

ツベルクリン精製蛋白質の実用化に関する研究

Ⅲ π と旧ツによるツ反応の現れ方の比較

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・瀬川 二郎・渋谷 七郎

(昭和 28 年 4 月 27 日受付)

精製ツ蛋白の実用化の試みは各国において行われているが、われわれも精製ツ蛋白 π ²⁾ を用いて研究を進めており、先に冷凍乾燥による製品化³⁾、及び保存⁴⁾に関する報告を行つた。旧ツ 2,000 倍液に相当する π の力価に関しては、0.1 γ ²⁾³⁾ 或いは 0.2 γ ⁵⁾ という成績が得られているが、この力価の問題とは別個に、ツ反応の時間的推移、質的な反応の現れ方等について、旧ツとの異同を明らかにすることが、実用化に際しては重要な問題であると考えられる。

これに関しては、先に村上・武田等⁶⁾の精製ツ蛋白 TA₂ 及び PPD についての報告があるが、われわれは π についてこの点を検討すると同時に、精製ツ蛋白と旧ツとのツ反応における特異性の問題及び濃度による両ツの力価の変化について得た成績を報告する。

実験方法

第 1 実験——結核療養所入院結核患者 290 名を A, B, C, 3 群に分ち、A 群には π 0.1 γ と教室保存標準旧ツ 2,000 倍液 0.1cc (50 γ) を、B 群には π 0.02 γ と旧ツ 10,000 倍液 0.1cc (10 γ) を、C 群には π 0.004 γ と旧ツ 50,000 倍液 0.1cc (2 γ) を、それぞれ、前膊皮内に左右交互に接種し、A 群は 6, 12, 24, 48, 72 時間、B 及び C 群は 24, 48, 72 時間後の発赤・硬結その他の変化を逐次的に観察した。旧ツ液は教室保存の標準旧ツ原液より使用の都度生理的食塩水にて稀釈したものを用いた。 π の稀釈にも同一の生理的食塩水を用いた。発赤比の計算に際しては発赤直径の一方が 30mm 以上のものは除いた。C 群に

おける陽性率はかりに 6mm 以上を陽性として計算した。

第 2 実験——A 群においては、いずれか一方でも 48 時間後のツ反応による発赤直径が 10mm 以下のものは、 π 2 γ と旧ツ 100 倍液 0.1cc (1,000 γ) を前膊皮内左右に接種した。B 群においては、48 時間後の発赤直径が相方とも 10mm 以下のもの、さらに C 群においては、48 時間後の発赤直径が相方とも 5mm 以下のものには π 0.4 γ 及び旧ツ 500 倍液 0.1cc (200 γ) を左右前膊皮内に接種した。いずれの場合も第 1 実験における接種側とは反対側になるように両ツを接種し、接種後、24, 48, 72 時間後の反応を観察した。

以上を簡単に表示すれば第 1 表のようになる。

実験成績

第 1 実験

A 群——その結果を第 2 表、第 1 図に示す。48 時間後の発赤・硬結値はやや π の方が大きいが、発赤比は 1.02 ではほぼ同等の力価と考えられる。両ツで、発赤・硬結の時間的現れ方には著しい差異は見られない。ただ、発赤の 6 時間値、硬結の 6 及び 12 時間値が、その後とは逆に、旧ツがやや強くでている。

