

精製ツベルクリン (PPDs) の保存に関する研究

第1報 PPDs溶液の力価の低下について

細 井 正 春

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

受付 昭和32年5月20日

I 緒 言

精製ツベルクリン PPDs は結核菌のソートン培養濾液から硫酸安門の γ 飽和で沈澱する蛋白のみを取り出し精製したものであつて、「ツ」蛋白はいわば裸の状態にある。一般に精製蛋白質は溶液で保存した場合、容易に変性または失活すると言われている。精製「ツ」においても溶液の保存は力価の低下が早いとされ、乾燥粉末にして保存し、用に臨んで溶解して用いるのがよいと言われている。また、溶解したものについては有効期間が短期間に制限されている。溶液保存の報告はいくつかあるが、その成績はまちまちである。その2, 3をあげてみると、Seibert¹⁾は1% PPDを0°C 5カ年保存後異常を認めず、37°C 39日保存後も変化なしとしている。Doig²⁾は1% PPDを室温で3カ年保存し、その力価の低下しないことをのべている。Seideman³⁾は0.2 γ /ccを室温で18日、氷室では7週間保存後変化を認めずとのべた。Catal⁴⁾はG T溶液を15ヵ月保存したが不変であり、I P₄₈も1カ年保存に耐えるとのべている。これらの結果から考察すると、精製「ツ」の力価はOTの安定性には劣るが、比較的長期の保存に耐えるようである。しかるに最近、Guld⁵⁾⁶⁾らは精製「ツ」の力価が、アンプルに一杯分注したものに比べ、半分またはそれ以下に分注したものは1~2日の短時日の保存においてさえ、著しい力価の低下があることを認め、「Volume effect」と称し、これを各種精製「ツ」で詳細に検討し、低下の原因が、容器の表面への活性物質の吸着によるものであると結論している。

われわれが製造したPPDs⁷⁾も、力価試験を繰返し行つている間に⁸⁾、溶解後時間を経たものは力価が低下していることを見出したので、溶解後の有効期間を決めるために溶液の濃度および保存条件をかえてこれを検討した。

II 実験方法

実験を2回に分け、第1は長期すなわち、1~4ヵ月保存による低下を、第2は短期すなわち、1ヵ月以内における低下を調べた。

1. 4ヵ月 (16週) までの保存実験

a) PPDs の保存:

PPDs は10mg ずつアンプルに凍結乾燥したものをを用い、実験の16週、11週および4週前に1cc 中1mg の濃厚溶液と0.001mg の稀薄溶液とを作つた。溶媒は0.5%石炭酸を含む磷酸緩衝液を用いた。上記各溶液は2分して室温と氷室とに保存したが、16週前の試料を調製したのが7月、実験を行うまでの約4ヵ月間の気温の平均は、7月27.6°C、8月26.3°C、9月22.3°C、10月17.6°C および11月11.0°Cであつた。7月~11月の間に相当の開きがあるが、4ヵ月の平均は21°Cである。また、濃厚溶液で保存したものは、実験の前日に0.001mg/cc に稀釈し、同時に対照として新たに凍結乾燥 PPDsより0.001mg 溶液を作つた。以上でそれぞれ条件を異にする13試料ができる。

b) 動物による力価

青山B株の死菌流バラによつて感作したモルモット13匹を用い、1匹のモルモットに12試料を注射し、24時間および48時間後の硬結の大きさを測定した。

c) 人体による力価

同上試料を同一時期に小中学童1,500名に対して注射した。この場合年齢、性別、左右等の反応差をなくすために、予め試料番号を分散して記入した個人カードを渡し、このカードにしたがつて試料のPPDs0.1ccを前膊屈側皮内に注射し、反対側には標準「ツ」(OT)の2,000倍を注射した。判定は48時間後に行い、発赤、硬結、Sign test⁹⁾等を調べた。

2. 1ヵ月以内の保存実験

a) 試料の保存:

PPDsは1mg ずつアンプルに凍結乾燥したものをを用い、実験の4週、3週、2週および1週前にそれぞれ1cc 中0.001mg の稀薄溶液のみをつくり、これを37°C フランキおよび氷室に分けて保存し、実験前日に新たに0.001mg の溶液を調製して対照とし、これと前記各週稀釈の保存溶液と合計9試料を比較した。

b) 力価試験

本実験は動物のみで、1匹のモルモットに試料を9ヵ所ずつ、準ラテン交絡法によつて、9匹の動物に注射し

た。判定は24および48時間後の硬結の大きさを測定した。

III 実験成績

1. 4ヶ月までの保存実験

16週まで保存した第1実験の動物および人体による力価試験の結果は表1および図1, 2に示す如くである。

まず動物の成績からみると、調製直後の対照液の24時間値15mmが、濃厚溶液の氷室4週保存後には14.2mmとなり、反応はやや小さい程度である。しかるに、11週ではさらに減じ、16週では12.2mmとなり、約3mm近く小さくなった。これに対し室温保存では、4週において13.3mmでかなりの減少がみられ、16週では12.4mmとなつている。すなわち、図示の如く、室温保存は氷室保存よりも反応性の低下は著しかった。また、稀薄溶液においては、氷室4週保存では力価の低下は認め難いが、11週および16週では著しく反応は小さくなつている。室温保存は4週においても著しい力価の低下がみられ、16

表1 保存PPDs溶液の人体および動物による力価の変動

稀釈濃度	保存温度	保存期間(週)	動物		人体	
			硬結平均値(mm) 24時間	48時間	Ratio 48時間	Sign test
対照		0	15.0	15.1	1.05	+0.55
濃厚溶液 1mg/cc	氷室	4	14.2	12.7	1.02	+0.49
		11	15.6	11.6	0.95	+0.14
		16	12.2	10.5	0.78	+0.12
	室温	4	13.3	11.7	0.95	+0.02
		11	12.7	11.0	0.88	-0.51
		16	12.4	10.7	0.82	-0.35
稀薄溶液 0.001mg/cc	氷室	4	14.9	12.8	0.96	+0.17
		11	13.3	11.5	0.97	+0.23
		16	11.3	8.7	0.88	-0.36
	室温	4	12.7	10.6	0.94	+0.06
		11	11.5	9.6	0.86	+0.06
		16	9.6	7.5	0.81	-0.29

図1 保存PPDs溶液の動物による力価の変動

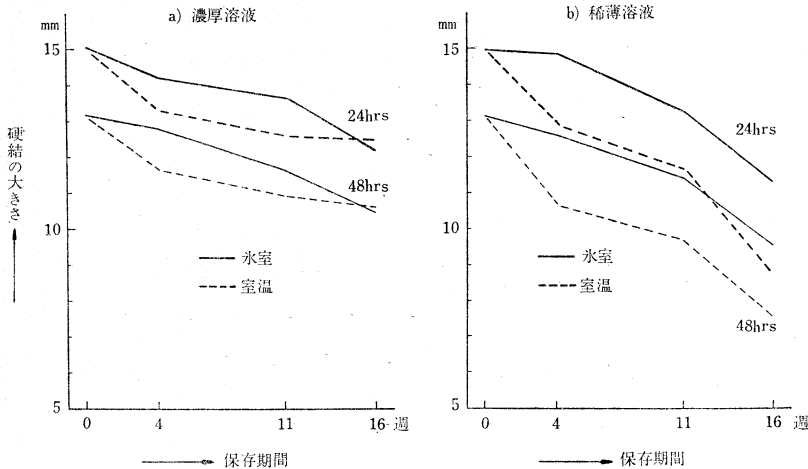
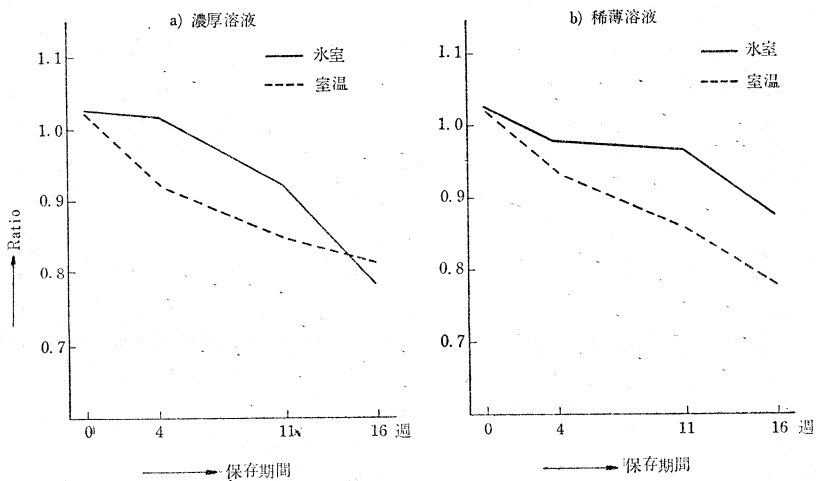


