

# モルモットによるツベルクリンの 力価試験に関する研究

## 1 動物の感作方法について

国立予防衛生研究所結核部 (部長: 柳沢 謙)

伊東 恒夫・浅見 望

(受付 昭和30年10月7日)

### I 緒 言

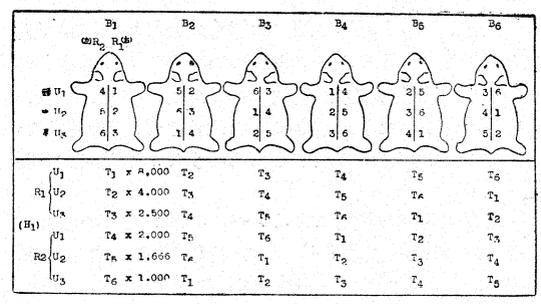
現在、ツベルクリンの力価試験法は各国により、また、各研究者によつて種々な方法が用いられ、統一した方法はない。古くから用いられたKoch,<sup>1)</sup> Dönitz<sup>2)</sup>ott<sup>3)</sup>等による、結核モルモットのツベルクリン死による方法はほとんど用いられず、現在は感作モルモットまたは感作された人体に対する皮内反応によつて試験されている。すなわち、この方法は Römer & Joseph<sup>4)</sup>によつて始められ Calmett & De Potter<sup>5)</sup>によつて実用化された国際連盟法が発表せられて以来、これに準じた方法が広く実施された。また、Long,<sup>6)</sup> Bunney & Gottschall<sup>7)</sup>, Seideman,<sup>8)</sup> Seibert & Glenn,<sup>9)</sup> Savage<sup>10)</sup>, Clark & Follin<sup>11)</sup>, Meyer<sup>12)</sup>等は皮内反応法によつてOTとPPDとの力価の比較を行った。なお、Sweang<sup>13)</sup>, 梅沢<sup>14)</sup>, Chen<sup>15)</sup>, 英国生物学的検定専門委員会<sup>16)</sup>, 富士<sup>17)</sup>, 吉永<sup>18)</sup>, 奥原<sup>19)</sup>, 等は感作モルモットを用い、Wadey<sup>20)</sup>は牛を用いた場合の皮内反応の成績を推計学的に種々検討を加えている。しかし、いずれの実験方法においても使用動物の感作方法、注射方法、判定時間およびツベルクリンの濃度等が異なる上に、各資料の数学的処理も違っている。

我国においては昭和24年厚生省が「診断用ツベルクリン稀釈液基準」を定め、その後多少改良されて今日におよんでいる。この方法は感作モルモットに標準液と可検液とを皮内注射し、24および48時間後における硬結の大きさを比較し、その比をもつて力価の判定を行っている。しかし、これは真の力価ではなく、両液の比であるに過ぎない。われわれ<sup>21)</sup>も先きに動物を用いツベルクリンの種々な濃度と反応との関係とを比 (Ratio)によつて調べたが、この方法によつては濃度差を正確に見出すことは出来なかつた、そこで、今回はモルモットによる力価試験法を検討するに当り、まず、基礎実験として接種菌量を異にした感作動物に対し、各濃度ツベルクリンを注射した場合の反応におよぼす諸誤差因子を推計学的に検討を加えたので、その大要を報告する。

### II 実験方法

1. 感作方法: この実験には接種菌量の異なる次の3群を用いた。すなわち、第1群は 0.1 mg のもの6匹、第2群は 1.0 mg のもの6匹、第3群は 10 mg のもの12匹である。これらの接種方法は、体重500~600 gの白色モルモットに人型結核菌(青山B株)の加熱死菌の一定量を流動パラフィン 0.6 cc に浮遊させたもの 0.3 cc ずつを両肢部筋肉内に接種した。
2. 使用ツベルクリンの濃度: 人型結核菌青山B株のソートン培地培養のツベルクリン原液を 0.5%石炭酸加生理的食塩水液をもつて次の6稀釈液を作つた。1) 1,000倍, 2) 1,666倍, 3) 2,000倍, 4) 2,500倍, 5) 4,000倍, 6) 8,000倍等。
3. 注射および判定方法: 第3群の6匹のみは感作後2, 4, 6および25週, その他の全群は感作後6および25週に、各動物の両背部に上記6稀釈液を皮内注射した。その方法は第1図に示すようにラテン交絡法により、部位差を相殺した。注射後24および48時間における硬結の大きさを2人の判定者によつて無意識的に測定した。

