

Filaria 症診断用皮内反応抗原 FST についての研究

抗原 FST 構成蛋白質とその抗原活性について

佐藤久美子

群馬大学医学部寄生虫学教室 (主任 沢田利貞教授)

(1968年12月26日 受領)

Filaria 症の免疫学的研究はその免疫学的診断法確立の必要に応じてこれまでに種々の方面から検討されてきた。特に皮内反応による診断法は短時間に多人数の検査が可能であることからすでに1930年頃から反応抗原の開発が試みられ、*Dirofilaria immitis*, *Setaria equina*, *Litomosoides carinii*, *Onchocerca volvulus* 等の成虫から抽出した抗原をはじめ、*Wuchereria bancrofti* 仔虫や患者尿等から抽出した抗原について多数の研究報告が行われてきた(森下ら, 1962)。なかでも *D. immitis* から得た抗原に関する研究がもつとも多い。しかしいずれの報告も虫体を磨砕した後、各種緩衝液で抽出したままの粗抗原か、精製初期段階の抗原を用いていた。そのためある程度の抗原活性は認められても反応が微弱であったり、非特異的反応が強かつたりして診断用抗原として実用化されるまでには至らなかった。大石ら(1961), Sawada *et al.* (1962a, 1962b, 1965), 武井ら(1964)はより特異性の高い抗原を得るために *D. immitis* 虫体より抽出した粗抗原について、等電点沈澱法, Sephadex G-100を用いた gel filtration, carboxymethyl cellulose (CM cellulose) および diethylaminoethyl sephadex (DEAE sephadex A-50) による column chromatography 等を順次行つて精製を試み、非常に診断率の高い

抗原 FSCD1 (FST) を開発した。そして FST について *Wuchereria bancrofti* 仔虫(Mf) 陽性者に蛋白量として0.05 μ g (saline 0.02ml にとかしたもの) の皮内注射を行つた場合、85%以上の陽性率を認め、他の寄生虫症との間の類属反応や非特異的反応をほとんど認めないことを報告した。さらに FST は微量の糖を含むが pronase nagase, trypsin 等の蛋白質分解酵素を作用させると抗原活性がかなり失われることから FST の主な抗原活性因子は蛋白質であろうと推定した。

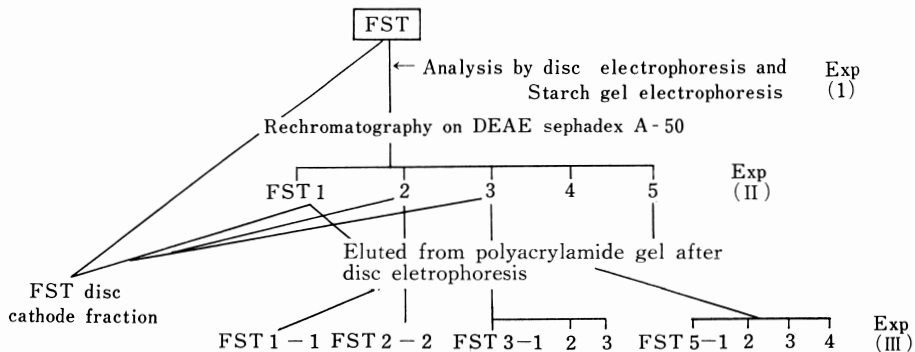
著者は沢田らの方法に準じて *D. immitis* 虫体から分離した FST について皮内反応に関与する抗原物質の本態を追求するために研究を進めてきた。今回、蛋白質化学の分野で分析の手段として定評を得ている Disc electrophoresis, および starch gel electrophoresis を用いて FST を構成している蛋白質について検討すると同時に DEAE sephadex column chromatography および disc electrophoresis によつて各分画成分を抽出し、それらについての抗原活性を検討し、二、三の知見を得た。

