

ツベルクリン力価の新検定法に関する研究

片岡哲朗

国立予防衛生研究所結核部（部長 室橋豊穂）

受付 昭和 39 年 9 月 10 日

A NEW POTENCY TEST METHOD OF OLD TUBERCULIN*

Tetsuro KATAOKA

(Received for publication September 10, 1964)

The potency of old tuberculin has been assayed in Japan by the skin reactions of both human subjects and sensitized guinea pigs. However, test results on human subjects vary to a considerable extent due to the various degrees of tuberculin sensitivity, on one hand, and to the accelerated reaction influenced by the repeated tuberculin injection in the same site, on the other. In this connection, studies were carried out to settle a new rational assay method employing "Sequential test" on the guinea pigs, which are easily sensitized in a constant level and accordingly, the results obtained are mathematically analysable.

For the "Sequential test", it is indispensable to obtain guinea pigs always sensitized in the similar degree. In addition, the animals are required to enable us to differentiate slight differences in reaction sizes elicited by various concentrations of tuberculin as sensitively as possible. To satisfy these requirements it was proposed to use the guinea pigs which are able to fill up the following conditions: (1) the reaction size produced by the injection of a 1:2,000 dilution of tuberculin is between 14 and 19 mm, and (2) the difference of reaction sizes produced by 1:2,000 and 1:6,000 dilutions of tuberculin is more than 4 mm.

Using sixty sensitized animals selected by the conditions described above a standardization for assay method of tuberculin potency was attempted. On both sides of back of the animals, two different dilutions, 1:1,000 and 1:4,000, of tuberculin were injected symmetrically, 24 hours after injections reaction sizes were measured, and the differences of the reaction sizes due to two different dilutions and the mean square (U^2) were calculated. These values calculated were converged respectively and were allowed to be analyzed statistically. The qualification of the tuberculin which is considered applicable for practical use was determined as follows: (1) the difference of reaction sizes between the standard dilution and the sample to be examined must be within 1 mm, (2) the probabilities of producer's risk and consumer's risk must be 0.10 and 0.05 respectively, and (3) the value of standard deviation must be calculated from the value of U^2 by using chi-square (χ^2) distribution. Both the acceptance number and the rejection number were determined, and assay diagram and table were made.

It was proved by the model experiments that this diagram is very useful as the new potency test of tuberculin with a high accuracy and practicability.

* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo.

緒言

現在わが国で行なわれている生物学的製剤基準¹⁾に基

づくツベルクリン（以下ツと略す）力価検定では、人体および動物が用いられている。しかし、人体を用いる場合、1) ツ感受性の程度の幅が広いために試験の精度が

あまり良好でなく、必然的に多数の対象を必要とする。
2) しかも種々の事情から、そのような多数の対象を随時随所に求めることは容易でなく、将来も人体試験を現在同様の規模で続けていくことはきわめて困難になりつつある。3) さらに、同一対象に頻回注射する結果、反応様相の変化が著しくなり^{2,3)}、反応自体に信頼をおきたい等の難点⁴⁾が、近年とくに気づかれるようになった。

そこで、動物を主体とするツッ力価検定法を開発して、検定理論に適つた、いつそう合理的なものにする必要が生じてきたが、現行基準の動物試験方法そのままでは、使用動物のツ感受性と力価分離能とにまだかなり大きな幅があり、したがって検定ごとに必ずしも常に正しい値を得ることを期待できない。

この意味から、ツ感受性と分離能のいつそう優れた動物を得るために、多年にわたり研究⁴⁾¹¹⁾が重ねられてかなり一定したツ感受性と優れた分離能とを有する感作動物がわれわれの研究室では得られるようになった。このような背景のもとに、三浦¹¹⁾は生産管理の分野で用いられている逐次抽出法を導入して、現行法よりも明らかに合理的と考えられる新検定法を提唱した。これによれば、理論的には人体を用いなくとも十分に正しいツッ力価検定法を実施しうることとてであつた。とくに、推計学的根拠に立つ点がこの方法の長所と考えられた。

