

## ツベルクリンの力価試験に関する研究

## 第 1 報 動物の皮内反応による力価試験

国立予防衛生研究所

柳 沢 謙・浅 見 望・土 屋 皖 司

(昭和 26 年 3 月 23 日受付)

## I 緒 言

ツベルクリンの力価の検定法は現今世界各国において一定の方法によつて行われているとは言えない。その方法のうち古くから用いられているものを大別すると 1) 結核モルモットのツベルクリン死による方法 2) 結核モルモットの皮内反応による方法及び 3) 結核感染者の皮内反応による方法等である。

結核モルモットのツベルクリン死を最初に発見したのは Robert Koch<sup>1)</sup> である。ついで Dönitz<sup>2)</sup> 及び Otto<sup>3)</sup> はこの方法を力価試験に用い、我国においても第 5 改正薬局法にも、この方法が規定されている。しかしこのツベルクリン死による方法によつては正確な力価の検定を期し得ないので今日では殆ど、何処の国においても用いられていない。

つぎに結核モルモットの皮内反応による方法は Römer 及び Joseph<sup>4)</sup> が発表して以来多くの研究者によつて、色々な様式が考究された。そのうちでも Calmette 及び De Potte<sup>5)</sup> の国際聯盟法が今日一般に用いられている。我国においても昭和 12 年厚生省令をもつて、日本薬局法のツベルクリン死による方法の外に、この改正国際聯盟法を併用することが決められた。この方法は標準液と可検液との 500, 1,000, 2,000 及び 4,000 倍等、4 種類の稀釈液を同一動物の背部の両側に注射し、24 時間及び 48 時間後における両液の反応が一致するまで可検液の濃度をかえる方法である。

しかしながら動物による力価試験法に不備を感じ人体の皮内反応による力価の検定法を最初に試みたのは Löwenstein Brill<sup>6)</sup> であつた。その方法は結核感染者にツベルクリンの一種類の稀釈液を注射し、反応を呈する最小稀釈濃度量を見出す方法であつて、甚だ幼稚な方法であつた。その後 Holm<sup>7)</sup> が同一人に標準液と可検液の各々 4 種類の稀釈液を用いることを発表し、Johsend 等<sup>8)</sup> は各々 2 種類の稀釈液を用い Seibert<sup>9)</sup> によつて各々一種類の稀釈液を左右の前膊部に用いられた。また最近 Holm<sup>10)</sup> は動物による皮内反応と併行して、人体の皮内反応を行うことが必要であると強調している。その方法は左右の前膊部に標準液と可検液との各々 4 種

類の稀釈液を注射し、48 時間及び 72 時間後における発赤、硬結等の大きさを比較し、もし両液が一致しないときは可検液の稀釈度をかえて、標準液と同一反応を呈する稀釈度を見出すことによつて力価を決めるのである。

我国においても拾数年以來 BCG の接種が実施されるようになってから、BCG によるツベルクリン、アレルギーの弱いものを判定する場合において、少々の力価の相違が拡大されるので、動物による力価検定法によるよりも、より正確な方法が必要となつてきた。それで著者の一人柳沢<sup>11)</sup> は人体の皮内反応による力価試験法を提唱した。この方法は左右前膊に標準液と可検液との各一種類の稀釈液を注射し 48 時間後における発赤、硬結、二重発赤及び水泡等を計測し、これらの反応のうち発赤の大きさの度数分布曲線を描き、両液の曲線が一致するまで原液の稀釈度をかえることによつて力価を検定する方法である。しかしこの方法によつて、当時市販の 3, 4 製造所のツベルクリンを伝研製のツベルクリンを標準として検定したのに、あるものは強く、あるものは弱くして、その力価はまちまちであつた。これはただ単に人体による力価試験のみではなく、動物による試験法によつても明らかに力価は種々異つていた。この事実からして著者の一人柳沢は昭和 16 年以來ツベルクリンの力価検定を当時すでに行われていたチフテリア及び破傷風等の免疫血清と同じように国家検定が必要であることを当局に再三申し入れたが行政的には実施されるに至らなかつた。

終戦後米軍の進駐によつて、当局が生物学的製剤の国家検定を P. H. W. の示唆によつて実施されることになつた。その後ツベルクリンも Dr. Bozeman の好意によつて Michigan の Department of Health において実施されている検定法を紹介された。この方法<sup>12)</sup> は主として感作モルモットの皮内反応によるものであつて、同一動物の背部の一侧には標準液を、他側対称部には可検液の種々な稀釈液を注射し、24 時間及び 48 時間後における硬結を計測し、標準液による硬結の総計をもつて可検液による硬結の総計を除した比 (Ratio) をもつて力価を決め、さらに同様な方法によつて人体の確認試験