第 2 表 π 0.1 γ と旧ツ 2,000 倍液の比較

試料	検査人員	発赤比	陽性率
π 0.1 γ	95 名	1.02	95.8%
旧ツ 2,000 倍液	95	1.00	89.5

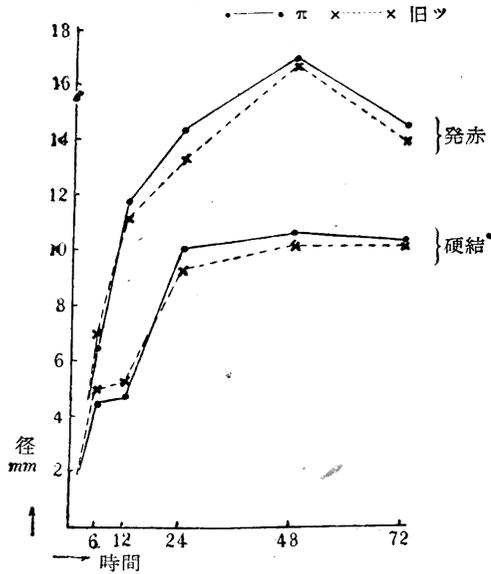
第 1 表 実験方法

第 1 実験			第 2 実験			
接種対象	ツ液濃度		接種対象例数	ツ液濃度		
	π	旧ツ		π	旧ツ	
A 群	95	0.1 γ /0.1cc	2,000 倍液 50 γ /0.1cc	8	2 γ /0.1cc	100 倍液 1,000 γ /0.1cc
B 群	99	0.02 γ /0.1cc	10,000 倍液 10 γ /0.1cc	35	0.4 γ /0.1cc	500 倍液 200 γ /0.1cc
C 群	96	0.004 γ /0.1cc	50,000 倍液 2 γ /0.1cc	27	0.4 γ /0.1cc	500 倍液 200 γ /0.1cc

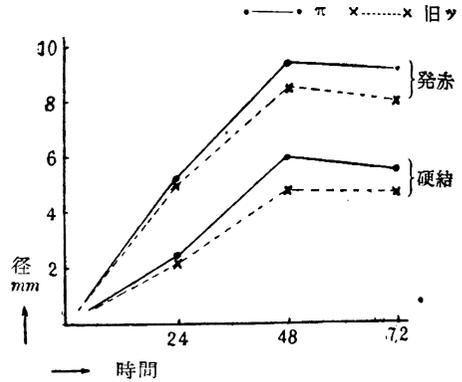
両ツによる反応の一致、不一致者を表示すれば第 3 表のようになる。 π に陽性で旧ツに陰性・疑陽性のもの 8 名、逆のもの 2 名となり、両ツとも陽性を示さないもの 2 名であつた。

B 及び C 群——第 4, 5 表、第 2, 3 図に示す。A 群では π 0.1 γ と旧ツ 2,000 倍液 0.1cc (50 γ) とを接種したが、B 群では両者を 5 倍に稀釈し、C

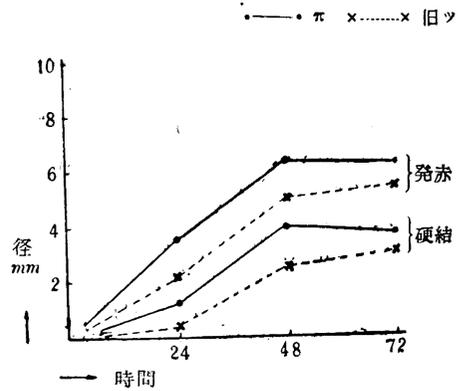
第1図 π 0.1 γ と旧ツ 2,000 倍液による
発赤・硬結平均値の時間的推移



第2図 π 0.02 γ と旧ツ 10,000 倍液による
発赤・硬結平均値の時間的推移



第3図 π 0.004 γ と旧ツ 50,000 倍液による
発赤・硬結平均値の時間的推移



第3表 π と旧ツとによるツ反応の一致・不一致者数

		A 群 (π 0.1 γ 旧ツ 2,000倍 該当者数)			B 群 (π 0.02 γ 旧ツ 10,000倍 該当者数)			C 群 (π 0.001 γ 旧ツ 50,000倍 該当者数)			
	π	旧ツ									
π // 旧ツ	+	+	83	23	6	π \nabla 旧ツ	+	±	6	14	8
	±	±	0	19	23		+	-	2	6	3
	-	-	2	9	27		±	-	0	10	18
π \nabla 旧ツ	+	±	6	14	8	π \wedge 旧ツ	±	+	2	12	2
	+	-	2	6	3		-	+	0	2	0
	±	-	0	10	18		-	±	0	4	9

