

精製ツベルクリンについて

第3報 H画分と旧ツベルクリンおよびPPDとの比較研究

新藤三郎

東北大学抗酸菌病研究所 (指導 海老名敏明教授)
菅野巖助教授

受付 昭和35年5月16日

第2報¹⁾で報告したように、H画分(以下 H-f と略:第1報²⁾で報告したように OT より抽出した一種の精製ツベルクリンである)はその稀釈度と陽性率の関係をグラフに画いた場合、OT よりはるかに急上昇曲線を描くこと、および力価においても急激に力価が強くなることを知った。

そこでさらに H-f のツベルクリン・アレルギーを OT、および PPD と比較検討することにした。今まで精製ツベルクリンと OT との皮内反応の差異をみた文献は両抗原に対して陰性陽性とくい違って現われた群に対しての検討が多く³⁾、両抗原ともに陽性に現われた群に対する皮内反応の現れ方に注目した文献はまだみられない。そこで私は OT×OT、OT×H-f、OT×PPD、H-f×PPD群と被検者を4群に分け、それぞれともに陽性に現われたものに対して、それらの発赤の大きさを検討した。

実験方法と実験結果

◇実験に用いた OT は当研究所製ツベルクリン原液 Lot 63 である。

◇OT、PPD*、H-f の稀釈は生理的食塩水で行ない、蒸気滅菌 30 分後氷室に保存し、稀釈を行なった日のうちに皮内注射を終了した。

◇実験の対象となつた被検者、皮内注射の実施方法、測定方法、皮内反応の陽性陰性の判定方法等はすべて第2報と同様である。

◇皮内注射の部位は第2報では被検者の前膊屈側を用いたが、当被検者は3ヵ月ごとに右または左にツ反を行なっている。そこで注射はできるだけ前回の注射部位と思われる所より 5~10 cm 離して注射した。しかしこの実験では極度に局所アレルギーの影響を考慮して左右両側の上膊内側中央部に注射した。

◇この実験に用いた被検者は 13~56 才までで計 241 名、このうち BCG を行なつたものが 45 名だが、ここ 3 年以内に行なつたものはなく、種痘も 5 年以内に行なつたものは 1 名もなかつた(表 1)。また上膊にツ反を受けたことのある被検者もなかつた。したがって上膊

の局所アレルギーの変動を考慮する必要はないと思う。

*PPD は Parke, Davis & Co. Detroit Mich, USA 製 (Lot nos 029950-H April 1 1961) である。

被検者 241 名を 4 群に分け、1 群では左右上膊にツ反を行ない、ツ反皮内反応の相関関係を、2 群では OT と H-f との相関関係を、3 群では OT と PPD の相関関係を、4 群では PPD と H-f の相関関係をみた。

実験 A: OT×OT の相関関係

被検者 42 名の上膊内側の左右両側に 1:2,000 OT 0.1 cc を皮内注射し、その発赤および硬結を 48 時間後測定、その発赤の大きさを撒布図にまとめたのが図 1 で

$$\text{Ratio} \left(\frac{L t}{R t} \right) = 0.98, \text{ 相関係数 } r = 0.92 \text{ である。}$$

実験 B: OT×H-f の相関関係

被検者 79 名の左右両側上膊内側の一侧に、OT 1:2,000 0.1 cc、他側に H-f 10 γ を皮内注射し、その発赤および硬結を 48 時間後測定したところ、79 名中 OT 陽性、H-f 陰性が 2 名、OT 陰性、H-f 陽性 1 名であつたので、この 3 名を除き 76 例について Ratio および相関係数 r を求めた(図 2)。

$$\text{Ratio} \left(\frac{H-f}{OT} \right) = 0.98 \quad r = 0.69$$

実験 C: OT×PPD の相関関係

被検者 80 名に対し、PPD 0.1 γ を左右両側上膊内側の一侧に、OT 1:2,000 0.1 cc を他側に皮内注射し、その発赤および硬結を 48 時間後測定。このうち OT 陽性、PPD 陰性であつた 1 名を除き 79 名について Ratio および相関係数 r を求めた(図 3)。