を行つている。

我国においてはこの Michigan の方法と従来柳沢の提唱している方法並びに欧州における方法等を参酌して、現在施行中の「診断用ツベルクリン稀釈液基準（暫定）」<sup>13)</sup> の力価試験法を案出したのである。しかしながらこの方法とても決して異議のないものではなく今後、さらにツベルクリン反応の検査法の研究とともに考究してゆかなければならない。以下示す実験成績は現在の力価試験法が正しいか否かを再吟味する目的で行われた研究の一端である。

## II 実験方法

### 1. 供試品

(1) 標準液：予研ツベルクリン原液 No.1 を硼砂一硼酸緩衝液をもつて 2,000 倍に稀釈したものを用いた。

(2) 各稀釈液：標準液すなわち 2,000 倍稀釈液を 100% となし、これよりも濃度の高いもの及び低いものを 10% 毎の段階をもつて 20% 乃至 400% までの 15 種類の稀釈液を作つた。

### 2. 実験動物

ツベルクリン・アレルギーの強さによる反応の差異を調べるため、つぎの 4 群の動物を使用した。これらの各群とも予防衛生研究所において、ツベルクリン及び BC

G ワクチンの検定用として飼育中のものである。

第 I 群：大型結核菌“青山 B”株の死菌を流動パラフィンに浮遊させたものを 6 mg 筋肉内に注射してから 2 か月ないし 6 か月を経過したものである。

第 II 群：乾燥 BCG ワクチン 30 mg を皮下注射してから 10—12 週間経過したものである。

第 III 群：乾燥 BCG ワクチン 5 mg を皮下注射してから約 6 週間を経過したものである。

第 IV 群：乾燥 BCB ワクチン 5 mg を皮下注射してから 6 週間後さらに有毒結核菌“H<sub>2</sub>”株 0.01 mg を皮下注射し、さらに約 6 週間を経過したものであつて、最初の BCG ワクチン接種後からは約 12 週間経過している。

以上の各群とも使用前において、標準液 0.1cc を皮内注射し、24 時間後において 10—20 mm の硬結を呈するもののみを選んで実験に供した。なお、これら各群の標準液による硬結の平均の大きさは第 1 表に示したように、各群の差異は少なかつた。

### 3. 注射方法及び注射量

各試験液毎に約 10 匹ずつの感作モルモットを選び、その背部の一侧には標準液を、他側対称部には各試験液を、それぞれ 0.1cc ずつ 2 か所に皮内注射した。

第 1 表 使用モルモットの感作法並びにツベルクリンアレルギーの強さ

群別	経歴		実験年月	使用動物数	標準液による硬結の平均値	
	感 作 方 法	経過日数			24 時間	48 時間
I	青山 B 死菌 6 mg	約 2 ヶ月	1950—7	144	12.3mm	10.2mm
II	BCG 生菌 30 mg	約 12 週	1950—10	101	12.9	11.2
III	BCG 生菌 5 mg	約 6 週	1950—9	101	12.9	10.2
IV	BCG 生菌 5 mg 6 週後 H <sub>2</sub> 0.01mg	約 12 週	1950—9	98	12.4	9.6

### 4. 判定方法及び判定時間

注射してから 24 時間及び 48 時間後における硬結の横、縦径を計測した。

### 5. 計算

標準液による硬結の大きさの総計をもつて各稀釈液の硬結の大きさの統計を除した比 (Ratio) を求めた。

$$\text{Ratio} = \frac{\text{試験液による硬結の大きさの総計}}{\text{標準液による硬結の大きさの総計}}$$

### 6. 実験に当つた者の数

各群とも同一研究者によつて判定された。

## III 実験成績

標準液と各種濃度稀釈液とを種々な方法によつて感作させたモルモットの皮内に注射し、24 及び 48 時間後における硬結の大きさによる Ratio を求めた結果を第 2 表及び第 1 及び第 2 図に示した。