実験材料及び方法

実験は Table 1 の順序にしたがつて行われた。

FST の精製: *D. immitis* 乾燥虫体より 0.1M ph-

Table 1. Preparation and purification of FST



osphate buffer (pH 7.2) によつて抽出した粗抗原を沢田らの方法に準じて trichloroacetic acid を用いた等電点沈澱法, Sephadex G-100による gel filtration, CM cellulose, DEAE sephadex A-50による column chromatography を順次行い, FSCD1 (FST) を得た。

DEAE sephadex A-50による column chromatography: 0.5N NaOH および0.5N HCl を用いて定法により洗滌した DEAE sephadex A-50を0.002M phosphate buffer (P. B.) (pH 6.5) で数回洗滌し, 1.5×23 cm の column につめた後同一 buffer で平衡化した。あらかじめ用意した FST 108.8mg を4 ml の純水に溶解し, 200倍容の純水に5時間透析して十分脱塩した。さらに0.002M P.B. (pH 6.5) 500倍容に15時間透析した後, 14,000 rpm で30分間遠沈した。得られた上清を column に添加し, 0.002M P. B. (pH 6.5) および0.02M P.B.-0.35M NaCl (pH 6.0) を用いて溶出した。溶出は5 ml 宛試験管に採取した。各溶出 fraction の蛋白質量測定は Phenol 試薬を用いた Folin 法の Lowry らの改良法(1951)によつて行つた。

Disc electrophoresis: Ornstein (1964) と Davis (1964) の原法に準じて行つた。緩衝液系としては血清蛋白質分離用として考案された系を用い, 装置は林理化学器械製作所製のものを使用した。蛋白質の検出は amido black 10B によつて行つた。

Starch gel electrophoresis: Smithies (1959) の原法に準じガラス板上に調製した薄層 gel を支持体として行つた。緩衝液として disc electrophoresis を行うさいに使用した tris glycine buffer (pH 8.45) を使用した。蛋白質の検出は amido black 10B によつた。

Polyacrylamide gel 内からの各 fraction の抽出: disc electrophoresis を行つた後にガラス管から抜き出した polyacrylamide gel 12本のうち1本は直ちに amido black 10B で染色し, 11本はドライアイスにて凍結した。次に染色された各 fraction に一致した fraction を抽出するため凍結ゲルをカミソリで刻み, それぞれを試験管に分別してガラス棒で十分磨砕した。5倍容の生理食塩水を加えて良く攪拌した後, ピーカーに移し, 一晚冷蔵庫に放置した。東洋濾紙 No. 2 にて濾過した後, 残渣について再び同様の操作を繰り返えし, 得たすべての濾液をそれぞれ集めて ultrafiltration によつて濃縮した。(ultrafiltration: 任意の緩衝液をみたした2 l の吸引フラスコ中で Visking Co. 製 cellulose tubing $\frac{8}{32}$ につめた試料をアスピレーターで吸引した)。

皮内反応と陽性判定の方法: 有病地の FST 陽性者を対象に選び, すべての抗原について蛋白質として一人当たり0.05 μ g (0.02ml の saline に溶解したもの) を皮内に注射し, 15分後に腫脹および発赤の有無を観察した。現われた腫脹の長径と短径を計測して記録し, 両者の平均値が7 mm 以上の者を陽性と判定した。

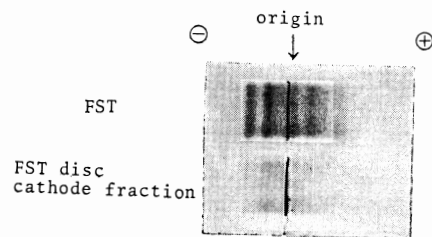
実験成績

1. 抗原 FST 構成蛋白質の電気泳動による解析

抗原 FST について disc electrophoresis を行つた後 polyacrylamide gel を amido black 10B で染色したところ明らかに識別出来る band を10本認めた (Fig. 1)。しかし同時に添加した brom phenol blue (BPB) (蛋白質に吸着しない BPB は蛋白質に先だつて陽性側へ移動する) が一部陰極側へ移動することを認め, BPB に染色され, しかも陰極側へ移動する disc 陰極分画物質の存在を確認した。さらに disc 陰極分画物質について検討するため disc electrophoresis を行うさいに直径1.2cm のガラス管を使用し, ガラス管の陰極側に Visking cellulose tubing を接続して移動してきた disc 陰極分画物質を集めた。これらについて starch gel electrophoresis を行つたところ, これらの物質は少な



