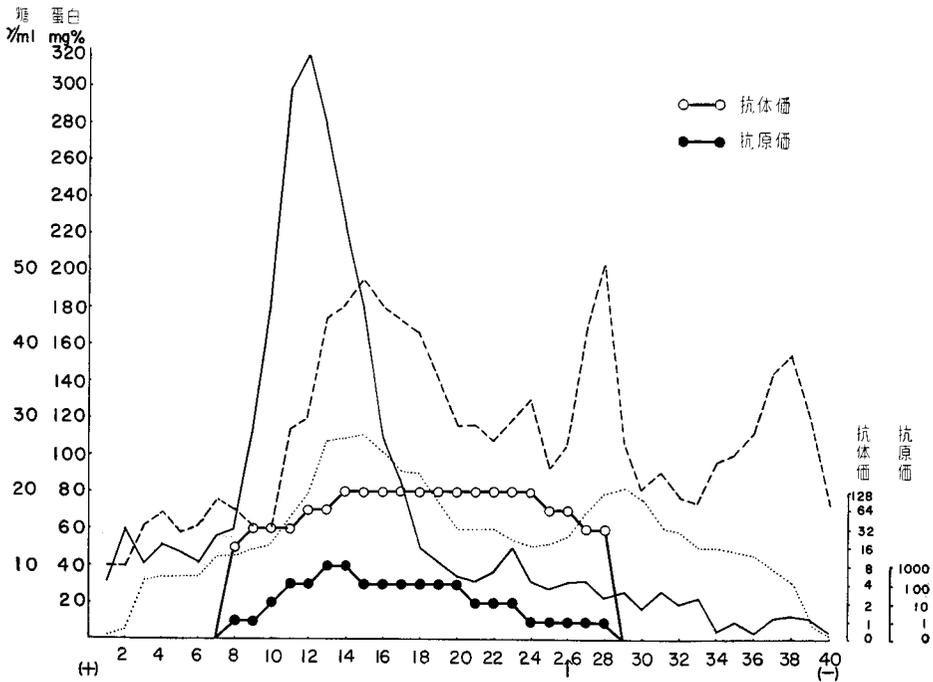


図3. 沈降反応抗原活性の分布

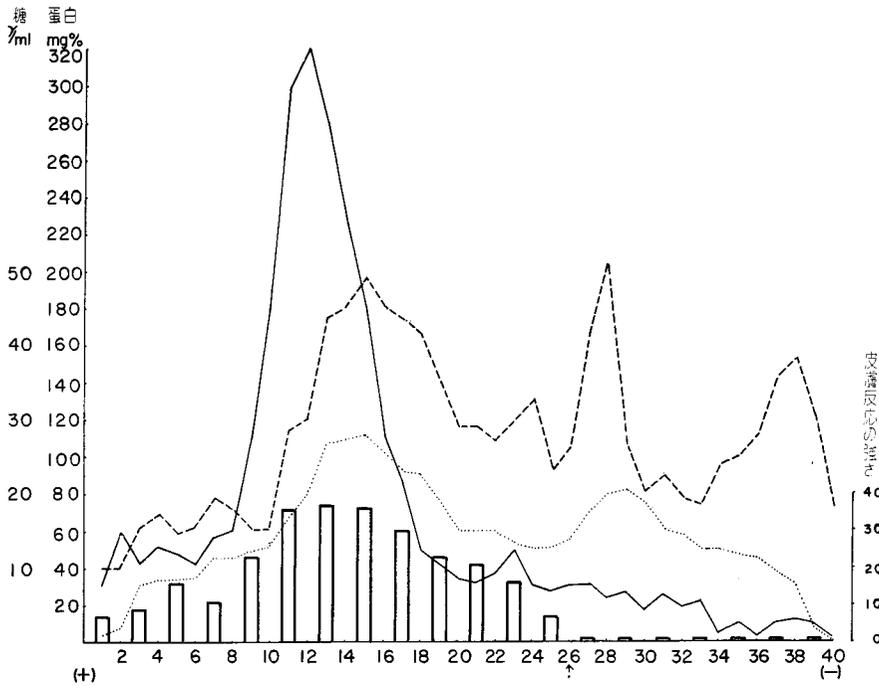


図4. 皮膚反応抗原活性の分布

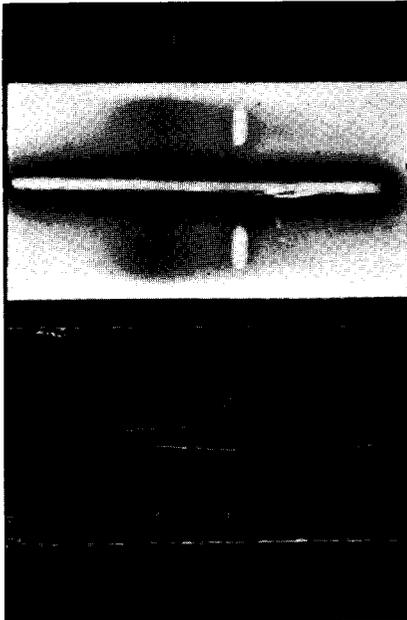


図5. 免疫電気泳動図

おり、これに抗血清を作用させて作られた沈降線は、蛋白成分の大部分が認められる位置より明らかに陰極側に偏よってみられる。即ち前述の沈降反応の結果と全く同

じ成績であった。

3. 小 括

TPt 2 を電気泳動的に分画して、陽極側に移動する1つの蛋白 peak と、それよりやや低い易動度をもつ主 peak の他に陰極側に移動する2つの peak を示す hexose 及び1つの peak を示す pentose の peak がえられた。これらの分画成分による感作血球凝集反応の抗原活性は Boyden 反応では蛋白 peak に、Middlebrook-Dubos 反応及び Middlebrook 溶血反応では糖の主 peak に一致して高くみられた。沈降反応では、抗原価では蛋白 peak 及び糖 peak の中間に、抗体価は糖の主 peak に一致して高値がえられた。一方皮膚反応抗原性の強さは蛋白量に平行してみられた。免疫電気泳動では、その沈降線的位置は、沈降反応抗体価の成績と同様に蛋白 peak よりも低易動度側に認められた。

II. ツベルクリン蛋白のイオン交換体による分画

1. 実験材料及び実験方法

i. ツベルクリン蛋白 (TPt 3) 分画成分