第1図 実験計画



### III 実験成績

1. 感作後の時期による反応の比較  
死菌流動パラフィン 10 mg を感作したのち 2, 4, 6 および 25 週において、各濃度のツベルクリンによる反

第1表 感作後の時期による反応の  
大きさの平均値の比較

稀倍 積数	時間		24				48			
	経過週		2	4	6	25	2	4	6	25
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	
8,000	6.2	6.8	7.3	11.8	4.7	5.3	6.2	7.7		
4,000	6.9	9.0	8.6	11.9	5.0	7.2	7.9	8.8		
2,500	8.0	10.6	10.5		5.4	8.8	8.5			
2,000	8.1	10.3	11.8	13.3	5.3	8.3	9.8	11.5		
1,666	9.2	10.9	10.9		5.8	9.0	8.3			
1,000	11.5	10.7	13.6	14.6	6.9	10.1	11.1	13.1		
平均	8.3	9.7	10.5	12.9	5.5	8.1	8.6	10.3		

応の大きさの平均値は第1表の如くである。すなわち、24時間における反応についてみるに、2週では8,000倍液によるものが最も小さく、その平均値は6.2mmである。次いで、ツベルクリンの濃度を増すにしたがって反応の大きさも加わり、1,000倍液の平均値は11.5mmとなった。しかし、この時期ではアレルギーの発現が充分でないで、これら6試料による平均値は8.3mmであつて、他の週に比ぶれば最も小さかつた。次いで、4週における平均値は9.7mmとなり、上昇し、6週ではこれが10.5mm、25週では12.9mmとなつている。このように週を経るにしたがって反応の大きさの上昇がみられた。また、48時間についてみるに、24時間における同一の傾向がみられた。さらに、24時間の反応は48時間のものに比すれば、一般に明瞭であり、かつ、大きさも大きかつた。このツベルクリン濃度を対数にとつた場合、硬結の大きさとの関係は第2図に示すように直線であつて、濃度と反応とはよく比例していた。

2. 接種菌量差による比較

死菌量を0.1, 1.0および10mgの3種類を接種したのち、6および25週における反応の大きさの平均値は第2表の如くである。すなわち、6週後における24時間の反応の大きさの平均値は、0.1mg群では12.7mmで最も大きく、これに次ぐは1.0mg群で12.3mmであり、最も小さいのは10mg群の11.2mmであつた。また、48時間においてもこの傾向がみられた。さらに、25週における反応の大きさも、6週におけるものとほとんど同一の傾向であつた。すなわち、0.1mg群が最も大きく、10mg群が最も小さかつた。このように、この実験では接種菌量と反応の大きさ、すなわち、アレルギーとは比例せず、むしろ反対の結果となつた。これは使用動物の条件が悪かつたためと思われる。また、ツベルクリンの濃度と反応との関係を図

上にみるに、第3図の如く、いずれもよく比例していた。

3. 推計学的検討

稀積度をx、硬結の大きさをy.として、方向係数(b)、標準偏差(σ)、不偏分散(μ²)、分離能(IDI)、直線性検定(F₀>F)等を算定したのが第3および4表である。この計算法の1例を10mg接種群の2週後における24時間の硬結について計算すれば次のようである。

	log x	y	x²	y²	xy
8,000倍	3.9	6.2	15.21	38.44	24.18
4,000〃	3.6	6.9	12.96	47.61	24.84
2,500〃	3.4	8.0	11.56	64.00	27.20
2,000〃	3.3	8.1	10.89	65.61	26.73
1,666〃	3.2	9.2	10.24	84.64	29.44
1,000〃	3.0	11.5	9.00	132.25	34.50
計	20.4	49.9	69.86	432.55	166.89