第4表 π 0.02 γ と旧ツ 10,000 倍液の比較

試料	検査人員	発赤比	陽性率
π 0.02 γ	99名	1.10	43.4%
旧ツ 10,000 倍液	99	1.00	37.4

第5表 π 0.004 γ と旧ツ 50,000 倍液の比較

試料	検査人員	発赤比	陽性率
π 0.004 γ	96名	1.24	55.2%
旧ツ 50,000 倍液	96	1.00	40.6

群ではさらに5倍に稀釈したものを接種したわけで、 π と旧ツの接種量の比は、A, B, C群を通じて1:500である。48時間後の発赤比はB群では1.10, C群では1.24であつて低濃度になる程 π の方が旧ツに比べて相対的に力価が強くなる傾向がある。発赤及び硬結の時間的推移は両ツでほぼ平行しており、著しい相違は認められない。A群に比べて、発赤の48時間値より72時間値への下り方が、濃度の低いものほど少ないように思われる。

両ツによる反応の一致・不一致者を表示すれば第3表のようになる。

第2 実験

A群——第1実験で両ツによる反応のいずれか一方でも陽性を示さなかつた者12名中、4名は事故により検査できなかつたので、8名について π 2 γ 、及び旧ツ 100倍液 0.1cc(1,000 γ)でツ反応を行つた成績は第6表のように、総て硬結10mm, 発赤15mm以上を示した。

B及びC群——B群については両ツ陰性・疑陽性者42名中35名に、C群においては両ツ陰性者27名に対して、 π 0.4 γ 及び旧ツ 500倍液 0.1cc(200 γ)でツ反応を行つた結果、全例を通じて発赤12.5mm, 硬結10.5mm

第6表 π 2 γ 及び旧 γ 100 倍液接種者の第1及び第2実験における 48 時間後の γ 反応

被接種者	第 1 実 験				第 2 実 験			
	旧 γ 2,000 倍液		π 0.01 γ		旧 γ 100 倍液		π 2 γ	
	接種側	硬結径 mm 発赤径 mm	接種側	硬結径 mm 発赤径 mm	接種側	硬結径 mm 発赤径 mm	接種側	硬結径 mm 発赤径 mm
Yc	右	0	左	12.5	左	20.5	右	21.0
		0		19.5		27.0		28.0
Io	"	0	"	0	"	10.5	"	17.5
		7.5		16.5		16.5		20.5
Si	"	0	"	8.5	"	13.0	"	12.5
		9.0		13.5		15.5		17.0
Is	"	7.5	"	10.0	"	16.0	"	16.5
		8.5		12.5		21.0		21.5
Ki	左	7.5	右	10.0	右	12.0	左	13.5
		9.5		14.0		20.5		22.0
No	"	0	"	0	"	12.0	"	10.5
		11.5		7.0		15.5		16.0
Na	"	0	"	12.0	"	17.5	"	15.0
		7.0		12.0		27.0		30.0
Su	"	8.5	"	7.5	"	14.6	"	20.0
		11.0		9.5		20.5		23.0

以上の反応を示した。

考 察

1) π と旧 γ による反応の現れ方の比較

精製 γ 蛋白と旧 γ とによる γ 反応の時間的推移に関しては、村上・武田等⁶⁾は 24 例の結核患者について精製 γ 蛋白 TA₂ 0.15 γ と旧 γ 2,000 倍液 0.1cc(50 γ) とを比較し、TA₂ は 48 時間後に発赤・硬結が最大となり、24 時間以内の変化が旧 γ より少なく、非特異反応が少ないと述べている。但しこの場合、48 時間後の発赤は TA₂ の方がかなり強く、いわゆる等力価で比較を行ったものではない。このような比較においては、力価の相違による時間的推移への影響を除くため、できるだけ等力価のものとの比較が望ましい。