(1) I の項で述べたと同様の方法で精製した TPt 3 の 375.4 mg を分画電気泳動を行なって、蛋白の大部分と主 peak を含む Tube No. 10~24 の画分を材料とした。尚 TPt 3 の糖曲線は TPt 2 とはやや異なり、陰極側に移動

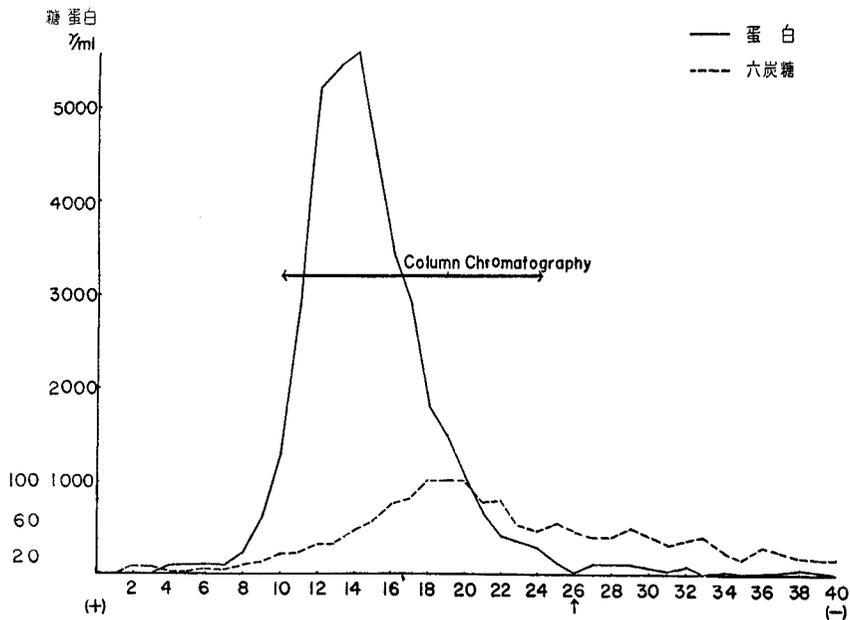


図6. TPt3の分画電気泳動曲線

する peak がはっきりしないが、その主 peak と蛋白 peak との位置的関係は同じであった。この部分からえた総蛋白量は 147.71 mg である。

(2) 一回目の分画で得た成分の一部を更にイオン交換体で重ねて分画を行なった。

ii. イオン交換体による Column Chromatography

(1) Column Chromatography (I)

Column は DEAE-cellulose (0.8 meq/g) 2×30 cm である。前述の zone electrophoresis 分画成分液 (蛋白量 147.71 mg) を 0.005 M NaH_2PO_4 , pH 6.8 にて一夜透析し、これを 20 ml/hr の割合で流し出しながら試料を column に流し込み、そのあと次の展開液を順次用いた。尚各展開液量は一定でなく 150~450 ml である。

展開液

I.	0.005 M NaH_2PO_4	pH 6.8
II.	0.02 M "	5.9
III.	0.1 M "	4.5
IV.	" "	+0.05 M NaCl "
V.	" "	+0.1 M " "
VI.	" "	+0.2 M " "
VII.	" "	+0.3 M " 4.2
VIII.	1 N NaOH	
IX.	1 N HCl	