まず 24 時間後における Ratio について見るのに、第 I 群では 20% が 0.65、40% でも 0.63 で殆ど大差

はない。しかし 50% からは漸次大きな数値となり、100% で 0.98 となつている。ついで漸次濃度の増加とともに Ratio も増大し 150% にいたり 1.17 となつている。けれども 200% でも 1.17 で 150% と同値であるが、400% に至り 1.26 と急に大きな数値を示した。これを図によつて見るのに 50% から 150% までは大体濃度と Ratio とが比例して、ほぼ直線を描いているけれども、40% 以下と 200% 以上とにおいては、曲線をなしている。また第 II 群も大体において第 I 群と類似の傾向曲線を描いているが、400% の 1.13 は 200% の 1.18 よりも小さな値である点だけ異つている。これに反し第 III 及び第 IV 群は図上でも甚だしく変化の多い曲線を描きつつ、漸次上昇している。特にこの変動は、100% 以下のうすい場合において顕著である。以上何れの群においても、大体において濃度と Ratio との比例する範囲即ち図上のグラフで直線を描く範囲は 50~150% の間であつて、これよりもうすい場合並びに濃い場合において

はこの関係が必ずしも比例していない。

つぎに 48 時間後にける Ratio を第 2 図によつて見るのに、大体において 24 時間の場合と同様な傾向を示しておる。しかし一般に各群の差異は 24 時間におけるも

のよりも少なかつた。また濃度と Ratio との比例する範囲即ち図上のグラフで直線をなす範囲は 50~150% であつた。

第 2 表 各種感作動物に標準液と各濃度稀釈液とを注射し 24 及び 48 時間後における硬結による Ratio

判定時間 %	群別 稀釈倍数	24 時間				48 時間				備 考
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	
20	10,000	0.65	0.57	0.62	0.64	0.61	0.48	0.59	0.57	
40	5,000	0.63	0.79	0.58	0.69	0.61	0.62	0.62	0.72	
50	4,000	0.79	0.78	0.68	0.62	0.75	0.79	0.64	0.80	
60	3,330	0.84	0.84	0.91	0.78	0.72	0.85	0.81	0.78	
70	2,850	0.91	0.89	0.78	0.74	0.89	0.86	0.75	0.79	
80	2,500	0.94	0.93	0.84	0.91	0.86	0.86	0.88	0.87	
90	2,220	0.94	1.04	0.85	1.01	0.95	0.95	0.95	0.88	
100	2,000	0.98	0.98	0.88	1.05	0.94	1.01	0.99	0.95	
110	1,820	1.02	1.03	1.06	1.06	1.02	1.03	1.07	1.11	
120	1,660	1.05	1.09	1.07	1.13	1.05	1.08	1.07	1.05	
130	1,540	1.09	1.08	1.17	1.15	1.05	1.11	1.10	1.14	
140	1,430	1.13	1.19	1.12	1.17	1.11	1.21	1.11	1.21	
150	1,330	1.17	1.13	1.11	1.19	1.14	1.11	1.12	1.18	
200	1,000	1.17	1.18	1.15	1.06	1.15	1.26	1.15	1.21	
400	,500	1.26	1.13	1.01	1.17	1.24	1.16	1.04	1.28	