$$Sx = x^2 - (x)^2/n = 69.86 - (20.4)^2/6 = 0.50$$

$$Sy = y^2 - (y)^2/n = 432.55 - (49.9)^2/6 = 17.55$$

$$c = xy - x \times y/n = 166.89 - 20.4 \times 49.9/6 = -2.77$$

$$b = c/sx = -2.77/0.5 = -5.54$$

$$d = Sy - c^2/sx = 17.55 - (2.77)^2/0.5 = 2.20$$

$$y = y/n = 49.9/6 = 8.31$$

$$y' = y + b(X - x/n) = 8.31 - 5.54(X - 3.4) = 27.15 - 5.54X$$

$$(X = 3.0) \therefore y' = 27.15 - 16.62 = 10.53$$

$$(X = 3.9) \quad y' = 27.15 - 21.61 = 5.55$$

$$F_0 = \frac{c^2/sx \times n - 2}{\Delta} = \frac{15.55 \times 4}{2.20} = 27.9$$

$$F \begin{matrix} n = 1 \\ n = 5 \end{matrix} \begin{cases} (0.05) = 7.71 * \\ (0.01) = 21.20 ** \end{cases}$$

$$\therefore F_0 < F **$$

第3表についてみるに、方向係数は24時間では2週5.54、4週4.60、6週6.90、25週5.28となり、4週が

第2表 接種菌量の差による反応の大きさの平均値の比較

稀倍 積数	経過週		6						25					
	時間		24			48			24			48		
	菌量 (mg)		0.1	1.0	10	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10
8,000	mm	mm	9.5	8.6	8.8	7.5	6.2	5.5	11.3	11.3	11.8	8.9	7.6	7.7
4,000	mm	mm	11.4	9.4	9.3	9.5	7.6	7.7	14.2	13.1	11.9	10.7	10.5	8.8
2,500	mm	mm	13.9	13.1	11.1	11.5	10.2	9.2						
2,000	mm	mm	14.0	13.8	12.6	11.7	12.3	10.1	15.3	14.8	13.3	12.6	12.2	11.5
1,666	mm	mm	13.1	13.8	11.6	10.2	11.3	10.6						
1,000	mm	mm	14.1	15.2	13.8	11.9	12.8	11.2	16.2	15.4	14.6	13.7	13.7	13.1
平均	mm	mm	12.7	12.3	11.2	10.4	10.1	9.1	13.3	13.1	11.9	10.3	10.0	9.2

第3表 感作後の各週における反応の検定表

区分	時間		24				48			
	週	時間	24		48		24		48	
			2	4	6	25	2	4	6	25
$\bar{y}$			8.31	9.70	10.45	12.62	5.10	8.10	8.63	10.50
b(→)			5.54	4.60	6.90	5.28	2.20	5.20	4.80	6.29
$\Delta$			2.20	1.93	1.86	0.12	0.57	6.80	2.50	0.35
$\mu^2$			2.62	2.09	1.47	2.45	1.56	3.50	1.89	3.08
X=3.0			10.53	11.54	13.21	14.21	6.38	10.18	10.55	12.39
y' X=3.9			5.55	7.40	7.00	9.44	4.40	5.50	6.23	6.72
F <sub>0</sub> >F			**	**	**	*	*	*	*	**
IDI±(mm)			3.17	2.89	7.72	5.06	2.51	2.98	2.74	6.36
$\frac{\log IDI}{IDI}$			0.09	0.10	0.13	0.13	0.19	0.16	0.09	0.13
判別可能			2,478	2,518	2,691	2,716	3,034	2,607	2,467	2,742

