

ツベルクリン精製蛋白質の実用化に関する研究

II 冷凍乾燥 π の保存について

九州大学医学部細菌学教室

九州大学医学部結核研究所

戸田忠雄・武谷健二・大友信也

(昭和 28 年 2 月 21 日受付)

現在診断に用いられている旧ツベルクリンの代りに、結核菌培養濾液より精製したツ蛋白割合を用いようとする試みは、アメリカにおいて PPD₁、フランスにおいては IP 48²⁾ としてすでに製品化の段階にあり、最近 WHO では旧ツの代りに正式に PPD を採用することとなつたと伝えられている。

われわれも国内においてこれが実用を計るため、精製ツ蛋白 π (34)(5)(6) を用いて研究を進めており、製品化に際して冷凍乾燥操作を用いれば、微量の試料を極めて容易且つ正確にアンブレに分注することが可能であり、又使用に際しての溶解性も PPD に比べて極めて優れていることを報告した⁷⁾。この冷凍乾燥 π の保存に関して、二、三の成績を得たので報告する。

実験方法

冷凍乾燥大気圧保存 π

π を 1 アンブレ 10Y 宛分注し、冷凍乾燥後大気圧にて封じたものを、冷室、室温、37°C の各温度に保存し、一定期間後 0.5% 石炭酸加生理食塩水を 10c.c. 加えて溶解し 1Y/c.c. の稀釈液となし、この 0.1 c.c. を皮内注射した。

冷凍乾燥真空保存 π

教室の故具原等により製造された⁸⁾もので、 π を 1 アンブレ 5.0 mg 宛分注し、冷凍乾燥後真空に封じて冷室に保存したものである。使用時 0.5% 石炭酸加生理食塩水を用いて 1Y/c.c. に稀釈しその 0.1 c.c. を皮内注射した。

対照旧ツ液

教室保存の標準旧ツ原液より使用の都度作製した 2,000 倍旧ツ液を用いた。前回⁷⁾ 及び今回の報告を通じて用いた標準旧ツ原液は同一のものである。

接種対象集団

BCG 既接種者、自然感染者混合集団で、小学校 2～6 年生である。

ツ反応の実施及び判定法

対照ツ液及び試料ツ液各 0.1 c.c. を左右前膊皮内に交互に接種し、48 時間後の反応を調べた。発赤直径が両ツ液とも 9 mm 以下の例、及び一方が 30 mm 以上の例を除いて発赤比を計算した。

実験成績

1. 冷凍乾燥 π の大気圧保存

各種温度にて保存 6 カ月後の成績を第 1 表に示す。こ

第 1 表 大気圧封入 π の保存 6 カ月後の力価試験

保存条件	検査人員	真空封入、冷室保存 π に対する発赤比
π 0.1Y 冷室	64	1.05
" 0.1Y 室温	62	0.97
" 0.1Y 37°C	74	0.94
OT 2,000 倍液	78	0.94

の実験では真空封入冷室 6 カ月保存 π と標準旧ツ 2,000 倍液とをあらかじめ比較し、その力価が同等であることを確かめたのち、各種温度に保存した大気圧封入 π と真空封入冷室 6 カ月保存 π との力価を比較した。その結果は表に見られるように、真空封入冷室保存 π に対する発赤比は標準旧ツ 2,000 倍液 0.94、大気圧封入冷室保存 π 1.05、同室温保存 π 0.97、同 37°C 保存 π 0.94 でいずれも等力価と考えられる。この π の保存前の力価は、今日と同一原液より作製した旧ツ 2,000 倍液に対して、その 0.1Y が等力価であつたから⁷⁾、保存条件の如何に拘らず保存期間中に力価の減弱はなかつたと考えられる。

次に保存 1 年 6 カ月後及び 2 年後の成績を第 2 表及び第 3 表に示す。最も保存条件の悪い 37°C 保存の試料に

第 2 表 大気圧封入 π の保存 1 年 6 カ月後の力価試験

試料	検査人員	発赤比	陽性率 %	硬結数	二重発赤数
OT 2,000 倍液	71	1.00	36.6	18	5
37°C 保存 π 0.1Y		1.08	43.7	33	9

第 3 表 大気圧封入 π の保存 2 カ年後の力価試験

試料	検査人員	発赤比	陽性率 %	硬結数	二重発赤数
OT 1,000 倍液	81	1.00	74.0	43	0
37°C 保存 π 0.2Y		1.06	74.0	44	2