われわれの A 群における実験では、両 γ による 48 時間後の発赤比は 1.02 ではほぼ等力価と考えられる。この場合両 γ による反応の時間的推移は発赤・硬結ともほぼ一致しており、両 γ とも 48 時間後の発赤・硬結値が最大を示し、村上・武田等の成績の如く旧 γ において特に 24 時間値が大きいという事実は見られなかつた。しかし 6~12 時間の発赤・硬結値は旧 γ の方が強く非特異反応を現すものと考えられる。村上・武田等の成績と今回の成績との相違は力価の問題のみによるのではなく、 π と TA₂ の精製法の相違も関係しているかもしれない。

2) 濃度による π と旧 γ との力価の相対的变化

Seideman⁷⁾ はモルモット及び人体について、100 倍~50,000 倍の範囲で、旧 γ と精製 γ 蛋白 PPD とを同

一量比で比較し、高濃度においては旧 γ が力価が強く、低濃度では PPD が強い力価を示すことを指摘している。Plunkett 及び Siegel⁸⁾ も人体について旧 γ と PPD とを 200:1 の量で比較し同様の事実を見出している。われわれの実験においては、 π と旧 γ とを 1:500 の比で 3 段階の稀釈について比較したわけであるが、旧 γ 2,000 倍液、10,000 倍液、50,000 倍液 0.1cc に対して、 π 0.1 γ 、0.02 γ 、0.004 γ はそれぞれ発赤比 1.04、1.10、1.24 を示し、低濃度においては π が力価が強い傾向があり、Seideman⁷⁾ 等の結果と一致する成績を得た。この現象の本態に関しては、旧 γ は精製 γ 蛋白より非特異反応が強いいため、これが高濃度になるに従って著しく現れ、本来の γ 反応に加わって発現するためと一応は考えられるが、なお明らかな説明はない。

3) π と旧 γ との特異性について

精製 γ 蛋白と旧 γ との γ 反応における特異性の問題は、極めて重要であり且つ難しい問題である。Medler 等⁹⁾ は結核感染モルモットについて、PPD 0.01mg と旧 γ 5.0mg(20 倍液 0.1cc) とによる反応を比較して、感染 8 週後では差はないが、1 カ月後では旧 γ による陽性率が PPD よりかなり高く、精製 γ 蛋白は γ の全活性を代表していないと述べている。一方、Plunkett 及び Siegel⁸⁾、Savage¹⁰⁾、Aronson、Long 及び Seibert¹¹⁾等は PPD と旧 γ との反応の不一致者についてレ線所見を調べ、PPD が特異性において旧 γ に劣らぬと述べている。又、最近、Goddard、Edwards、Palmer¹²⁾ はヒストプラスモージスのレ線所見を考慮した多数の例の実験より、PPD 0.1 γ 陰性且つヒストプラスミン陰性例よりの肺石灰化巣発見率は 0.7% であつて、PPD 0.1 γ は充分特異的であると述べている。又 WHO で旧 γ の代りに PPD を採用するよう決定したと伝えられることは、上述の事実より、PPD の特異性が旧 γ に劣らぬと一般に認められた結果と考えられる。わが国においても、岡本・楠下等¹³⁾はオルトアミノフェノール・ツベルクリン (0.05 γ) と旧 γ (50 γ) とについて γ 反応とレ線所見との比較検討を行っている。

一方、Kleinschmidt¹⁴⁾ によれば、確実に結核と診断された児童において 10TU 及び 100TU の旧 γ に陽性で精製 γ 蛋白 (GT) に対しては 100TU 時には 1,000TU でも陰性を示す例が見られることより、旧 γ を精製 γ 蛋白でおきかえるにはさらに慎重な比較実験を要するといふ。