註：判別可能とは2,000倍標準液に対する範囲 n=40

第4表 接種菌量の差による反応の検定表

区分	週		6						25					
	時間	菌量 (mg)	24			48			24			48		
			0.1	1.0	10	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10
$\bar{y}$			12.70	12.31	11.20	10.38	10.07	9.05	14.62	13.75	12.62	12.00	11.38	10.50
b(→)			5.26	8.06	5.68	4.54	7.98	6.64	5.24	4.32	5.28	6.10	6.58	6.29
$\Delta$			3.34	3.17	2.13	4.10	3.19	0.52	0.22	0.31	0.12	0.68	0.20	0.35
$\mu^2$			1.05	2.33	1.88	3.15	6.06	6.20	2.33	2.47	2.45	2.70	2.99	3.08
y' X=3.0			14.82	15.53	13.47	12.32	13.26	11.71	16.20	15.05	14.21	13.83	13.36	12.39
X=3.9			10.05	8.28	8.36	8.11	6.08	5.73	11.47	11.15	9.44	8.33	7.42	6.72
F <sub>0</sub> >F			*	**	**	*	*	**	**	*	*	*	**	**
IDI±(mm)			2.08	3.07	2.74	3.71	6.07	6.25	4.81	5.09	5.06	5.58	6.17	6.36
$\frac{\log IDI}{IDI}$			0.06	0.06	0.07	0.13	0.10	0.12	0.13	0.18	0.13	0.12	0.12	0.12
判別可能			2,302	2,297	2,388	2,667	2,507	2,583	2,689	3,006	2,716	2,710	2,636	2,742

註：第3表に同じ

最も小さかった。また、48時間では2週2.20で最も小さく、25週 6.29 で最も大きかった。故に、これを図示すれば第2図の如く、6および25週は立っている。不偏分散は24時間では2週が最も大きく、6週は最も小さかった。また、48時間では2および6週が小さく、4および25週は大きかった。分離能も24時間では2および4週が小さく、6および25週は大きかった。48時間では6および25週が小さく2および4週が大きく表われている。これらの成績から感作後の時期で反応の良好なのは、アレルギーの強い6および25週であった。また、24時間と48時間における分離限界を比ぶるに、前者は後者よりもやや良好な数値であった。

次に、接種菌量の差異によるものを第4表についてみるのに、感作後6週の24時間においては、方向係数は1.0mgおよび10mg接種の両群とも5.0よりやや

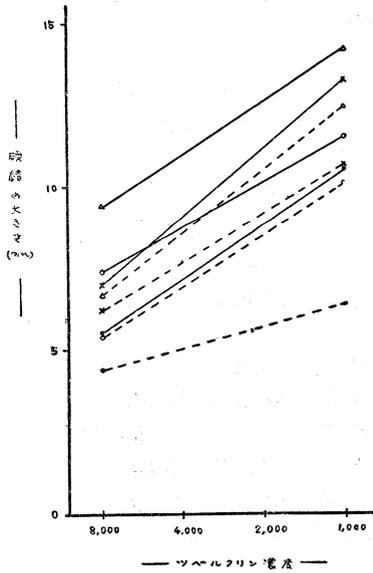
大きい程度であるが、1.0mg群では8.0で最も大きかった。48時間でも24時間におけると同一の傾向であった。故に、第3図においても1.0mg群のものが最も立っていた。分離限界は24時間においては各群とも比較的小さく0.06~0.07であった。しかし、48時間ではやや大きく0.12~0.13となった。それ故に判別可能範囲もずっと狭められている。さらに、25週後のものについてみるに、方向係数は24時間では4.3~5.3の間にあり、群による差は比較的少ない、48時間でも6.1~6.6であつて各群の差は僅少であった。また、分離能も24および48時間とも0.12と0.13とのものが多く、たゞ1.0mg群の24時間だけが0.18であつたに過ぎない。このように

たとえ6週頃では差のあつた動物も25週後となれば感作度はほぼ同一程度まで上昇しているのがみられる。この実験においても24時間値は48時間値に比し、一般に良好な値であつた。