$$\text{Ratio} \left(\frac{PPD}{OT} \right) = 1.06 \quad r = 0.44$$

実験 D: PPD×H-f の相関関係

被検者 40 名に対し、一方の上膊内側に PPD 0.1 γ を、他方の上膊内側に H-f 10 γ を皮内注射し、その発赤および硬結を 48 時間後測定、このうち PPD 陽性、H-f 陰性の 4 名を除き、36 名について Ratio および相関係数 r を求めた(図 4)。

$$\text{Ratio} \left(\frac{H-f}{PPD} \right) = 0.908 \quad r = 0.45$$

表1 被検者の年齢層およびBCG接種状況

各実験に用いた接種 ツベルクリン	被検者数 計 241例	10~20才	20~49才	50才以上	BCG 接種者	備考	
						BCG 接種 最終年	接種 年度
実験 A OT×OT	42 ♂21 ♀21	4	38	0	3	昭和 26	1名
						昭和 27	2名
実験 B OT×PF	79 ♂50 ♀29	7	69	3	16	昭和 22以前	12名
						昭和 24	1名
						昭和 25	1名
						昭和 26	2名
実験 C OT×PPD	80 ♂56 ♀24	7	71	2	17	昭和 22以前	7名
						昭和 23	1名
						昭和 26	2名
						昭和 27	4名
						昭和 25	2名
						昭和 28	1名
実験 D PPD×PF	40 ♂29 ♀11	2	36	2	9	昭和 22以前	2名
						昭和 23	1名
						昭和 24	3名
						昭和 25	2名
						昭和 26	1名

図1 OT 2,000× : OT 2,000×
撒布図
(発赤による判定の場合)

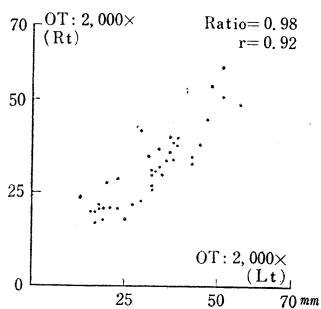
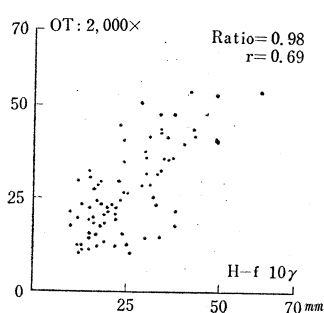


図2 OT 2,000× : H-f 10γ
撒布図
(発赤による判定の場合)



すなわち OT, PPD, H-f の発赤の態度をみると、力価はほぼ等力価であるのに、相関係数は OT×H-f が 0.69, OT×PPD が 0.44, PPD×H-f が 0.45 で、これらの間の相関が意外にも非常に小さいことを知った。

なおこれらのことは硬結についても同じ結果が得られた(図5~8)。ただし硬結の場合、硬結長短径の平均値 5 mm 以上を陽性、5 mm にみえないのを陰性とした。

考案ならびに小括

図3 OT 2,000× : PPD 0.1γ
撒布図
(発赤による判定の場合)

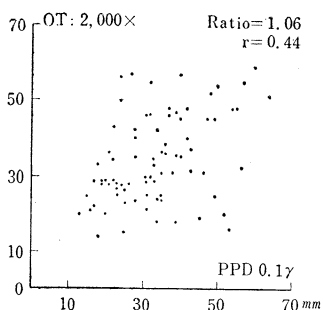
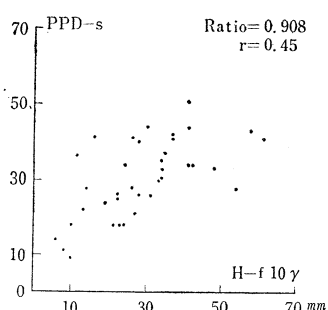