a) Disc electrophoresis of FST



b) Starch gel electrophoresis of FST and FST disc cathode fraction

Fig. 1 Electrophoretic analysis of FST

くとも2種類の陰極側へ移動する物質と, 陽極側へ移動するがきれいな band にならない物質から構成されていることを確認した (Fig. 1)。以上の結果から FST には少なくとも12種類の蛋白質が含まれていることがわかつた。

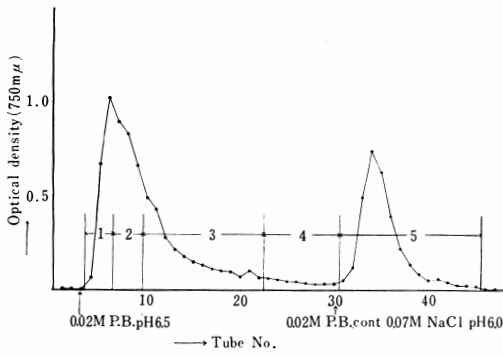


Fig. 2 Chromatography of FST on DEAE sephadex A-50.

column size, 1.5×23 cm; column loading, 108.8mg; fraction volume, 5ml; flow rate, 25ml/hr.; effluent buffer, 0.002M phosphate buffer, pH 6.5 and 0.02M phosphate buffer, containing 0.35M NaCl, pH 6.0

2. 抗原 FST の DEAE sephadex A-50 を用いた column chromatography による分画とその分画物質の抗原活性について

抗原 FST を構成する蛋白質の各々を分離するために DEAE sephadex A-50 を用いて column chromatography を行つたところ、2つの主な peak を認めた (Fig. 2). しかし第1 peak の右側には再現性の高い小さな peak が存在したので、第1 peak はかなり異つた種類の蛋白質から構成されているものと思われた。第1 peak の各溶出液についてそれぞれ disc electrophoresis を行つて含有されている蛋白質の種類および量的比率を検討し、第1 peak を FST1, 2, 3 の3 fractions に分画した。第2 peak はそのまま集めて FST5 とし、第1 peak と第2 peak の中間分画を FST4 として各 fraction をそれぞれ濃縮し、これら 5 fractions につい

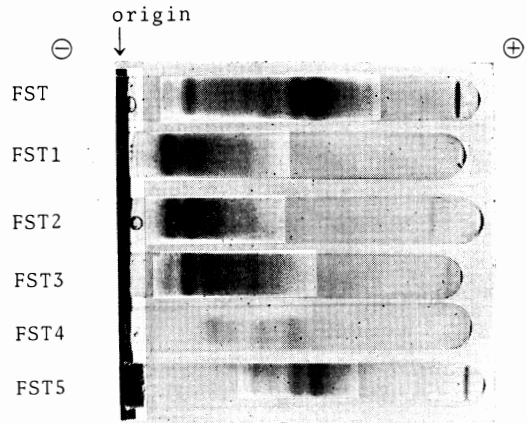


Fig. 3 Disc electrophoresis of FST1, 2, 3, 4, 5 fractionated by column chromatography on DEAE sephadex A-50.