ところが、実際にこの方法を適用して検定を行なつてみると、三浦の提示した検定図は必ずしも普遍性をもたず、実用に供しうるものとはいはいがたかつた。その原因としては、実験条件の細かい点の規制に欠けるところがあつたことがあげられる。そこで著者は、まず使用する感作動物の条件をいつそう厳密に規制するために、ツ感受性が一定の幅におさまり、しかも分離能が十分優れている動物を揃えるための選別法を検討し、一定の規制条件を見出すことができた。次に、その規制条件によつて選び出された感作動物を用いて、比較すべき2濃度のツ稀釈液の力価の差が、推計学的分析の可能な数値として得られるか否かを調べた。その結果、三浦の提唱した逐次抽出法による検定法を改善した新しい検定図表を作ることができ、これを用いれば、検定の実際に十分用いられることが示されたので、その成績を報告する。

実験方法

1. 使用動物

健康な体重 350~450 g の白色モルモットの雌を用い、検定基準¹⁾に記載されている方法で感作し、6~8 週後に用いた。

2. 注射試料

予研製 OT Lot No. 18 の原液を、硼酸硼砂緩衝液で稀釈して次の諸濃度のツ稀釈液を調製した。a) 実験 I :

1, 150, 2, 000, 3, 450 および 6, 000 倍稀釈液 (以下“液”と略す)。b) 実験 II および III : 力価の差の比較のためには 1, 000 倍および 4, 000 倍液, 検定のモデル実験には 2, 000, 3, 000 および 1, 300 倍液。

3. 注射部位

次の各部位の左右に対称に 0.1 ml ずつ皮内注射した。

a) 実験 I : 肩部……背部肩胛骨の後の部位, 背部……背骨より約 2 cm 腹側によつた部位, 腹部……“背部”よりさらに約 3 cm 腹側に寄つた部位 (横腹部)。b) 実験 II および III : a) の“背部”と同じ部位。

4. 判定方法

各実験とも、注射後 24 時間に、発赤の大きさの縦と横の径を測定し、その算術平均値をとつた。

実験成績

I 感作動物の選別法の検討

1. 2 濃度による反応差と方向係数との関係

感作モルモット 29 匹の背部左右 4 カ所に、1, 150, 2, 000, 3, 450 および 6, 000 倍液を注射した。この 4 濃度による各モルモットにおける反応値から、方向係数を計算し 2, 000 倍と 6, 000 倍液とによる反応の大きさの差との相関をみると表 1 のごとくである。すなわち、方向係数が 7 以上の値を示すものは、この 2 濃度による反応差が 4 mm 以上のものが大部分であつた。

2. 異なる注射部位における 2 濃度の反応差の比較

次に、同一モルモットの肩部と腹部の左右 2 カ所に 2, 000 倍液と 6, 000 倍液とを注射して、両者の反応差を求め背部におけるそれと比較してみたところ、表 2 のごとくであつた。すなわち、肩部における 2 濃度の反応差は、背部および腹部におけるそれとかなりよく一致していた。とくに肩での差が 4 mm 以上のものは、背および

Table 1. Correlation between the Slope and the Difference of Reaction Sizes by 2 Different Concentrations of 1:2,000 and 1:6,000

Slope b	Difference of the reaction sizes by 1:2,000 and 1:6,000 (mm)						Total
	0	1	2	3	4	5 ≥ 6	
≤ 5.4	1	3	2				6
5.5				2		1	3
6.0			1	1	1		3
6.5			1	1			2
7.0					3		3
7.5					5		5
8.0					2	1	3
8.5					1		1
9.0					1		1
≥ 9.1						1 1	2
Total	1	5	6	13	3	1	29

Table 2-a. Correlation between the Differences of Reaction Sizes Due to 1 : 2,000 and 1 : 6,000 Dilutions on the Back and the Shoulder of the Animal

		Difference on shoulder (mm)						Total
		0	1	2	3	4	5	
Difference on back (mm)	0							
	1	1		1				2
	2			1	3			4
	3				2	1	1	4
	4			1	3	9	2	15
	5				1		1	2
	6						1	1
Total		1	3	9	10	4	1	28

Table 2-b. Correlation between the Differences of Reaction Sizes Due to 1 : 2,000 and 1 : 6,000 Dilutions on the Abdomen and the Shoulder of the Animal