IV 総括及び結言

以上の動物の皮内反応の実験成績からつぎのことを総括することができる。

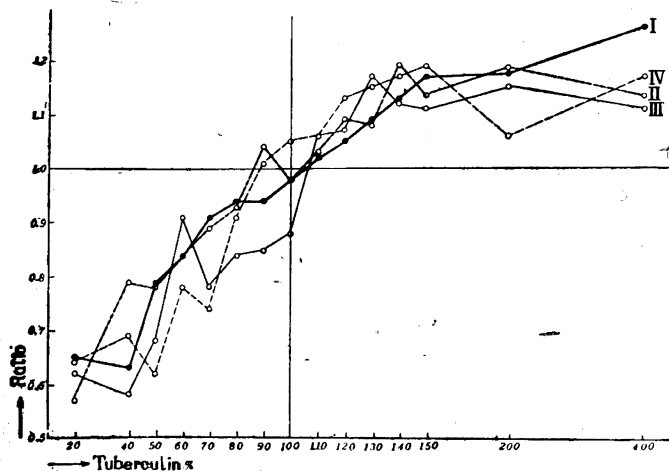
1. 動物の感作方法について

各種の方法によつて感作させた 4 群の動物における、24 時間後の硬結による Ratio を見るのに、大体二つの

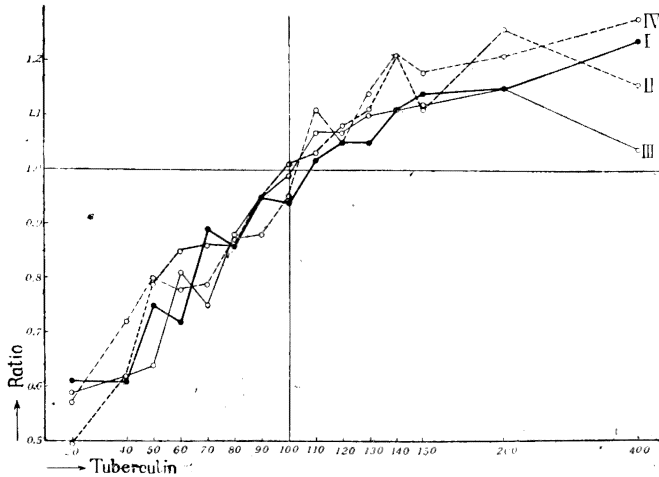
型に別けることができる。一つは濃度と Ratio との比例する範囲の広いものであつて、これに属するのは第 I 及び II 群である。他は濃度と Ratio との比例する範囲の割に狭いものであつて、これに属するのは第 III 及び IV 群である。他は濃度と Ratio との比例する範囲の割に狭いもので、これに属するのは第 III 及び IV 群である。

これら各群の感作方法を検討するのに、第 I 群では死菌の一定量によつて感作され、第 II 群は BCG 生菌の大量 (30 mg) によつて感作されているので、この両群ともモルモット個々の感作程度が同一である。従つてツベルクリン、アレルギーの強さも大体において等しいので濃度と Ratio との比例する範囲が広くなつてきたものと思われる。これに反し第 III 群は BCG 生菌の少量によつて感作され、第 IV 群はこの動物にさらに有毒菌の少量注射を行つて再感作させたものである。故にこの両群の動物個々の感作程度まちまちであると思われる。従つてツベルクリン、アレルギーの強さも動物の個々によつて違つているため、濃度と Ratio との比例する範囲が狭くなつているものと思

第 1 図 動物による 24 時間後における硬結による Ratio



第2図 動物による48時間後における硬結による Ratio



われる。このように力価においてわずかの差のあるツベルクリンを動物に注射した際、その力価の相違が明確に判別されるか否かは使用動物個々のツベルクリン、アレルギーの強さが等しいか否かと言うことによつて定まるものと思われる。従来行われている国際聯盟法では、生菌の少量をもつて動物を感作しているので動物個々のツベルクリン、アレルギーの強さは必ずしも同一とは限らない。しかしながら今度わが国に紹介された Michigan の Department of Health において実施されている方法では死菌を流動パラフィンに浮遊させたものをもつて感作するため、動物個々のツベルクリン、アレルギーの強さが割に等しいものを作ることができるわけである。

2. 反応と濃度との比例する範囲について、上述のように感作方法によつて、動物のツベルクリン、アレルギーの強さは多少相違してくるけれども、いずれの群においても共通する事実はある範囲を越えた場合たとひ濃度が増加しても反応はその割に大きくはならない。また濃度がうすい場合にも同様に反応は小さくならないと言う

ことがこの実験によつて証明された。しかして標準液の稀積度を 2,000 倍 (100%) とした場合における、濃度と反応との比例する範囲即ち図上におけるグラフが直線を呈する範囲は 50—150% の間であつた。もちろん標準液の稀積度をかえた場合においては、この範囲もまた変動するものであらう。

終りに臨み、本研究の一端は総合研究、結核研究委員会の援助によるものであつて、ここに謝意を表する。

### 文 献

1. Koch, R.: Deutsche Med. Wochschr., 17, 1189, (1891)
2. Dönitz, W.: Klin. Jahrb., 7, 225, (1900)
3. Otto, R.: Klin. Jahrb., 13, 137, (1905).
4. Römer, P. H. & Joseph, K.: Beit. z. Klin. & Tuberk., 14, 1, (1909)
5. Calmette, A. et De Potter, : Ann. Inst. Pasteur, 40
6. Löwnstein Brill, W.: Ztsch. F. D. ges. Exper Med., 7, 1102, (1919)
7. Holm, J.: (Copenhagen (1934) Jthesis
8. Jesen, K. A. : Tubercle, 19, 385. 480. (1938)
9. Seibert, F. B. & Du Four, E. : Am. Rev Tuberc., 41, 57, (1940)
10. Holm, J.: Extracts from public Health Reports, 62, 188, 1947)
11. 柳沢謙 : 結核とツベルクリン反応 (昭和22年)日本医書出版株式会社
12. Michigan, Department of Health : Tuberculin
13. 厚生省薬務局細菌製剤課 : 診断用ツベルクリン稀積液基準(暫定)