図2 保存PPDs溶液の人体による力価の変動



週では氷室よりも低下が甚だしかつた。

次に、同一試料を人体について試験した結果は、Ratioにおいて濃厚溶液の氷室4週保存では、1.02で対照の1.03とほとんど差が認められない。しかし11週では0.93とやや低下し、16週では0.78と著しい低下がみられた。しかるに室温に4週保存した場合のRatioは0.93となり、氷室の11週とほぼ等しかつた。また11週では0.88、16週では0.82と漸減している。しかし、この16週の室温保存が氷室保存のものと同交しているが、これは動物においても同様な傾向にあつたことから、稀釈方法の誤差のためかと思われる。また稀薄溶液では氷室保存4および11週ともRatio 0.96および0.97であつて、やや弱い程度であるが、16週では0.88となつている。さらにまた、室温保存では4週で0.94となり、かなり弱まり、16週では0.81となつている。Sign test をみても、Ratioの場合とほぼ同一傾向がみられる。

以上を濃度の点からみると、濃厚溶液と稀薄溶液では後者の方が低下は早く、特に動物の成績でこの傾向が明瞭であつた。温度の力価に与える影響は大きく、室温保存は氷室保存より低下が早い。とくに、4週で急激に両者に差を生じ——動物の硬結で1~2mm——その後は割合両者が平行して低下しているように見受けられた。また、人体におけるSign testが+側にかなり高い値を示すのは、発赤の大きさが同一の場合でも、標準OTに比べてPPDsは硬結の触知率が高いことが主な原因である。

動物の成績は実験計画の関係で要因分析ができなかつたが、人体における成績を各試料の最少数26名に揃えて、

表2 保存PPDsの人体成績の要因分析

要 因	平方和	自由度	不偏分散	F	有意項
M. 男女	0.77	1	0.77	0.04	
R. 氷室・室温	56.64	1	56.64	2.68	
D. 濃厚・稀薄	0.10	1	0.10	0.01	
T. 4, 11, 16週	469.58	2	234.79	11.10	**
M×D	10.78	1	10.78	0.51	
M×R	5.41	1	5.41	0.25	
M×T	64.15	2	32.08	1.52	
D×R	8.31	1	8.31	0.39	
D×T	27.45	2	13.72	0.65	
R×T	5.14	2	2.57	0.12	
D×R×T	27.87	2	13.94	0.66	
M×R×T	107.92	2	53.96	2.55	
M×D×T	105.80	2	52.90	2.50	
M×D×R	30.50	1	30.50	1.44	
M×D×R×T	16.75	2	8.34	0.39	
	973.13	600	21.15		

** 1%の危険率で有意項

要因を男女(M)、保存温度(R)、保存濃度(D)、保存期間(T)の4因子に分けて分析したところ、保存期間(T)に1%の危険率で有意差を認めたにすぎず、保存温度(R)は5%の危険率では有意差は認められなかつた。(表2)

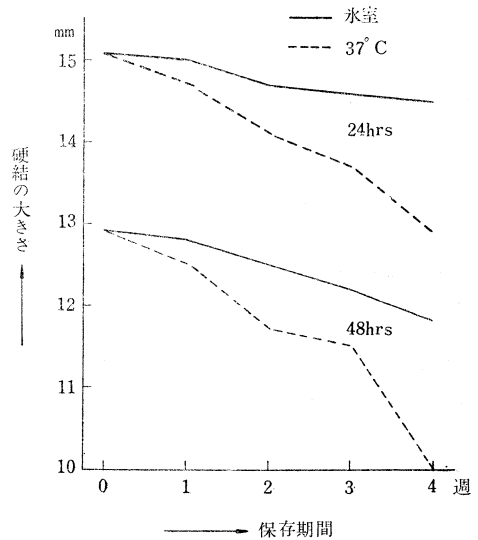
2. 1ヵ月までの保存実験

4週まで保存した第2実験の結果は表3および図3に示した。

表3 保存PPDs 1ヵ月以内の動物による力価の変動

保存期間 週	24 時間				48 時間			
	氷室保存 硬結・Ratio	37°C保存 硬結・Ratio	氷室保存 硬結・Ratio	37°C保存 硬結・Ratio	氷室保存 硬結・Ratio	37°C保存 硬結・Ratio	氷室保存 硬結・Ratio	37°C保存 硬結・Ratio
0	15.1 ^{mm}	1.00	— ^{mm}	—	12.9 ^{mm}	1.00	— ^{mm}	—
1	15.0	0.99	14.7	0.97	12.8	0.99	12.5	0.97
2	14.7	0.97	14.1	0.93	12.5	0.97	11.7	0.91
3	14.6	0.97	13.7	0.91	12.2	0.95	11.5	0.89
4	14.5	0.96	12.9	0.85	11.8	0.92	10.0	0.78