4. 要因分析  
この実験において分析出来る要因は濃度差(D), 判定者差(H), 動物個体

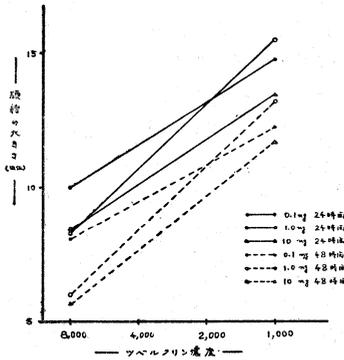
差(B), 個体の左右差(R), 部位差(U)および各交互作用等である。これらを推計学的に処理した結果は第5表の如くである。すなわち、濃度差および個体差は全例において1%の危険率において有意の差が認められた。判定者差は経過時期の実験では4週および6週に、菌量差の実験では6週の各群48時間と25週の24時間等において有意に表われており、一般に24時間は判定者差は少ないが、48時間にいたればその差が顕著となっている。これは24時間では反応が明瞭であるが、48時間では不鮮明のものが多くなるためと思われる。左右差は1~2のところに見られる外はほとんど有意ではなかつた。部位差は各群とも明かに有意の差が認められた。しかし、一般に頭部は尾部に比して反応は小さかつた。交互作用ではH×D, H×U, H×R, R×U等に若干の有意差が認められているが、一般に部位差による影響

第2回 感作後の各週における反応

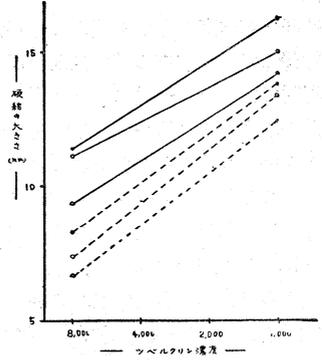


第3回 接種量の差異による反応

1. 6週後



2. 25週後



が種々の方法によつて感作度と反応の大きさを調べたところ、感作度が強く、かつ、試料の濃度差による方向係数の大きいもの程分離能もよくなつていことがわかつた。すなわち、感作後の時期による実験の2週48時間におけるように、感作度が弱く、反応の大きさも小さいもの(平均値5.1mm)の方向係数は2.2であつてそ

第5表 各実験の要因分析表

内容 週 時間 菌量 要因	感作後の時期						接種菌量の差異											
	2			4			6			24			48					
	24			48			0.1			1.0			10					
	10						0.1			1.0			10					
D	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
H			×			×			×			×			×		×	
B	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
R						×	×	×				×			×			
U	×	×		×	×	×	×			×		×	×	×	×	×		
H×D				×	×				×			×			×		×	
H×B																	×	
H×U			×	×						×	×	×					×	
H×R												×			×			
R×U			×	×	×	×	×	×		×	×	×	×			×		

註：D……濃度(8,000, 4,000, 2,500, 2,000, 1,666, 1,000)

H……判定者(A及I)

B……動物個体(6匹)

R……左右

U……部位(上中下)

×……5%危険率,

××……1%危険率

が大きかつた。

IV. 総括および考案

感作動物を用いてツベルクリンの力価試験を行う場合、考慮せねばならない事項は、個体の感作程度、注射部位、使用ツベルクリンの濃度および判定時間等である。もし、これらの要因に注意せず試験を行つた際は、時として途方もない結果が生ずることがある。われわれ

平均値11~12mm)の方向係数は5.26および8.06等であつて、その勾配は大きかつた。このような場合の分離能は0.06~0.07で甚だ小さい。これが標準液(2,000倍)に対する判別可能範囲は1.706~2.302倍であつて、甚だしく狭い範囲のものまで判別することが出来る。この結果から力価試験には感作度の強い動物を使用する方がよいことがわかつた。