各分画成分の pH を中性に調整して、蛋白量 (Cu-Folin 法, 750 m μ), 糖量 (Anthrone 法, 620 m μ) を測定し、

塩濃度が非常に高いものは生食水で透析後、I で述べたと同様の方法で沈降反応抗原性 (分画成分稀釈, 抗血清稀釈) をしらべ、更に各分画の peak の部分をとって一夜流水、更に一夜生食水で透析後、蛋白量 10 r/0.2 ml に稀釈して、結核菌における皮膚反応抗原性を 6~72 時間の時間的経過を追ってしらべた。

(2) Column Chromatography (II)

(1) の column chromatography で分画した成分のうち、最も多量に溶出した 1 N NaOH 画分 (蛋白量 28.06 mg) を、DEAE-cellulose 1×30 cm column で更に分画した。展開液流出速度は 20 ml/hr で (I) と同じである。使用展開液は次の通りである。

展開液

I.	0.005 M NaH_2PO_4	pH 7.0
II.	0.2 M NaOH	
III.	0.4 M "	
IV.	0.7 M "	
V.	1.0 M "	
VI.	1.0 M HCl	

各分画成分は (1) と同様に pH の調整及び生食水で透析後、蛋白量、糖量を測定し、更に沈降反応抗原性を求め、蛋白量を 5 r/0.2 ml に稀釈して皮膚反応抗原性をしらべた。

iii. 抗血清による沈降反応抗原の吸収試験

(2) の column chromatography によりえた peak 9 に、

最適比の2倍量の抗血清又は対照として正常血清を加え2時間37°Cにおいて時々振盪後、一夜氷室においた後、遠心して沈降物を除き、その上清を10 γ /0.1 mlになるように生食水で稀釈して、前述の皮膚反応法と同様にして皮膚反応抗原性をしらべた。

iv. 超遠心

前述の(1)及び(2)のcolumn chromatographyでえた各peakの画分を濃縮して、Spinco Type Eを用いて超遠心(約23,000 g)を行ない、各々の沈降恒数を計算した。尚 synthetic boundary cell を使用した。

2. 成績

i. Column Chromatography (I)

電気泳動分画によって得られた画分中、血清反応及び皮膚反応抗原性を示す部分を、イオン交換体 DEAE-cellulose で分画した成績を図7に示した。先ず蛋白量曲線を見ると8つのpeakがみられる。このうち主なものにP1~P7と名付けた。1 M NaOHで溶出したP6が最も高い蛋白量を示し、又このpeakからP7にかけて所のみ糖が測定され、その他のP1~P5には Anthrone 法で検出する糖の存在がみとめられなかった。

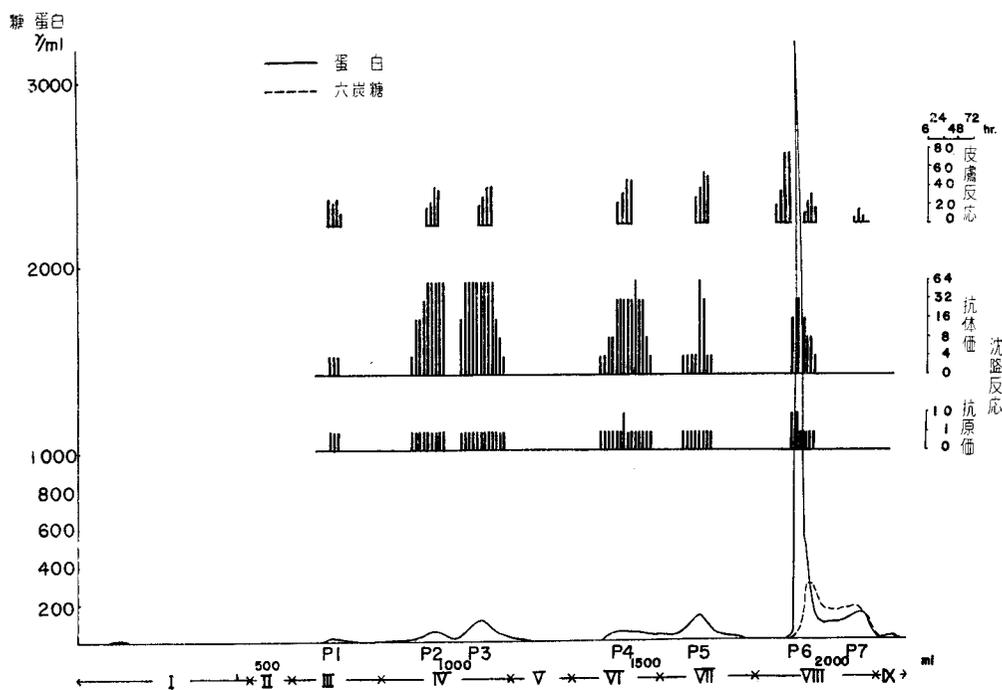


図7. Column Chromatography (I)