ついて対照と力価を比較したが、1年6ヵ月保存 π は対照たる旧 γ 2,000 倍液に対し発赤比は 1.08 であり、2ヵ年保存 π は対象集団の關係で対照としては旧 γ 1,000 倍液を用いたが、これに対し π 0.2 γ で発赤比は 1.06 となり、いずれの場合も力価の減弱は見られなかつた。最悪の保存条件の 37°C 保存で力価の低下を見なかつたので、室温、冷室保存 π については力価の検定を省略した。

2. 冷凍乾燥 π の真空保存

冷凍乾燥後、真空封入して冷室に保存したもので、8年6ヵ月後の力価を検定した。その成績は第4表のよう

第4表 真空封入 π の8年6ヵ月後の力価試験

試料	検査員	発赤比	陽性率 %	硬結数	二重発赤数
OT 2,000 倍液 8年6ヵ月保存 π ' ₂₂ 0.1 γ	88	1.00	57.9	30	5
		1.08	56.8	36	8

に、保存 π の旧 γ 2,000 倍液に対する発赤比は 1.08 で、両 γ 液はほぼ等力価と考えられる。保存前の力価はその 0.05 γ と旧 γ 2,000 倍液とを比較しているが、その成績を第5表に示す。この成績より見れば、旧 γ 2,000 倍

第5表 真空封入 π の保存前の力価試験

試料	検査人員	陽性率 %	発赤 径 mm				
			0~4	5~9	10~14	15~19	20~
OT 2,000 倍液 保存前 π ' ₂₂ 0.05 γ	47	60.4	14	4	9	13	7
		57.4	18	3	16	6	5

液に対して 0.05 γ ではやや力価弱く、大体 0.1 γ が相当しているものと推測される。従つて真空封入 π は 8年6ヵ月間の保存により力価の減弱を見なかつたものと考えられる。保存前の旧 γ 2,000 倍液を作製した標準旧 γ 原液と今回の実験に使用した標準旧 γ 原液とは異なるものであるが、いずれも当教室において特に厳密に力価を合せたものである。

考 按

γ 精製蛋白を冷凍乾燥後真空保存すれば、長期間の保存に堪えるということは、既に Seibert 等⁹⁾も述べているところであるが、具体的な詳しい報告は見られない。今日のわれわれの実験成績によつて、真空封入冷室保存のものが8年6ヵ月の保存後、厳密な人体力価試験の結果、何等力価の損失が見られないことが明らかになつた。この成績より考えて、この状態で保存したものは恐らく 10 年以上殆んど無期限の保存に堪え得るのではないかと考えられる。

又、製品化の方法として冷凍乾燥後大気圧封入したのも、37°C 2ヵ年間の保存で全く力価の減弱を見ないことは、この方法による製品化が優れた方法であること

を示している。元來この種の長期にわたる γ の保存試験においては、保存前後の対照 γ 液の選定、検定方法等に厳重に留意しなければ、力価の減弱が著しくない場合、多少の減弱があつてもこれを見逃すことが多い。この点今回の実験ではかなり厳密に注意して行つた。この保存試験はなお続行中であるが、今回の成績より見れば、大気圧封入で製品化したものも、室温 4~5 年間の保存には充分堪え得るものと考えられる。

なお最近伝研北本教授の御厚意により入手した IP 48 の使用書によれば、これも冷凍乾燥法を用いて製品化したもので、この点われわれの着想と偶然一致しているが、IP 48 はその外観より見て何等かの賦形剤を加えてあるらしく詳細はなお明らかでないが、具体的な製法においてはわれわれの方法とはかなり異つていようである。保存有効期間も1年以上の長期の保存に堪えたとあるのみで詳しくは記されていない。

市販の旧 γ 2,000 倍液の有効期限は、現在辛うじて冷室保存1ヵ年間であつて、この1ヵ年の有効期間中にもなお多少の力価の減弱が生ずるのではないかと考えられる。すなわち、戸田・武谷¹⁰⁾等は、硼酸塩緩衝液で稀釈し 447 日間保存した 2,000 倍旧 γ について、当初の力価に比べて発赤比は冷室保存で 0.85、室温保存で 0.82、37°C 保存で 0.81 という値を得ており、熊谷・新津等¹¹⁾も硼酸塩緩衝液で稀釈した旧 γ 2,000 倍液について、冷室及び室温保存 12 ヵ月のものは保存前の 60~40% の濃度の液と同程度の力価に落ちると述べている。このように保存期間の短い旧 γ に比較すれば、長期の保存に堪えることは精製 γ 蛋白の旧 γ より遙かに優れた点の一つと考えられる。現在の旧 γ では当初の力価は国家検定により一定していても、保存条件及び保存期間等の因子に左右されて、末端においては接種に際して力価の変動を見る可能性があるが、上述の成績より見て精製 γ 蛋白を用いればこのような恐れはないことになると思われる。