		Difference on shoulder (mm)						Total
		0	1	2	3	4	5	
Difference on abdomen (mm)	0				1			1
	1							
	2	1		1	1			3
	3			2	1	4	1	9
	4			1	3	5	1	10
	5			1		3		4
	6						1	1
Total		1	5	6	12	3	1	28

Fig. 1-a. Convergence of the Reaction Sizes Due to 1 : 1,000 Dilution and Their Mean Square

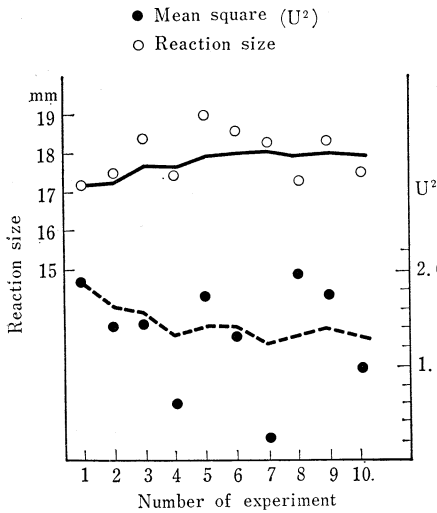
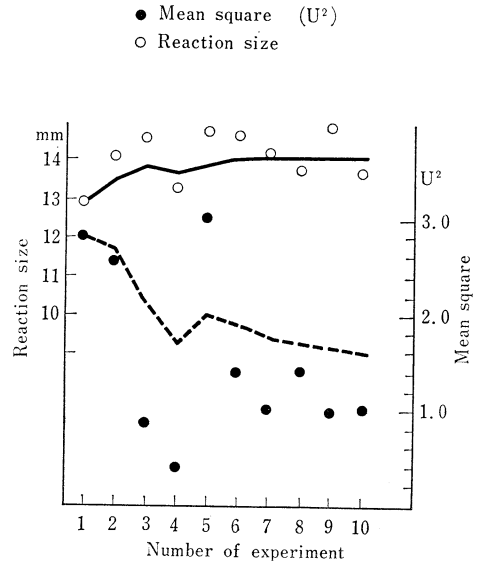


Fig. 1-b. Convergence of the Reaction Sizes Due to 1 : 4,000 Dilution and Their Mean Square



腹部でもほとんどが 4 mm 以上の差であることが示された。

3. 規制条件

一方、三浦⁹⁾などによれば、2,000 倍液による反応値が 15~17 mm の範囲のものが、優れた分離能を有するとされる。さらにわれわれの経験によつても、2,000 倍液による反応値が 14~19 mm のものが分離能において良好である傾向がみられている。

以上の観点から、ツ感受性が一定のものを選ぶためには、2,000 倍液による反応値が 14~19 mm であること、優れた分離能のものを選ぶためには方向係数が 7 以上 (すなわち 2,000 倍と 6,000 倍液とによる反応差が 4 mm 以上) であることを規制条件とすればよいことが見出された。また、肩における両者の反応差は、実際に検定試験に使用する背または腹部における反応差とよ

く一致するから、左右の肩部を用いて 2,000 倍と 6,000 倍液とによる反応を調べたのち、上記の規制条件に合致するものを選別して用いればよいことが分かった。以後の実験でこの条件を満たす動物は、1 回の感作群の約 60~70% を占めていた。

II 各数値の推計学的検討

1. 1,000 倍液と 4,000 倍液とによる反応の大きさとその不偏分散

年間の各時期ごとに感作したモルモットから、実験 I で決めた規制条件により各回 6 匹ずつ選び出し 10 回の実験を行なった。すなわち、全部で 60 匹の背部の左右 3 カ所に、一側には 1,000 倍液を、他側には 4,000 倍液を注射して総計 180 点でそれぞれの反応の大きさおよび両者の差を求め、さらに各実験ごとにそれらの不偏分散を求めた。ついでそれぞれの累積平均値を計算して、そ

Fig. 2-a. Convergence of the Difference of Reaction Sizes Due to 1 : 1,000 and 1 : 4,000 Dilutions and Their Mean Square