展開液

I.	0.005 M NaH_2PO_4	pH 6.8	VI.	0.1 M NaH_2PO_4	+0.2 M NaCl	pH 4.5
II.	0.02 M "	5.9	VII.	"	+0.3 M "	4.2
III.	0.1 M "	4.5	VIII.	1 N NaOH		
IV.	"	+0.05 M NaCl	IX.	1 N HCl		
V.	"	+0.1 M "				

a) 沈降反応抗原性

各画分の沈降反応抗原性をみると、抗原価は、大部分の画分で10倍稀釈陰性で、ただ蛋白量の多いP6の部分で10倍稀釈陽性であった。抗体価は、蛋白量とは全く関係なく、P2, P3の画分においてこの血清反応に使用された抗血清と、精製したTPt3(分画前)との間で示される抗体価の最高値が示され、分画が進むにつれ価が低くなっている。特にP6のように蛋白量の多い所の抗体

価は、この抗血清の抗体価の最高値まで達していない。又糖の証明された画分では抗体価が低いか或いは陰性であった。

b) 皮膚反応抗原性

i. 各peakで反応がみられたが、P6が最も強い反応を示した。時間的経過をみると、P1, P7を除き他はみな48~72時間値の高い定型的な遅延型の反応を示した。特にP6は48時間と72時間の反応が同程度に非常に強

く現われた。P1の反応は6時間と48時間の反応が同程度であって、即時型の反応因子が非常に多く含まれていると思われる。即ち、全体の peak を通じてみると、分画が進むにつれて強い遅延型の反応が現われている。但し糖の含量の高い画分では逆に反応が弱くなっているのが認められる。

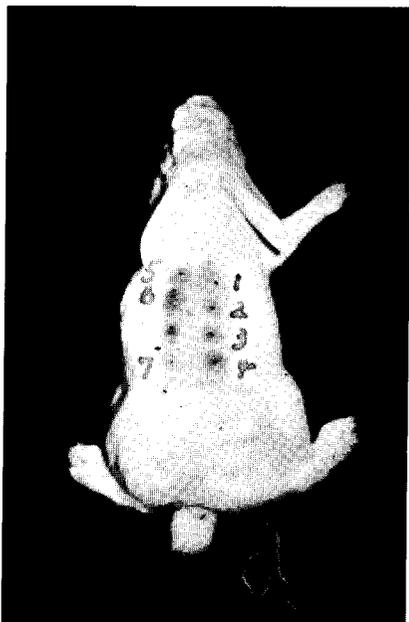


図 8. DEAE-cellulose 分画成分による皮膚反応 (P1, P2, P3, P4, P5, P6 と P7 の中間画分, P7)

ii. Column Chromatography (II)

以上の画分中、図に示したように糖成分及び蛋白成分の多い P6 の部分を DEAE-cellulose で再分画を試みた成績を図 9 に示した。この蛋白量曲線を見ると、0.2 M NaOH によって殆んど蛋白が溶出されている。これらのうち主な peak を P8~P10 と名付けた。糖は全体に少量宛認められるが、特に P10 に多量に証明され

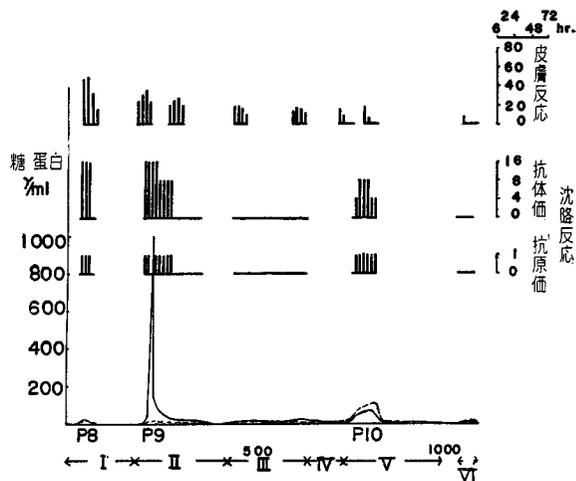


図 9. Column Chromatography (II)