て disc electrophoresis を行つた (Fig. 3). 各 fraction とも数種類の蛋白質から構成されており、また各々の fraction は移動度の等しい band をある程度共有していることがわかつた。さらに starch gel electrophoresis の結果 FST1 および 2 の構成蛋白質の大部分は Disc 陰極分画物質であり、また disc 陰極分画物質は FST3 にも含まれていることがわかつた。FST1, 2, 3, 4, 5 および実験 I で得た disc 陰極分画物質について FST 陽性者に皮内反応を行い反応陽性率によつて抗原活性を観察した (Table 2). いずれの fraction にも抗原活性を認めたが、FST3 の陽性率が 92.3% でもつとも高く腫脹径も大きく、抗原活性が強いものと思われた。FST3 は disc 陰極分画物質および polyacrylamide gel 内に移動する 4 種の主な蛋白質から成つており、それらの蛋白質の一部は FST1 および 2 と共通、他の一部は FST4 と共通であつた。FST1 および 2 の反応陽性率はそれぞれ

Table 2 Results of skin tests on positive individuals with antigen FST with each of 5 antigens fractionated by DEAE sephadex A-50 column chromatography

Antigens	Mean diameter of wheal (mm)											No. tested	No. positive	% positive
	0-5.9	6-6.9	7-7.9	8-8.9	9-9.9	10-10.9	11-11.9	12-12.9	13-13.9	14-up				
FST1	6	6	7	4	1	1					1	26	7	27
FST2	5	3	8	2	1	1						20	4	20
FST3	1		1	4	4	5	5	2	1	2	1	26	24	92.3
FST4	4		3	6	1	1						15	8	53.3
FST5	2		2	2	4	6	3	3	2	2		26	22	84.6
Disc cathode fraction	7		8	1	1	1		1				20	5	25

れ 27%, 20% であった。FST4 の反応陽性率は Lot. No. によつてかなり変動したが平均陽性率は約 50% であった。FST5 は 6 種類の蛋白質から成る fraction で反応陽性率は 84.6% であり、腫脹径も大きく、したがつて抗原活性も強いものと思われた。disc 陰極分画物質の陽性率は 25% であり、FST について強陽性であつた者に反応したにすぎなかつた。以上の結果から主として FST3 および 5 に強い抗原活性を持つ物質が集まつてゐると推定された。

3. Polyacrylamide gel 内から抽出した成分とそれらの抗原活性について

実験 2. において得られた強い抗原活性を持つ FST3 および 5 はいずれも数種類の蛋白質から構成されてゐたため、単一でしかも抗原活性の強い物質を得るために、disc electrophoresis を行つた後に polyacrylamide gel から各構成蛋白質を抽出することによつて分離し、

それらの各々について抗原活性を検討した。

まず、FST3 から FST3-1, 3-2, 3-3 の 3 fractions を抽出し濃縮した後、再びこれらについて disc electrophoresis を行い (Fig. 4), 含有成分を検討した。FST3-1 は狭雑物のほとんど認められない純度の高い fraction であり、FST3-2 は FST3-1 と共通な蛋白質と他の 2 種類の蛋白質から構成されてゐた。FST3-3 は FST3-2 の構成蛋白質の一部と他の 1 種類の蛋白質から構成されてゐた。以上 3 種類の抗原を用いて皮内反応を行つたところ (Table 3), いずれの抗原にも反応活性を認めしたが FST3-1 の陽性率が 66.7% でもつとも高く、平均腫脹径も大きかつた。FST3-2 の陽性率は 47.6%, FST3-3 の陽性率は 57.1% であつた。

次に FST5 について同様の方法で得られた FST5-1, 5-2, 5-3, 5-4 の 4 fractions について再び disc electrophoresis を行い構成蛋白質を検討した (Fig. 4)。