図4 PPD 0.1γ : H-f 10γ
撒布図
(発赤による判定の場合)



矢作⁴⁾、岡・新津ら⁵⁾の述べるごとく、また実験 A でみるごとく、ツ反は等力価であれば左右の関係は非常に高い相関を示し、相関係数(=r)も 0.9 以上を示すものであるが、実験 B OT×H-f は Ratio = 0.98 と等力価を示しているにもかかわらず r = 0.69、実験 C OT×PPD は Ratio = 1.06, r = 0.44、実験 D PPD×H-f は Ratio = 0.908, r = 0.45 であった。すなわち結核感染者には同じく陽性に出るといつても、PPD, OT, H-f の間には反応の大きさがはなはだまちまちであると

図 5 OT 2,000× : OT 2,000× 撒布図 (硬結による判定の場合)

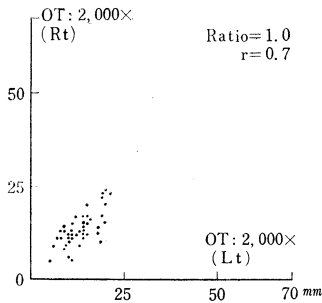


図 6 OT 2,000× : PF 10γ 撒布図 (硬結による判定の場合)

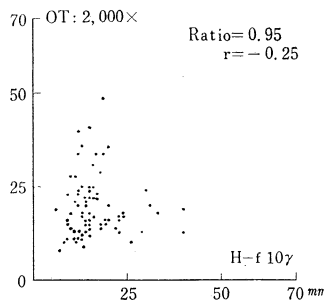


図 7 OT 2,000× : PPD 0.1γ 撒布図 (硬結による判定の場合)

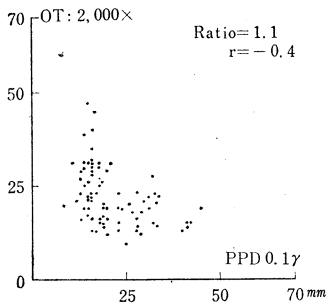
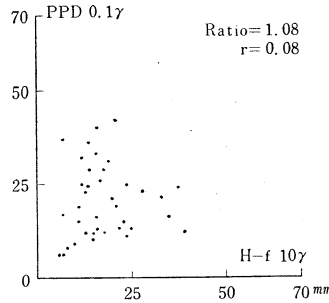


図 8 PPD 0.1γ : PF 10γ 撒布図 (硬結による判定の場合)



ということが明らかにされた。すなわち今までは2つのツベルクリンと比較する場合、それら発赤(または硬結)の平均値が等しかったり、Ratioが1.0前後であればそれで満足であったのだが、同じく陽性であり、Ratio=1.0であつても発赤(または硬結)の大きさがこのようにばらばらであるということは、まだ発赤(または硬結)の大きさが何を意味するか不明であるが、2つのツベルクリンを論ずる場合、Ratioだけでなく相関係数も考慮に入れなくてはならないと思われる。

総 括

ツ反の活性因子は蛋白質体であるとし、Seibert⁶⁾, Lind⁷⁾, Bouquet et Sandor⁸⁾, 貝原⁹⁾, 武田¹⁰⁾らにより purified protein derivative が精製されたが、Medlar¹¹⁾による動物実験で purified protein derivative の1つである PPD が OT より診断学的に劣ることが指摘された。一方磷脂質成分の活性¹²⁾, 芳香揮発性成分の活性¹³⁾等が論議されるにつれ、ツ反活性因子は精製蛋白質体のみによるものではないことが明らかにされた。また多糖体の活性については Küster¹⁴⁾, 糟谷¹⁵⁾が認め、Seibert¹⁶⁾, 戸田¹⁷⁾らは多糖体に活性が認められても、それくらいの活性はそこに含まれている蛋白質体で十分発赤を起こしうるとして多糖体の活性を