要因分析によつて明らかなることは、各動物の個体差が

甚だしく有意なことである。この個体差が大きいため、群によつては菌量差あるいは経過週等による反応の差を凌駕したものもあつた。故に、小数例実験には出来るだけ同一感作度のものを選ぶことが大切である。また、注射部位差では左右の差は少ないが、頭部と尾部との差は著明であつた。一般に尾部は頭部に比し大きく反応し、動物によつては30~50%の濃度差以上にこの部位差が大きく現われることがある。これに関しては吉永<sup>18)</sup>も同一のことをいつている。判定者による誤差は比較的修練を重ねた者同志でも若干有意の差が認められている。しかし、よく調べてみると反応が強く15 mm以上のものでは判定者差は少ないが、5~6 mmの弱い反応ではこの誤差が大きかつた。判定時間では、24時間値が48時間値に比し良好な結果が得られた。これは24時間の方が48時間に比し、反応が強く、かつ、鮮明であるためであろう。

本実験は各群とも感作度が比較的不充分であり、動物の個体差も大きいので、あまり良い成績ではなかつた。しかし、このように悪条件の多いにもかかわらず、分離能の最もよかつた群では3.0 mmの差で2.000倍と2.300倍との濃度差が判別可能であつた。故に、今後統一系の動物を用い感作度の強いものを用うれば、より鋭敏に力価の差を算出することが出来るであろう。

## V. 結 言

モルモットによるツベルクリンの力価試験を行う場合の基礎実験として、感作後の時期および感作菌量差等による種々な感作度のものについて、ツベルクリンの濃度差と反応の大ききとの関係を検討し、次のことを要約する。

1. ツベルクリン・アレルギーは感作後週を追つて上昇した。しかして、ツベルクリンの濃度差を顕著に表わすのは感作度の強い動物であつた。
2. 接種菌量0.1, 1.0 および10 mg等の各群の感作後6および25週における反応では、接種菌量と感作度との間には相関は見られなかつた。
3. 反応の大ききと濃度との相関は濃度を対数にとつた場合、直線的関係であつた。また、感作度の強いものの方係数は濃度差が鋭敏に算定された。
4. 力価試験には判定者差、動物個体差および部位差

等の因子が表われ易いので、これらを常に考慮に入れて、判定を行うことが肝要である。

稿を終るに当り、種々御指導を賜つた柳沢部長に衷心より謝意を表します。

## 文 献

- 1) Koch, R. : Deutsch. Med. Wochschr., 17, 1189 (1891).
- 2) Dönitz, W. : Klin. Jahrb., 7, 225 (1900).
- 3) Otto, R. : Klin. Jahrb., 13, 137 (1905).
- 4) Römer, R. H. & Joseph, K. : Beit. z. Klin. & Tuberk., 14, 1 (1909).
- 5) Calmett, A. et Du Potter, : Ann. l'inst. Pasteur, 40,
- 6) Long, E. R. : J. Infect. Diseases., 37, 368(1925).
- 7) Buney, W. E. & Gottschall, R. Y. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 37, 71 (1938).
- 8) Seideman, R. M. : Am. J. Hyg., 30, (1939).
- 9) Seibert, F. B. & Glenn, J. T. : J. Bact., 41, 262 (1941).
- 10) Savage, C. L. : Am. Rev. Tbc., 43, 527(1941).
- 11) Clark, L. T. & Follin, S. F. : Am. Rev. Tbc., 46, 77 (1942).
- 12) Meyer, S. N. : Am. Rev. Tbc., 66, 31 (1953)
- 13) Sweany, H. C. : Am. Rev. Tbc., 56, 135(1947).
- 14) Umezawa, H. & Shiozawa, F. : Jap. Med. J., 1, 62 (1948).
- 15) Chen, G. & Sarber, R. W. : Am. Rev. Tbc., 59, 6 (1949).
- 16) Export. Committee on Biological Standardization : WHO/BS/ 227, 23 (Sep. 1953).
- 17) 富士山 : 日本医事新報, 1526 (1953).
- 18) Yoshinaga, K. : Jap. J. Med. Sci. & Biol., 6, 426 (1953)
- 19) 奥原政雄 : 日本臨床結核, 13, 51 (1954)
- 20) Wadley, F. M. : Biometrics, 4, 100 (1948). Am. Rev. Tbc., 56, 135 (1947).
- 21) 柳沢謙・浅見望 : 結核, 27, 21 : 27, 62 : 27, 113 (1952).