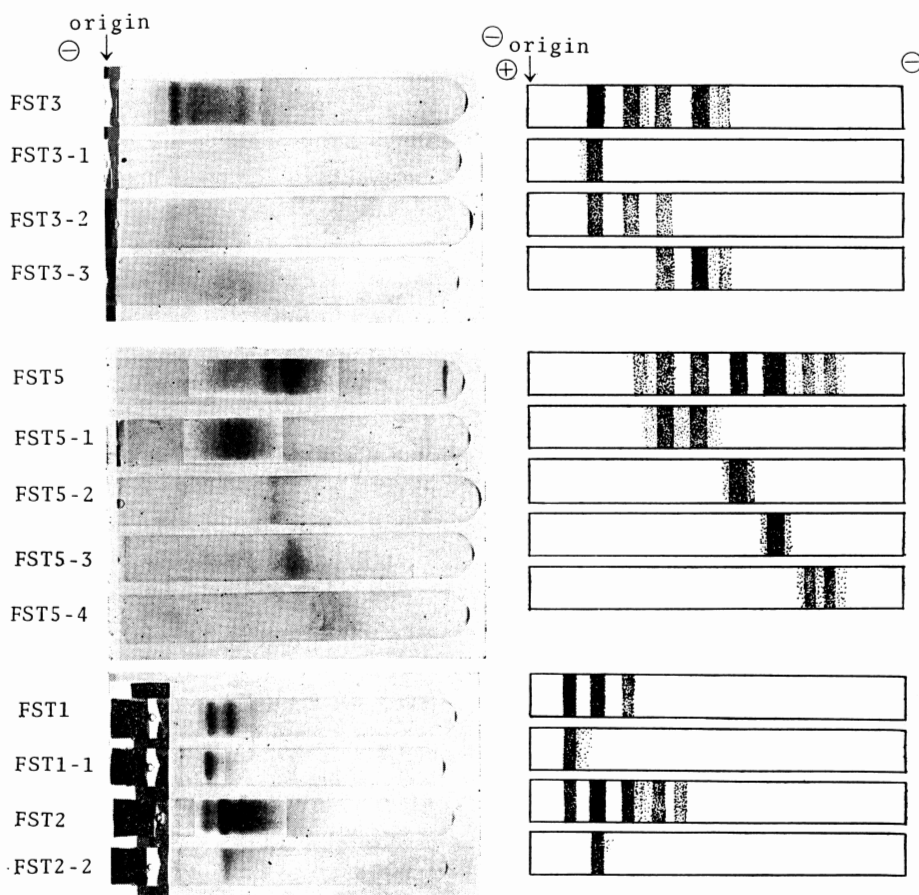


Fig. 4 Disc electrophoresis of antigens separated from FST3, 5, 1 and 2.

Table 3 Results of skin tests on positive individuals with antigen FST with each of 9 antigens separated from FST3, 5, 1 and 2

Antigens	Mean diameter of wheal (mm)										No. tested	No. positive	% positive	
	0	1-5.9	2-6.9	3-7.9	4-8.9	5-9.9	6-10.9	7-11.9	8-12.9	9-13.9				10-14-up
FST 3-1	3	2	2		2	1	1	2		2	6	21	14	66.7
FST 3-2	4	2	5	2	2		2	2	1	1		21	10	47.6
FST 3-3	1	4	4	2	3	1		1	2	2	1	21	12	57.1
FST 5-1	1	2	4	4	5	2	1	2		1		22	15	68.2
FST 5-2	6	4	3	4	3	2						22	9	40.9
FST 5-3	10		2	2	4	4						22	10	45.5
FST 5-4	9	2	2	2	2	4	1	2				22	12	54.5
FST 1-1	5	4	5	2	4	1	1	2	2			26	12	46.2
FST 2-2	1	1	1	7	3	1	3	2				20	16	85

FST 5-1は主として2種類の蛋白質から構成されている。FST 5-2, 5-3はBPBに良く染色されるfractionでgelからの切断、抽出が容易であったためdisc electrophoresis上ほとんど単一であった。FST 5-4は2種類以上の成分から成っていたが、FST 5中に占める割合は少なかった。以上の抗原についてそれぞれ皮内反応を行ったところ (Table 3), FST 5-1は反応陽性率68.2%で、平均腫脹径も大きく、かなり抗原活性の強いことが推定された。FST 5-2の陽性率は40.9%であり、FST 5-3の陽性率は45.5%であった。FST 5-4の陽性率は54.5%で、FST 5-2, 5-3に比較するとわずかながら活性が強いように思われた。またFST 5-1中陽極側へ移動するfractionはdisc electrophoresisにおいてFST 3-3のうちもつとも陽極側へ移動するfractionと等しい移動度であることがわかった。以上の結果から、FST 3および5から分離した7 fractionsは強弱の差は見られたが、すべて抗原活性を持つことが確認された。また純度が高く、しかも反応活性に富むfractionはFST 3-1であった。