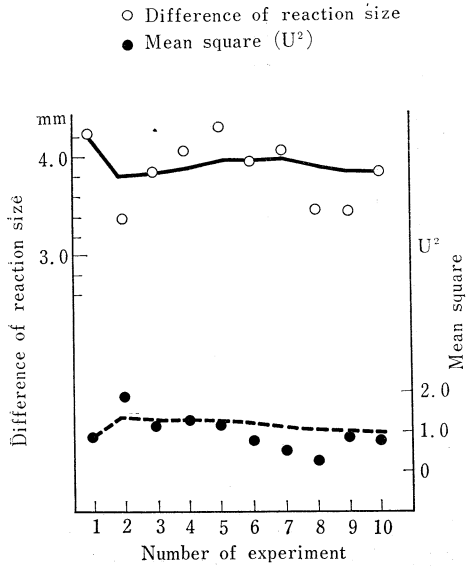
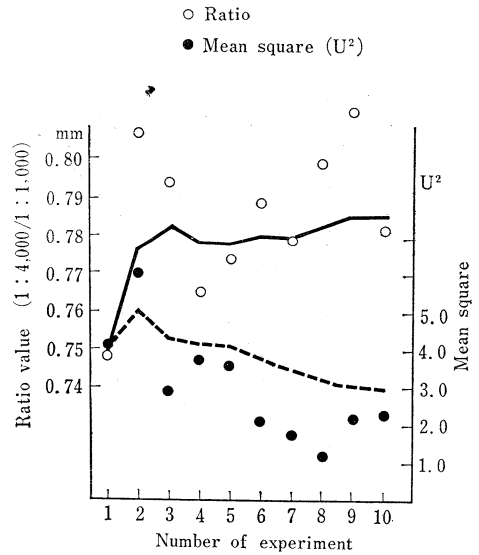


Fig. 2-b. Convergence of the Ratio of the Reaction Sizes Due to 2 Different Dilutions, 1 : 1,000 and 1 : 4,000, and Their Mean Square



の収斂性をみた。

まず図1に示すように、2濃度による反応値は、第3回約50点で、その不偏分散も第5回約90点でほとんど一定の値に収斂した。すなわち第10回で1,000倍および4,000倍液による反応の大きさは、それぞれ17.94 mm および14.09 mm に、またそれらの不偏分散は1.33 および1.60 にそれぞれ収斂した。また図2-aから明らかのように、2濃度による反応差とその不偏分散も、それぞれ3.86 mm と1.01 に収斂した。

同時に、従来の検定方式に準じて2濃度の反応値から、1,000倍液に対する4,000倍液の力価をRatioで求め、さらにその不偏分散を図2-bに表わした。これらの数値が、ばらつきがはなはだしく、収斂しない性質の数値であることが示された。

III 逐次抽出法による新検定法の検討

1. 検定図表の作成

前述の成績から、1,000倍と4,000倍とによる反応差が一定の値に収斂することが示され、両者の差が推計学的に処理してよい数値であることが分かった。

ところで、濃度の対数と反応値との間には、一定の範囲に関して、直線関係のあることが知られている。そこで、1,000倍と4,000倍液は2,000倍液を中心としているので、いま両者の差が約4 mm (3.86) であるから、2,000倍液とそれぞれの差は2 mm と推定してよい。一方使用した動物における力価の分離限界は2,000倍を中心とすると、1,600倍以下2,500倍以上の範囲であるが、これは同じように0.6 mm の差と推定される。しかし、実際に測定可能な大きさの差は1.0 mm 以上であ

る。これは2,800~1,400倍の範囲に相当する。そこで、標準液の反応値との差が1 mm 以内を合格の許容範囲とし、良品が誤つて不合格とされる生産者危険率 $\alpha=0.10$ 、不良品が誤つて合格とされる消費者危険率 $\beta=0.05$ と定め、標準偏差として不偏分散 u^2 の値から χ^2 分布より求めた信頼度0.90の推定値を用い、坂元ら¹²⁾により与えられている方式に準じて逐次抽出法による検定図表を作成した。その計算術式は、三浦の報告¹¹⁾に詳しいので、ここでは簡略に述べる。