図3 保存PPDs 溶液1ヵ月以内の動物による力価の変動



1ヵ月以内といえどもPPDsは漸次力価の低下を示しており、37°Cにおいたものは、対照の硬結平均値が24時間後15.1mmであるに対して1週14.7mm、2週14.1mm、3週13.7mm、4週12.9mmと3mmの低下を示した。これに反して氷室保存のものは1週15.0、2週14.7、3週14.6、4週14.5mmと、対照より0.6mmの低下を示したにすぎない。この成績は第1実験につながるものと思われる。48時間後の成績も大体24時間と同じ傾向であつた。

この成績を、保存温度(R)、保存期間(T)の要因に分けて分析したところ(表4)(R)および(T)はいずれも1%の危険率で有意の差が認められた。

表4 保存PPDsの要因分析(1ヵ月以内)

要 因	— 24 時間 後 —				有意項
	平方和	自由度	不偏分散	F	
R. 氷室, 37°C	11.13	1	11.13	7.04	**
T. 3d. 1~4w.	22.69	4	5.67	3.59	**
R×T	4.73	4	1.18	0.75	
	38.55	109			

要 因	— 48 時間 後 —				有意項
	平方和	自由度	不偏分散	F	
R.	16.80	1	16.80	11.35	**
T.	51.36	4	12.84	8.67	**
R×T	7.15	4	1.79	1.21	
	75.31	109			

** 1%危険率で有意項

IV 総括および考案

精製「ツ」の力価が低下しやすいという事実は、これを臨牀的に用いた場合、不都合を招来することが予想される。これを防止するためにも、精製「ツ」による実験の正確を期すためにも、その適正な保存条件と、有効期間を定めることが当面の問題である。また従来、海外の報告にみられる成績をそのままわれわれのPPDsにあてはめて考えることは危険である。そこで、われわれはまず通常の磷酸緩衝液に溶解した場合に、どれほどの低下を示すかを検討した。

その結果、PPDsは溶液にした場合、その力価は時間の経過と共に低下することがわかった。しかし、氷室では約1ヵ月間は力価の著しい低下はないが、室温および37°C保存では1ヵ月においてもかなりの低下がみられる。また、氷室に保存しても約3ヵ月経てば力価の低下がみられた。また、溶液の濃度は稀薄なほど低下は早かった。

はじめのべた如く、「ツ」の活性因子はOTとして存在している間は保護物質中にあるため、これを稀釈しても力価の変化は起りがたく、精製「ツ」にすれば活性因

子は裸にされ、蛋白変性に関与するあらゆる条件に鋭敏になり、力価の低下は早まるものと考えられる。PPDsの製造が、低温下に行われるのもこの理由によつてい

る。われわれは今回は、保存による力価の変動の事実についてのみ記し、次回以降この原因の探求を行いたいと考えている。また、第1実験において人体と動物とによる成績が、ほぼ同一傾向にあつたので、今後、動物の力価試験によつて保存の実験を行うつもりである。

V 結 言

われわれは予研製PPDsを溶解して保存し、その力価の低下を詳しく検討した結果、次のような結論を得た。

- 1) 室温ないし37°Cに保存した場合は、氷室に保存した場合に比べ、力価の低下が早い。
- 2) 濃厚液に比して稀薄液の方が力価の低下が早い。
- 3) 氷室に保存した場合、PPDs溶液は、1ヵ月間使用しうる。

終りに臨み、御校閲、御指導を賜つた柳沢部長に感謝する。

文 献

- 1) Seibert, F.B. & Du Four, E.H. : Am. Rev. Tbc., 41: 471, 1940.
- 2) Doig, A.T., Gemmill, G., Kayne, G., Linggod., F.V., Parish, H.J. & Wastwater, J.S. : Brit. Med. J., 1: 992, 1938.
- 3) Seidemann, R.M. : Am. J. Hyg., 30: 1, 1939.
- 4) Catel, W. : Sonderdruck aus Behring's werk mitteilugen. 1953.
- 5) Guld, J. et al. : Am. Rev. Tbc., 72: 126, 1955.
- 6) Guld, J. et al. : Am. Rev. Tbc., 74: 297, 1956.
- 7) 細井正春・浅見 望 : 結核, 32: 175, 1957.
- 8) 前田道明他 : 結核投稿中.
- 9) 柳沢 謙他 : ツベルクリン反応, p.80, 1955.