一方、前にも述べたようにFST 3とFST 2は共通のfractionを含んでおり、FST 3-1に相当するfractionはFST 2にもかなり多量に含有されていたので、disc electrophoresisを行った後にそのfractionを抽出しFST 2-2とした。またFST 1からpolyacrylamide gel内に泳動される2成分のうち原点に近い方の成分を抽出分離しFST 1-1とし、両者について再びdisc electrophoresisを行って純度を検討した結果、かなり単一な状態で分離されたことがわかった (Fig. 4)。それらを抗原として皮内反応を行ったところ、FST 1-1の陽性率は46.2%であり高くなかったが、FST 2-2の陽性率は

85%と非常に高く抗原活性の強いことがわかった (Table 3)。

総括及び考察

沢田らの方法に準じて精製したFilaria症診断用皮内反応抗原FSTについてdisc electrophoresis, starch gel electrophoresisを行い構成成分を分析した。またDEAE sephadex A-50を用いたcolumn chromatographyおよびdisc electrophoresisを行った後にpolyacrylamideから各成分を抽出して、その各々を抗原として皮内反応を行い抗原活性について検討した。その結果FSTは12種類以上の蛋白質から構成されており、それらの各々が強弱の差はあるにしろ抗原活性を持っているがFST 3-1の抗原活性がもつとも強いことがわかった。またdisc electrophoresis上の移動度、抗原活性の強さ、およびDEAE sephadex column chromatographyによる分画方法等を考慮するとFST 2-2はFST 3-1と等しい蛋白質であると考えられた。

Disc cathode fractionは全くgel内に泳動されないため、塩基性の強い蛋白質あるいは分子量が非常に大きい蛋白質のいずれかであろうと推察された。しかしstarch gel electrophoresisにおいて陰極側へ移動すること、FSTについてSephadex 4Bを用いgel filtrationを行うとgel内に拡散すること等から塩基性の強い物質であると考えられた。これらは皮内反応の結果抗原活性の弱いことがわかったが、FST中に占める量的割合が多いこと、またCM celluloseを用いたcolumn chromatographyによつてDisc陰極分画物質を分離し(狭雑物を少量含む)、その抗原活性を観察したところ陽性率があまり落ちなかったことから今後検討を続ける必要がある。

FST 4 の皮内反応陽性率は Supply No. によつてかなり変動した。これは FST 4 が FST 3 と FST 5 の谷間の fraction のため分画のさいに各 Supply に含まれる蛋白質の種類とその含有量が変化するためと思われた。FST 1 および 2 の抗原活性は弱かつたが、それらには disc 陰極分画物質が多量に含有されていた事実からみて当然の結果であつた。また FST 5-1 のうち原点に近い fraction を分離抽出し皮内反応を行つたところ、陽性率は 40% で FST 5-1 の陽性率 68.2% に比べ低かつた。

これまでの結果を総合すると一般に FST から分離した抗原は精製が進むにつれて FST に比べ抗原活性の弱まる傾向が見られた。

林ら(1967)は *D. immitis* 感染犬において FST 1, 2, 3, 4, 5 の 5 抗原について皮内注射を行い反応を観察したところ、FST 陽性者における成績と同様 FST 3 がもつとも強く FST 5 もかなり強いことを認めた。しかし polyacrylamide gel からの抽出抗原である FST 3-1, 3-2, 3-3, おらび 5-1, 5-2, 5-3, 5-4 の皮内反応の結果ヒトの場合と異なり FST 3-3, 5-4 が強いと報告した。*D. immitis* から同時に得た抗原についてこのように異つた結果を得たことは今後の研究を進める上に注目すべきことと考える。