まず、標準偏差 σ は次のようにしてその推定値を求めた。

$$\sigma^2 = \frac{nu^2}{\chi^2} = \frac{178 \times 1.01}{154.1733} = 1.1661$$

$$\therefore \sigma \approx 1.08$$

また検査点数 n における棄却域 r_n および採択域 a_n は、次式で与えられる。

$$r_n = h_1 + S \cdot n$$

$$a_n = -h_0 + S \cdot n$$

ここで、

$$h_1 = \frac{\epsilon}{\sigma} (a + \log_e 2)$$

$$h_0 = \frac{\epsilon}{\sigma} (b + \log_e 2)$$

$$S = \frac{\epsilon\sigma}{2}$$

いま $\alpha=0.10$ 、 $\beta=0.05$ 、 $\epsilon\sigma=1.0$ mm と定めてあるので、

$$\epsilon = \frac{\epsilon\sigma}{\sigma} = \frac{1.0}{1.08} = 0.926$$

Fig. 3. Assay Diagram
(Dilutions within the limit of 1 : 2,800 > x > 1 : 1,400 are allowed to pass.
 $\epsilon^\sigma = 1.0, \alpha = 0.10, \beta = 0.05$)

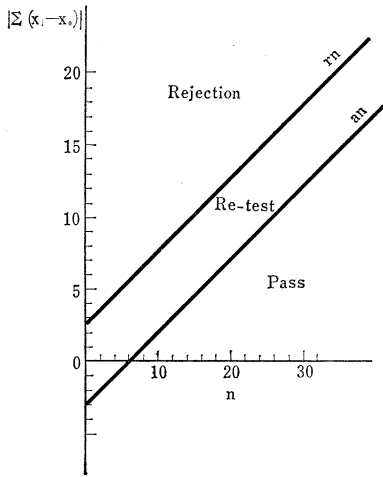


Table 3. Assay Table in the Case Where the Dilution Within the Limit of 1 : 2,800 > x > 1 : 1,400 Are Allowed to Pass (3 injections per one animal)

Number of animals	n	Pass	Re-test	Rejection
3	9	<1.4	1.5~6.8	>6.9
4	12	<2.8	2.9~8.2	>8.3
5	15	<4.3	4.4~9.7	>9.8
6	18	<5.7	5.8~11.1	>11.2
10	30	<11.5	11.6~16.9	>17.0

坂元らの表から、

$$a = 2.251, b = 2.890$$

である。

ゆえに

$$h_1 = \frac{0.926}{1.08} (2.251 + 0.693) = 2.524$$

$$h_0 = \frac{0.926}{1.08} (2.890 + 0.693) = 3.072$$

$$S = \frac{1.0}{2} = 0.5$$

したがって

$$r_n = 2.524 + 0.5n$$

$$a_n = -3.072 + 0.5n$$

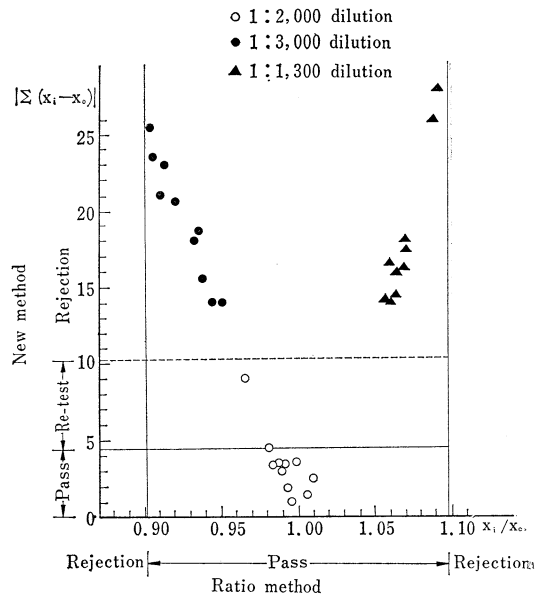
となる。

この式から検定図を描くと、図3となる。縦軸は各点における標準液と被検液との反応の大きさの差の総計の絶対値、横軸は比較した点の数である。この図から1匹に標準液および被検液を各3点ずつ注射して検定する場合の検定表を作ると、表3に示すごとくである。