否定した。

私は OT 原液より窒素量 0.998%, 多糖体量 72.08% を含むツベルクリン多糖体画分、H-画分(H-f)を抽出したことを第1報で報告、第2報でそのH-fが稀釈度と陽性率の間にOTよりはるかに急上昇曲線を描くこと(表2, 図9)を報告した。また今回の実験でOT, PPD, H-fの皮内反応を行ない、ともに陽性になったものについての大きさを検討し、H-f×OT, PPD×OT, H-f×PPDのRatioは0.98, 1.06, 0.908とほぼ等力価を示したのにかかわらず、相関係数は0.69, 0.44, 0.45でとくにOT×PPD, H-f×PPDの間にはほとんど相関がないといつてもいいくらいであることを知った。

これらのことはOT, PPD, H-fのおおのに含まれている蛋白質体の特異性のみよりなるものであるのか、あるいはおのおのに含まれている蛋白質体以外の成分も関与しているのかどうかは不明である。しかし従来の考え方によればツベルクリン・アレルギーの発現は窒素含有量が非

図 9 各群の陽性率(発赤による判定)

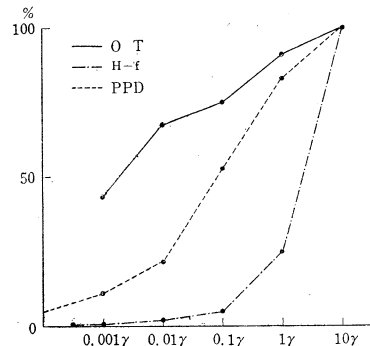


表 2 各群の陽性率(発赤による判定)

稀釈度	被検者数	陽 性 率			
		OT		H-f	
		陽性者数	%	陽性者数	%
0.001γ	46	20	43.4	0	0
0.01γ	69	47	68.0	2	2.8
0.1γ	47	35	74.4	5	10.6
1γ	44	40	90.9	25	56.8
10γ	31	31	100.0	31	100.0

第2報表1, 図1を再掲載す。

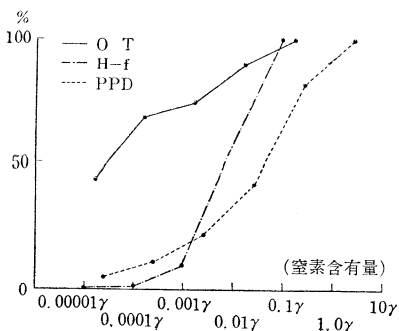
常に重要視されている。そこで第2報でみた稀釈度と陽性率の違いが窒素含有量の違いによるのではないかとの疑問も生じるので、Lot 63 OT, PPD, H-f の同一窒素量の場合、どのような曲線を描くかを考えてみた。

まず Lot 63 OT の N 量は micro-Kjeldahl 法で 2.16 %、多糖体量は 1 N-H₂SO₄ で 10 時間煮沸し、加水分解後、Hagedorn-Jensen 法で 1.0 % であつた。そこでこれら Lot 63 OT, PPD, H-f の窒素量および多糖体量を示すと表 3 のようになる。これより Lot 63 OT, PPD, H-f の窒素含有量は 2.16 %、14.8 %、0.998 % であり、多糖体含有量は 1.0 %、5.9 %、72.09 % であるので、これら 10 γ に含まれる窒素量は 0.2 γ、1.48 γ、0.099 γ であり、一方これら 10 γ に含まれる多糖体量は 0.1 γ、0.59 γ、7.2 γ である。これを表 2、3 に照らしあわせると Lot 63 OT は窒素量 0.2 γ のときツ反陽性率が 100 %、PPD は窒素量 1.48 γ のときツ反陽性率が 100 %、H-f は窒素量 0.099 γ のときツ反陽性率が 100 % であることを示している。以下同様に計算して図 9 を書き改めると図 10 のようになる。これより稀釈度と陽性率の違いが窒素含有量の違いによるものでないことが分かつた。しかればこの稀釈度と陽性率との間の分布曲線の違いはおのおのに含まれている蛋白体そのものの違いによるものであるとも十分考えられるが、おのおのに含まれている多糖体含有量も大いに関与しているのではないとも考えられる。もちろんこのことで多糖体そのものに活性を認めるものではないが、多糖体は蛋白体と混在することに