石井ら(1961)は *Paragonimus westermanii* において森沢らの開発した結核菌からツベルクリン反応活性を有する塩基性ペプチド抗原を精製する方法に準じて皮内反応抗原を精製したが、多田ら(1962)は同様の方法を用いて *D. immitis* 虫体より皮内反応抗原 FST を精製し、1 μg (0.05ml saline) の皮内注射で陽性判定に十分であることを報告した。しかし FST および FST から分離精製した各 fraction は蛋白量として 0.05 μg の少量で反応に十分であつた。これまでに ribonuclease をはじめ、いろいろな蛋白質の免疫化学的な研究において蛋白質の立体構造が抗原抗体反応に重要な関係を持つことが指摘されており(山村ら編, 1963)、本皮内反応においても反応に関与する抗原の立体構造や物理化学的性状と抗原活性因子との関係について究明すべき点が多く残されている。

要 旨

D. immitis 虫体より沢田らの方法に準じて精製した抗原 FST について disc electrophoresis および starch gel electrophoresis を行つて構成蛋白質の種類について検討した。また DEAE sephadex A-50 を用いた

column chromatography による分画および disc electrophoresis を行つた後に polyacrylamide gel 内より抽出した各成分について皮内反応を行いそれぞれの抗原活性を検討した。

1) FST は disc electrophoresis のさいに polyacrylamide gel 内に泳動される少なくとも 10 種類の蛋白質と陰極側へ移動する 2 種類以上の Disc 陰極分画物質、合わせて 12 種類以上の蛋白質から構成されていることが確認された。

2) FST につき DEAE sephadex A-50 を用いて column chromatography を行い FST 1, 2, 3, 4, 5 に分画し各々の fraction の構成蛋白質を再び disc electrophoresis によつて検討すると同時に、5 fraction について FST 陽性者に皮内反応を行い、反応陽性率によつて抗原活性を検討した結果、強弱の差があつたがいずれの fraction にも抗原活性が認められた。しかし、FST 3 の抗原活性がもつとも強いと推定された。Disc 陰極分画物質の反応陽性率は 25% で活性が弱く、したがつてこれが多量に含まれている FST 1, 2 の抗原活性は弱かつた。

3) FST 1, 2, 3, 5 の 4 fractions についてそれぞれ disc electrophoresis を行つた後に polyacrylamide gel 内より FST 1-1, 2-2, 3-1, 3-2, 3-3, 5-1, 5-2, 5-3, 5-4, の 9 fractions を抽出し濃縮した後再び Disc electrophoresis によつてそれらの含有蛋白質について検討した。また、それらを抗原として皮内反応を行い抗原活性を検討したところ、いずれの fraction にも活性が認められたが disc electrophoresis による解析でほとんど単一であると認められた FST 2-2 および FST 3-1 の活性がもつとも強かつた。FST 2-2 と FST 3-1 は電気泳動上の移動度が全く等しく、また抗原活性が強かつたことから同一物質であると推定された。

4) polyacrylamide gel 内から抽出した fractions の反応陽性率は FST に比べいずれも弱く、精製が進むにつれて抗原活性の低下する傾向がみられた。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を頂いた沢田利貞教授に深く感謝致します。また御指導と皮内反応検査に御助力下さつた佐藤重房助教授、FST 作製にあたり御援助下さつた武井一利助手、実験に御協力下さつた野口美登里氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) Davis, B. J., 1964: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum pro-