われわれの実験では、接種対象は総てレ線その他より確実に結核症を有するものであるが、95 名中 π 0.1 γ 陽

性で旧ツ 2,000 倍液で陽性でないもの 8 名、逆のもの 2 名を見た。しかしこれらも、 π 2Y 及び旧ツ 100 倍液で総て発赤 15mm, 硬結 10mm 以上の反応を示す。旧ツ 100 倍液による非特異反応の限界は、われわれの実験¹⁵⁾によれば、発赤 14mm~15mm と考えられるから、これら 8 名もただ反応性が弱いだけで、両ツに明らかに特異的に反応するものと考えられる。この成績からは π , 旧ツとも十分に特異的であると考えられる。なお旧ツ 10,000 倍, 50,000 倍及び π 0.02Y, 0.004Y に対し陽性を示さなかつた患者の一部に旧ツ 500 倍, π 0.4Y を接種した結果も、全例発赤 12.0mm, 硬結 10.5mm 以上を示し特異的な反応を示すものと考えられる。先に述べた Medler 等⁹⁾の実験も、前記使用量では旧ツの力価が PPD よりも強いために、ツ感受性の弱い時期に両ツによる反応の陽性率に差が現れたものと考えれば、精製ツ蛋白が特異性が少ないと考へなくとも説明できる。事実、彼等はツ反応の強度は旧ツの方がかなり強かつたと記載している。

む す び

結核療養所入院患者 290 名について精製ツ蛋白 π と旧ツとの反応の現れ方を比較検討した。

1) ほぼ等力価と考えられる π 0.1Y と旧ツ 2,000 倍液とによるツ反応の接種 6, 12, 24, 48, 72, 時間後の時間的推移を追求した結果、両ツに大差を認めなかつた。但し、6~12 時間後の反応は旧ツに幾分強く、非特異反応によるものと考えられる。

2) 旧ツ 2,000 倍液に対し π 0.1Y では発赤比 1.02 であり、旧ツ 10,000 倍液に対し π 0.02Y で 1.10, 旧ツ 50,000 倍液に対し π 0.004Y で 1.24 であつて、高稀積度においては π が旧ツに比べて強く反応する傾向がある。

3) π 0.1Y—旧ツ 2,000 倍接種群において、いずれか一方のツが陽性でないものに、 π 2Y 及び旧ツ 100 倍液を接種したところ、全例とも発赤 15mm, 硬結 10mm 以上の反応を示した。 π 0.02Y—旧ツ 10,000 倍液接種群では両ツとも陽性でないもの、又 π 0.004Y—旧ツ 50,000 倍液接種群では両ツとも陰性のものに対して、 π 0.4Y 及

び旧ツ 500 倍液を接種した結果、総て発赤 12mm, 硬結 10mm 以上を示した。以上の結果から両ツとも充分に特異性をもつものと考えられる。

本研究は文部省科学研究費による。本論文の内容は昭和 27 年 9 月日本結核病学会九州地方会において発表した。

文 献

- 1) 武谷健二：結核研究の進歩, 2, 193—199, 1953.
- 2) 武谷健二：医学と生物学, 20, 200—202, 1951.
- 3) 戸田忠雄・武谷健二・志村瓊子：医学と生物学, 20, 89—91, 1951.
- 4) 戸田忠雄・武谷健二・大友信也：結核, 28 (7), 323, 昭 28.
- 5) 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.
- 6) 村上勝美・高橋 寛・守川 昇・渡 努・武田徳晴・河西信彦・青木良雄：児科診療, 27, 524—529, 1952.
- 7) R.M. Seideman: Am. J. of Hyg., 30, B, 1~10, 1939.
- 8) R.E. Plunkett, W. Siegel: Am. Rev. Tbc., 35, 296~302, 1937.
- 9) E.M. Medler, K.T. Sasano, D.W. Caldwell, E. L. Needham: Am. Rev. Tbc., 43, 534~542, 1941.
- 10) C. L. Savage: Am. Rev. Tbc., 43, 527~533, 1941.
- 11) E.R. Long, J.D. Aronson, F.B. Seibert: Am. Rev. Tbc., 30, 733~756, 1934.
- 12) J. C. Goddard, L.B. Edwards, C. E. Palmer: Pub. Health Rep., 64, 820~846, 1949.
- 13) 岡本 肇・柿下正道：結核研究委員会, 細菌科会報告, 1952, 6, 13.
- 14) H. Kleinschmidt: Deutch. Med. Wschr., 77, 933~936, 977~980, 1952.
- 15) 武谷健二・大友信也：結核研究委員会, 細菌科会報告, 1952, 6, 13.