展 開 液

- I. 0.005 M NaH_2PO_4 pH 7.0
- II. 0.2 M NaOH
- III. 0.4 M "
- IV. 0.7 M "
- V. 1.0 M "
- VI. 1.0 M HCl

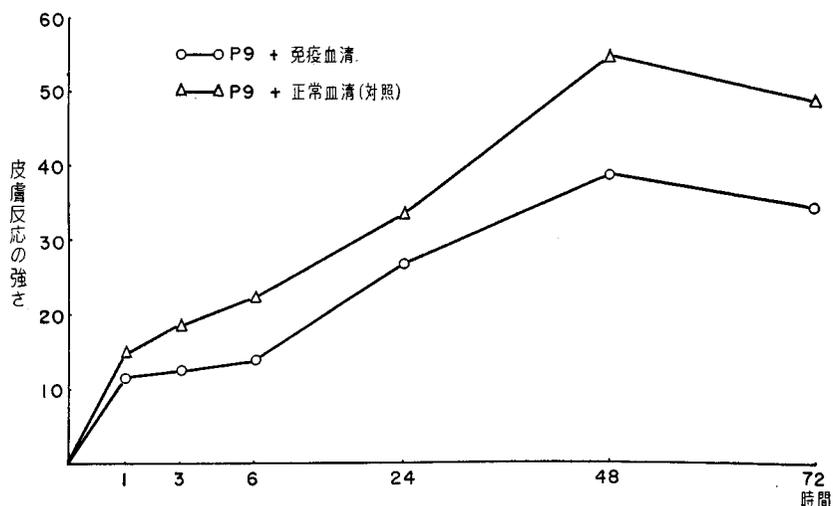


図 1. 沈降反応抗原活性成分吸収後の分画成分 (P9) による皮膚反応

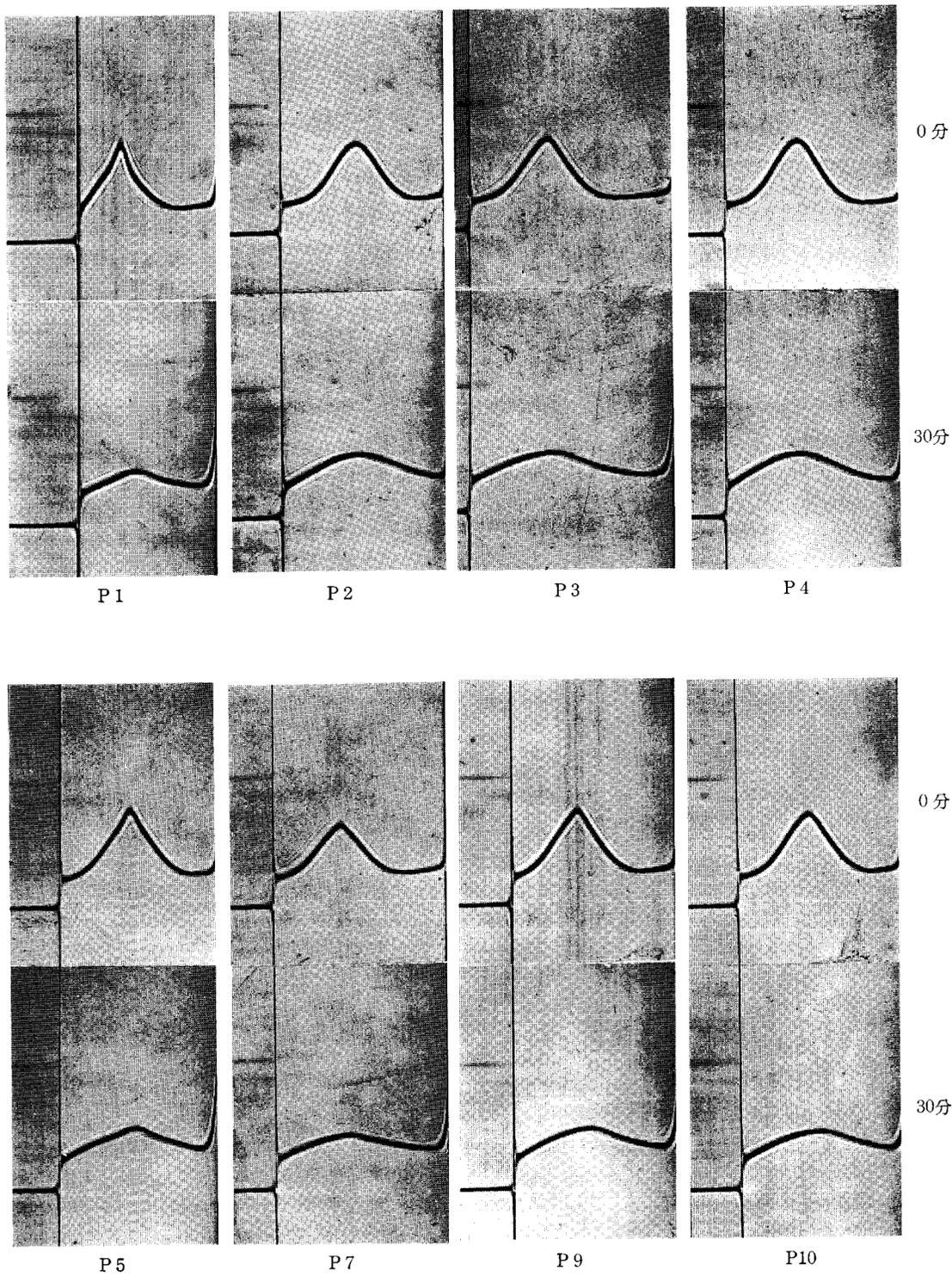


図 11. Column Chromatography の分画成分の超遠心像 (23,000 g)