表 3 Lot 63 OT, PPD, H-f の窒素、多糖体含量 (%)

	N (%)	多糖体 (%)
Lot 63 OT	2.16	1.0
PPD	14.8	5.9
H-f	0.998	72.09

図 10 各群の陽性率
(各群の窒素含有量と陽性率の関係)



よつて大いにツベルクリン・アレルギーの現れ方を左右するものと思われる。

総 括

- 1) OT 400 cc にアセトン、アルコール、クロロホルム、エーテル、20%三塩化醋酸を加えてツベルクリン画分 (H 画分) 1.6 g を精製、このものは N 量 0.998 %、多糖体量 72.09 % で多糖体画分である。
- 2) H 画分はその 30 γ/0.1 cc ~ 10 γ/0.1 cc の間に旧ツ 2,000 倍 0.1 cc に相当する力価があると思われる。
- 3) 稀釈度とツ反陽性率との関係で、OT は直線的であるが、H-f は急上昇曲線を示した。かかる性質は抗原の優秀性を論ずる場合、具備されなければならない一性質と思われる。
- 4) OT×OT, OT×PPD, OT×H-f, PPD×H-f の Ratio がそれぞれ 0.98, 1.06, 0.98, 0.908 で r が 0.92, 0.44, 0.69, 0.45 であつた。すなわち 2 つのツベルクリン・アレルギーを比較する場合、発赤 (または硬結) の平均値や Ratio の検討だけでは十分といえず、相関係数もあわせ考えなくてはならないと思われる。

文 献

- 1) 新藤三郎：結核，35：503，昭35.
- 2) 新藤三郎・村井勢：結核，35：352，昭35.
- 3) a) Long, E.R., & Seibert, F.B. : Amer. Rev. Tuberc., 35 : 281, 1937.
- b) John, L.L. : Amer. Rev. Tuberc., 53 : 1220, 1937.
- c) Israel, H.H., & Panne, H.M. : Amer. Rev. Tuberc., 41 : 188, 1940.
- d) Kōlitz, E. : Arch. Kinder. h.K., 143 : 163, 1951.
- e) Plunkett, R.E., & Siegel, W. : Amer. Rev. Tuberc., 35 : 296, 1937.
- 4) 矢作光美：日結，4：666，昭18.
- 5) 岡捨巳・新津泰孝：抗研誌，1：27，昭21.
- 6) Seibert, F.B. : Amer. Rev. Tuberc., 44 : 9, 1941.
- 7) Lind, P. : Tubercle, 19 : 385, 1938.
- 8) Bouquet, A. : Ann. Inst. Past., 57 : 622, 1936.
- 9) 貝原守一：福岡医学雑誌，36：598，昭18.
- 10) 武田徳晴：結核，26：485，昭26.
- 11) Medlar, E.M. : Amer. Rev. Tuberc., 43 : 534, 1941.
- 12) Ebersson : Amer. Rev. Tuberc., 19 : 327, 1929,

- 13) 菅原真行：結核, 7 : 635, 昭4.
- 14) Küster, E. : Beitr. Klin. Tbc., 82 : 237, 1933.
- 15) 糟谷伊佐久：東京医事新誌, 2946 : 2313, 昭10.
- 16) Seibert, F.B. : Chemical Review, 34 : 107, 1944.
- 17) 戸田忠雄：結核菌と B C G, 63, 南山堂, 昭18.