- tein. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- 2) 林滋生(1967) : フィラリア症の免疫学的研究. 42年度文部省研究報告集録(医学及び薬学) 540. 及び未発表.
 - 3) 石井洋一・森浜誠司(1961) : 肺吸虫症の皮内反応“ペプチッドの皮内反応”. 福岡医学雑誌, 52, 594-602.
 - 4) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
 - 5) 森下薫・小宮義孝・松林久吉編輯(1962) : 日本における寄生虫学の研究. 2, 1-112.
 - 6) Ornstein, L. (1964) : Disc electrophoresis. I. Background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 321-349.
 - 7) 大石勇・小林茂雄・久米精治・河野恵・沢田利貞(1961) : 犬糸状虫症の診断に関する研究. IV 皮内反応について. 日獣医誌, 14, 277-282.
 - 8) Sawada, T., Kono, M., Sato, S., Yamamoto, T. and Takei, K. (1962) : Immunological studies on filariasis (I). Intradermal and precipitin tests with *Dirofilaria immitis* antigen in canine and human filariasis. The Gunma J. Med. Sci., 6, 7-16.
 - 9) Sawada, T., Kono, M., Sato, S., Yamamoto, T. and Takei, K. (1962) : Immunological studies on filariasis (II) Intradermal tests with purified antigen in canine and human filariasis. The Gunma J. Med. Sci., 6, 17-24.
 - 10) Sawada, T., Takei, K., Katamine, D. and Yoshimura, T. (1965) : Immunological studies on filariasis. (III) Isolation and purification of antigen for intradermal skin test. Japan. J. Exptl. Med., 35, 125-132.
 - 11) Smithies, O. (1959) : An improved procedure for starch-gel electrophoresis: Further variations in the proteins of normal individuals. Biochem. J., 71, 585-592.
 - 12) 武井一利・沢田利貞・米山邦彦・片峰大助・吉村税・山本久(1964) : Filariasis 症の免疫学的研究. III) 分画精製した皮内反応抗原について. 日本衛生学雑誌, 19, 310-317.
 - 13) 多田功・川島健治郎(1962) : 糸状虫症の皮内反応に関する研究 I. 糸状虫抗原 (FPT 抗原) の精製と皮内反応. 医学と生物学, 63, 151-155.
 - 14) 多田功・川島健治郎・宮原道明・波多野精美・小糸賢太郎・中村勝(1963) : 糸状虫症の皮内反応に関する研究 III. FPT 抗原による皮内反応の実用的基準とその特性. 医学と生物学, 66, 82-86.
 - 15) 山村雄一・石坂公成編(1963) : 免疫化学 II. 抗原, B. 抗原各論, 98-452, 朝倉書店, 東京.

AbstractSTUDIES ON THE SKIN TEST ANTIGEN FST FOR THE IMMUNODIAGNOSIS
OF FILARIASIS. THE ELECTROPHORETIC ANALYSIS
AND SEPARATION OF ANTIGEN FST

KUMIKO SATO

(Department of Parasitology, School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Japan)

Antigen FST prepared from the adults of *Dirofilaria immitis* was recently developed for intradermal skin test on filariasis by Sawada *et al.* (1962a, b, 65). In the present paper, the antigen FST was analyzed by disc electrophoresis and starch gel electrophoresis, and finally separated by DEAE sephadex A-50 column chromatography and disc electrophoresis. The antigenicity of each of the fractions separated from FST was studied.

(1) By disc electrophoresis and starch gel electrophoresis, about twelve kinds of protein were obtained from FST. About ten kinds of protein were migrated toward the anode by disc electrophoresis. The other proteins migrated toward the cathode (disc cathode fraction) by disc electrophoresis and they were separated into two protein bands by starch gel electrophoresis.

(2) Five fractions, FST1, 2, 3, 4, 5 were obtained from FST by DEAE sephadex A-50 column chromatography. Each of these fractions reacted more or less on individuals who showed positive reaction with FST. Antigen FST3 was most reactive and FST5 was also reactive. Disc cathode fraction, which provoked weak reaction, was contained in FST1, 2, 3. Antigen FST1 and 2 which contained a large quantity of disc cathode fraction provoked weak reaction.

(3) Nine fractions, FST 1-1, 2-2, 3-1, 3-2, 3-3, 5-1, 5-2, 5-3, 5-4 were separated from each of FST1, 2, 3, 5 by disc electrophoresis. Each of these 9 fractions reacted more or less on individuals who reacted with FST. Antigen FST2-2, showing a single band on disc electrophoresis, was most reactive. Antigen FST3-1, which showed a single band on disc electrophoresis and a fairly strong positive skin reaction, was found in the same position of FST2-2. Therefore, it was considered that FST3-1 was same as FST2-2.