た。P9の画分は蛋白量に比し糖量は非常に少ない。

a) 沈降反応抗原性

先ず抗原価をみると、10倍稀釈陽性を示す画分はみられなかった。抗体価では、初めの分画成分で高く、P9の後半及びP10では低い。なお、分画前の材料では抗体価32倍稀釈陽性であったが、分画後は最高16倍稀釈陽性であった。

b) 皮膚反応抗原性

P9の画分のみ定型的な遅延型の反応がみられ、P8は即時型の傾向強く、分画の進んだ後の画分では即時型の反応でしかも弱く、特にP10では沈降反応抗原性がみとめられたのに反し、皮膚反応抗原性は異物反応と思われ程度のものが見られるにすぎなかった。

iii. 沈降反応抗原活性成分吸収画分による皮膚反応

P9の沈降反応原吸収後の画分による皮膚反応の成績は図10に示した。免疫血清で吸収した場合は対照に比し明らかに反応が弱くなっているが、まだかなり強い反応が示され、又反応の時間的経過は全く対照と平行して推移することが認められた。

iv. 超遠心的分析

前述の画分中P1, P2, P3, P4, P5, P7, P9, P10をセロファンバッグに入れて扇風機で風を当てて濃縮し、生食水で透析後超遠心を行なった。各超遠心 pattern を写真で示した。ここにみられるように、各 peak の pattern は殆んど同じであるが、P9のみがやや先の尖った peak を示した。各々の沈降恒数は次のようである。

$S_{20, W} = P1$	0.6×10^{-3}
P2	0.9
P3	0.8
P4	0.7
P5	0.9
P7	0.7
P9	1.9
P10	0.8

3. 小 括

Zone electrophoresis 分画成分中、各種反応にあずかる画分を、イオン交換体 DEAE-cellulose を用いて、column chromatography で更に分画して10の主な画分をえた。そのうち糖を証明することの出来ない5つの画分をうる事が出来た。各分画成分を抗原とする沈降反応抗体価は、分画の初めに高値がえられており、蛋白量とは平行していない。又皮膚反応抗原性は、蛋白量の最も多い画分で最強の定型的な遅延型の反応がみられたがその他の画分でも定型的な遅延型反応を示した。ただ分画の初めの方では即時型の傾向の強い反応がみられた。皮

膚反応抗原性と沈降反応抗原性の強さは平行していない。又糖の含量とは全く関係がみとめられなかった。各画分の超遠心像は殆んど同じであるが、沈降恒数では、蛋白量の最も多い画分にだけ特に高い値がえられた。

総括及び考按

ツベルクリン蛋白(以下「ツ」蛋白)が、皮膚反応抗原性及び血清反応抗原性を持っていることは緒言に述べたが、単一な蛋白成分から成立っていないことは Seibert³⁾ の詳細な研究以来明らかなことである。彼女のアルコール及び醋酸を用いた分画法によると、A, B, C の3種の蛋白が分けられ、これらはそれぞれ化学的、電気泳動的、生物学的性状が異なることが報告されている。今回われわれが最初の分画材料としてえたものは、三塩化醋酸を用いて pH 4.0 で沈澱させてえた「ツ」蛋白で、Seibert の分離した protein C に相当するものである。勿論各材料によって化学的に全く同じ組成であるということは不可能で、われわれの TPt 2 と TPt 3 でも N 量及び P 量に僅かの差がみられているが、Seibert の分画蛋白の多糖体含有量と我々の材料を比較すると、我々の方が遙かに少ないが、A, B, C 蛋白の中では C 蛋白が最も近似な値を示している。

さて、われわれのこの TPt には、化学的組成にみられるように2%の糖の含有がある。細菌の多糖体成分が沈降反応原として強い活性をもっていることは、肺炎菌多糖類 SSS⁹⁾ でよく知られている事実であるが、この混入している糖が、「ツ」蛋白の皮膚反応抗原性及び血清反応抗原性と関係あるかどうかということは興味のある問題で、これを解明するために TPt を更に電気泳動及びイオン交換体による column chromatography を利用して分画を進めたのである。

先ず電気泳動的実験の成績からみると、TPt 2 は蛋白としては1つの peak を示している。しかしその糖含量が蛋白量と平行していないことから、全部が単一な蛋白から成立しているとは考えられない。この糖が糖蛋白の形で存在するのか、或いは free の形で存在するのかは証明できなかったが、少なくとも陽極側に移動した糖は恐らくは糖蛋白の形で存在するのであろうと想像される。この電気泳動的な分画成分と、血清反応抗原性の活性を示す分布をみると、蛋白 peak と完全に一致していると認められるものは、われわれのみた反応範囲内では見当らない。Boyden 反応抗原性が蛋白 peak に一番密接な関係をもち、Middlebrook-Dubos 凝集反応、Middlebrook 溶血反応は糖含量と関係あると思われる。今迄の報告で、Boyden 反応は蛋白がタンニン酸処理した血球