結 び

- 1) 冷凍乾燥後、真空封入した精製 γ 蛋白 π は、冷室保存 8 年 6 ヵ月後においても力価の減弱を認めなかつた。
- 2) 冷凍乾燥後、大気圧封入した精製 γ 蛋白 π は、37°C 保存 2 年後においても全く力価の低下を認めなかつた。
- 3) 以上の成績より、われわれの考案した冷凍乾燥法を応用して大気圧封入を行う精製 γ 蛋白の製品化法は、力価の保存の点においても極めて優れた方法であることが明らかになつた。又、旧 γ に比べて精製 γ 蛋白は極めて長期の保存に堪える点で優れているといえる。

本研究は文部省科学研究費によつた。

人体試験に協力いただいた教室員各位に感謝します。

文 献

- 1) F. B. Seibert, J. D. Aronson, J. Reichel, L. T. Clark, E. S. Long: Am. Rev. Tbe, 30, 705~768, 1936.
- 2) J. Bretey, A. Lamensans: Compt. Rend. Séan. l'Acad. Scien., 232, 1880~1882, 1951.
- 3) 武谷健二: 医学と生物学, 20, 200~202, 1951.
- 4) 武谷健二・三淵一二: 医学と生物学, 20, 254~257, 1951.
- 5) 武谷健二・三淵一二: 科学, 22, 145, 1952.
- 6) 柳沢 謙・浅見 望・土屋院司・戸田忠雄・武谷健二: 日本医事新報, 1492, 24~27, 1952.
- 7) 戸田忠雄・武谷健二・志村瑛子: 医学と生物学, 20 89~91, 1951.
- 8) 貝原守一・中川 洋・杉山浩太郎: 福岡医学雑誌, 36, 626~638, 1943.
- 9) F. B. Seibert, E. H. Du Four: Am. Rev. Tbe., 41, 471~480, 1940.
- 10) 戸田忠雄・武谷健二・吉田長之: 日本臨床結核, 9, 409~410, 1950.
- 11) 熊谷岱蔵・新津泰孝・今野 淳・菅原庸雄・庄司 真: 結核研究委員会, 予防接種科会報告, 1951. 7. 7.

東京慈恵会医科大学教授 医学博士 片山良亮 著

結核の化学療法

A 5判 370頁 函入
定価 480円 ㊦実費

— 殊に骨関節結核について —

本書は骨関節結核の化学療法を述べると共に従來の治療法にも簡単に触れて記述し、または化学療法の施行時或いは実験をするに必要な検査法についてはその総てを網羅している。殊に戦後アメリカ医学の導入による新しい検査法或いは実験法の吸収に大きな努力が払われた。更に記載にあたっては本書を見れば実験を実施し得るように懇切を極めていと共に実験中の体験と鮮明な多数の図版とを以て万全を期している。また各事項については夫々文献名を記載して研究の便を図っている。従つて本書は医学者並びに臨床医家諸氏に貴重な参考資料である。

内 容 目 次

- | | |
|----------------------------|-------------------------------|
| 第1章 化学療法剤の発達史とその性状 | 第2章 骨関節結核の病変像と化学療法による影響に関する文献 |
| 第3章 化学療法に必要な臨床的並びに実験検査法の実際 | 第4章 動物実験による化学療法の検討 |
| 第5章 骨関節結核に対する化学療法の臨床応用 | |

医学博士 三輪徳定 著

主な 肛門疾患とその臨牀

A 5判 130頁 函入
定価 280円 ㊦実費

諸種の疾患が直腸肛門部にいろいろの障害をきたすと同時に、直腸肛門部の疾患がまた全身的に諸種の障害を起すことが多いことは周知の如くである。

本書は斯界の権威が囊に「痔核・肛門周囲炎・痔瘻」の小著を公にし、世の好評を得たので、更にこれに脱肛・肛門裂創・肛門瘙痒症の項を加えて実地医家の参考に供したものである。

内容目次: 総論 直腸及び肛門の解剖的考察—診断法一般—肛門における局所麻酔法

各論 痔疾—肛門周囲炎—痔瘻—肛門及び直腸脱—肛門及び直腸狭窄—肛門裂創—肛門の瘙痒—肛門部の濕疹

東京都中央区(京橋局区内)銀座西7の1

発行所 株式会社

東西医学社

電話 銀座(57) 2126—2129 番
振替 口座 東京 2818 番