に吸着されて抗原として作用するといわれ¹⁰⁾、Middlebrook 反応は多糖体が抗原となるといわれているが^{11)・12)}、われわれの結果も同じ成績をえたと思われる。しかし、これらの凝集反応は他の血清反応と異なり、あらかじめ血球を抗原で感作し、この感作血球を抗原として反応をみるという段階があるので、血球感作の至適抗原濃度の問題があり、この感作程度が抗体価にまで影響を与えることから、単純に抗原活性の強さを抗体価から判定できない。今回は詳細な検討をしなかったものでこれ以上の考察はさけない。沈降反応についてみると、その抗原活性は明らかに蛋白 peak より低易動度側に偏っており、蛋白よりむしろ糖と関係あることを思わせる。しかしここで注意しなければならないことは、われわれが実験手技として用いた重層法による沈降反応では、単一の成分が抗原となっている場合には、抗体価は抗原物質の量に関係するのではなく、目で判定しうる反応を惹起する最少の抗原量さえあれば、すべて同じ抗体価を示すはずである。従って糖の含有量や蛋白の含有量とは平行した値がえられないのが当然であって、この成績だけから蛋白又は糖何れか一方と、沈降反応抗原性の関連性を結論することはできない。特に前述したように、肺炎球菌多糖体は沈降反応抗原として優秀であるといわれており又結核菌多糖体¹⁴⁾についても抗原性が高いことが報告されているが、それは抗原稀釈による抗原価であって、抗血清稀釈による抗体価に関しては必ずしも高くはない。われわれの報告にみられるように、死菌免疫兎に対する沈降反応において、同じツベルクリン lot から分画した蛋白、多糖体に対する抗体価をみると、蛋白抗原が最も高い抗体価を示し、多糖体はそれより低く、しかも多糖体画分中では蛋白含量の多い程高いという結果がえられている¹⁵⁾。このことから、高い抗体価を示す画分が低易動度側に偏っていても、蛋白と糖が混入している以上どちらの成分に対する抗体価を示しているのか判明しない。抗原価については、最高 1000 倍稀釈陽性であり、この陽性範囲内の蛋白含量又は糖含量の間の差が 100 倍もない。以上から少なくとも 4 つ以上の異なる抗原成分が含まれているであろうと推定される。これらを更に分画するには電気泳動法のみでは不可能と思われ、イオン交換体の利用を計画したのである。

一方、電気泳動的な分画成分による皮膚反応の強さは、全く蛋白量と平行していると思われる。皮膚反応は蛋白量を一定にして行なったのであるから、この蛋白 peak に皮膚反応抗原活性の高い蛋白があるのか、又は高密度に含まれていることを示すと思われる。蛋白量一定で皮膚反応をみた場合には、血清反応と異なり、抗原量が、

又は抗原活性の強さが 2 倍であっても、反応の強さが 2 倍にはならない。従って反応の低い画分と高い画分の抗原活性の差は、図にみられるよりもっと大きいと思われる。この点は、反応出現の最少量を測定することによって証明できるであろう。

第 2 の蛋白分画方法として DEAE-Cellulose を用いて column chromatography を行なったが、DEAE-cellulose は最近よく蛋白の分画に用いられるようになってきた^{16)・18)}。山村¹⁹⁾等は結核菌体蛋白をペプチドにまで分解して、これを DEAE-cellulose で分画しているが、これでえた 4 つの画分には何れも高い「ツ」活性が認められたと報告している。われわれは、化学的な分解をせずに、電気泳動的に分画した 1 つの peak だけをとって、蛋白分子のままの形で DEAE-cellulose で分画したのであるが、2 段階の方法では約 12 の分画がえられたが、その主なもの 10 だけについてみた成績では、何れも沈降反応抗原性と皮膚反応抗原性を認めることができた。しかし、その各 peak の反応抗原性は必ずしも同一ではない。重要なことは、糖を測定することのできなかった蛋白だけの画分でも高い沈降反応抗原性及び強い皮膚反応がえられたことで、糖の証明された部分は両者共むしろ弱い反応であった事である。即ち蛋白成分そのものが、結核動物においては沈降反応抗原として高い抗体価を証明する抗原性を持っており、更に血清抗体として多糖体に対するよりも、蛋白に対して多量の抗体が作られていることを示すものと考えられる。又、分画の初めに沈降反応抗原活性の高いものが現われて、皮膚反応抗原活性は、塩濃度の高い展開液になってから溶出して来て、しかも蛋白濃度の最も高い画分に強くみられており、従って両反応における抗原活性の強さが平行していない。このことは、両反応の抗原成分が完全に同一なものではないことを示していると思われる。しかし、沈降反応抗原性を吸収した画分による皮膚反応実験で、対照に比し反応の低下がみられたことは、沈降素に結合した抗原成分の中に、皮膚反応を惹起する成分も含まれていることを示すと考えられる。しかし結核血清内にも少量ながら皮膚反応性抗体が含まれている⁴⁾ことから、その作用による可能性もある。何れにしても、沈降反応抗原と異なる蛋白成分が皮膚反応抗原性を現わしていることを証明するものである。更に個々の皮膚反応の型式についてみると、定型的な遅延型の反応を示す画分と、即時型の傾向の強い反応を示す画分とがあるのがみられる。「ツ」反応でも即時型の反応を呈するものがあることは既に報告されているが^{20)・21)}、生体側の因子のみでなく、抗原成分の中にも即時型の反応をおこすものが含ま

れているということは興味がある。最後に沈降恒数についてみると、各 peak の値は P9 を除いて大体近い値を示している。生物学的性状の違いを、沈降恒数の差から導き出すことは困難である。ただ P9 だけが他に比較して非常に大きいということは、この最も多い蛋白画分の中の大部分は、沈降恒数の大きい、しかも沈降反応又は皮膚反応とは直接関係のない蛋白成分、恐らくは変性蛋白成分からなるのであろうと考えられる。

以上の成績から、蛋白成分が、「ツ」反応及び沈降反応の抗原性をもっていることを証明した。両反応の抗原成分が、全く別個の蛋白成分からなるかどうかは現在の所結論出来ないが、或程度の分離は可能であった。又「ツ」反応の特徴である遅延型反応の他に即時型反応を示す抗原成分が認められた。即ち化学的操作でえた精製「ツ」蛋白を、物理的操作の組合わせて更に生物学的活性の程度の異なるいくつかの画分に分けることができることを証明した。

結 論

1. 三塩化醋酸沈澱によりえた「ツ」蛋白を、電気泳動、DEAE-cellulose による column chromatography で更に分画し、各分画成分について血清反応抗原性、皮膚反応抗原性、沈降恒数の測定を行なった。

2. 沈降反応及び皮膚反応抗原性は、糖を含まない蛋白成分に強くみとめられた。しかし両反応の強さは平行しない。

3. 沈降反応抗原性を吸収したあとも、皮膚反応抗原性は残っていた。

4. 遅延型反応をおこす抗原成分の他に、即時型反応をおこす抗原成分が分離された。

5. 分画成分の大半は近似の沈降恒数を示したが、蛋白量の多い1つの画分だけが他に比し、大きな値を示した。これは、かなりの変性蛋白成分が「ツ」蛋白の中に含まれていることを示すものと考えられる。

文 献

- 1) Seibert, F. B. & Glenn, J. T.: Amer. Rev. Tuberc., **44**, 9 (1941).
- 2) Heidelberger, M. & Menzel, A. O.: J. Biol. Chem., **104**, 655 (1934).
- 3) Seibert, F. B.: Amer. Rev. Tuberc., **59**, 86 (1949).
- 4) 萩原昭男: 結核の研究, **11**, 96 (1959).
- 5) 実験化学講座, 23, 生物化学 I, 日本化学会編, 丸善 (1957).
- 6) 小野勝男, 高橋義夫: 結核の研究, **9**, 1 (1958).
- 7) 小野勝男: 結核の研究, **10**, 1 (1958).
- 8) Scheidegger, J. J.: Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
- 9) Heidelberger, M., Kendall, F. E. & Scherp, H. W.: J. Exp. Med., **64**, 559 (1936).
- 10) Boyden, S. V.: J. Exp. Med., **93**, 107 (1951).
- 11) Middlebrook, G. & Dubos, R.: J. Exp. Med., **88**, 521 (1948).
- 12) Middlebrook, G.: Amer. Rev. Tuberc., **62**, 233 (1950).
- 13) Middlebrook, G.: J. Clin. Invest., **29**, 1480 (1950).
- 14) Seibert, F. B.: J. Immunol., **65**, 297 (1950).
- 15) 森川和雄, 奥山春枝, 富崎方子: 結核の研究, **15**, 57 (1961).
- 16) Sober, H. A., Gutter, F. J., Wyckoff, M. M. & Peterson, E. A.: J. Amer. Chem. Soc., **78**, 756 (1956).
- 17) Peterson, E. A. & Sober, H. A.: J. Amer. Chem. Soc., **78**, 751 (1956).
- 18) Askonas, B. A., Forthing, C. P. & Humphrey, J. H.: Immunology, **3**, 336 (1960).
- 19) 岡田吉美, 森沢成司, 安孫子雍史, 庄島賢治, 山村雄一: 生化学, **32**, 96 (1960).
- 20) 松田利雄: 結核の研究, **14**, 45 (1961).
- 21) McKee, W. D. & Favour, C. B.: Amer. Rev. Resp. Dis., **83**, 243 (1961).