2. 検定のモデル実験

実験Iで得られた規制条件により選別した感作モルモ

Fig. 4. Model Experiment of the New Tuberculin Potency Test in Comparison with the Ratio Method



ットを5匹ずつ30群計150匹を用いて、前述の検定図表を実際に適用した場合に生産者および消費者危険率が、はじめに設定したように $\alpha = 0.10, \beta = 0.05$ の条件を満たすか否かをみるためのモデル実験を行なった。

生産者危険率 α の検討には、良品として標準液と同じ2,000倍液を、消費者危険率 β の検討には合格許容範囲の1,400~2,800倍から上下にややはずれる1,300倍と3,000倍液とを、それぞれ標準液と10回ずつ比較試験した。各試験ごとに5匹を用い、1匹に標準液と被検液とを各3点注射して計15点で比較判定した。その成績を図4にまとめたが、良品が誤つて不合格とされる確率 α は10回に1回以下 ($\alpha < 0.10$) であり(再試験域の2回の試験は、さらにモルモットの数を増して判定したら合格となつた)、また不良品が誤つて合格とされる確率 β は20回に1回以下 ($\beta < 0.05$) であることが示された。したがって、この検定図表が推計学的に正しいものであることが分かつた。なお、併示したように、現行のRatio法による判定では、用いた濃度のすべてが合格と判定されてしまうことが明らかになつた。

考 察

ツベルクリンの力価試験に用いる感作動物が、一定のツ感受性と優れた分離能とを有するものとして得られるために、いくつかの研究^{9)~10)}がなされた。現行のツ検定基準に記載されている諸条件(感作法、使用時期、ツ感受性の強さ等)は、感作動物の諸条件を詳細に検討した三浦⁹⁾の成績に基づいている。しかし、著者がこの記載にしたがつて用意した感作動物を用いて、三浦¹¹⁾の提

唱した方式によるツッパ試験を行なつたところ、再三の追試にもかかわらず、彼の示す成績と同一の結果が得られなかつた。

そこで、一定のツ感受性の規制のほか、分離能の検査も肝要であると考えて、従来から分離能の検討に用いられてきた範囲の濃度を用いて検討を加えた結果、2,000倍液による反応値が14~19mmで、両者の差が4mm以上を呈するというを、使用動物の選別のための規制条件とすればよいことが分かつた。

ついで、1年を通じていろいろな時期に感作した中から、前述の規制条件で選別した動物において、2,000倍液を中心として、上下に等しい距りの濃度である1,000倍液と4,000倍液とが反応値としてどれだけの差を示すかを調べたうえで、標準液との誤差の許容範囲を決めることにした。同時に、より正確に標準偏差を推定するために、不偏分散も調べた。使用動物数、すなわち比較した点の数は、理論的に必要な数をはるかに凌ぐ60匹180点であつた。その成績は、前記の選別条件によつて得た動物において、2濃度の力価の差が十分推計学的分析の可能な数値として求められることを示し、したがつてその数値は数学的に処理してよいことが分かつた。

次に、合格の許容範囲として、標準液との反応差をどのような値とするかということがもつとも重要な問題である。前述の条件に合致する動物の分離限界は、理論的には2,000倍を中心とすると1,500~2,600倍の範囲であるが、これは0.64mmの差となる。しかし実際に測定する場合には1mm以下の差は計測が不可能であり、必然的に切上げ切捨てが生じて誤差が大きくなり、試験の精度が著しく損われる。かりに1mmの差を呈する濃度以下を許容範囲とすると、計算上1,400~2,800倍となる。これは一見ややゆるやかな感じを与えるが、一方現行のRatio法によれば、2,000倍液による反応が14~19mmの動物を選んで使用するわけだから、上下に1mmの差すなわち14±1~19±1mmの反応はRatio値としては1.07~1.05(または0.93~0.95)となり、ゆうに合格と判定されていたのに比して、新検定法では合否の線上になるわけで、十分に精度が高められていると判断してよい。

以上を勘案して、本文に示した検定図表が得られた。これはモデル実験の結果に示されているように、十分に普遍性を有し、したがつて実用に供しうるものである。すなわち三浦によつて提唱された新検定法は、条件をいつそう規制することにより実用化されたと考えてよからう。これを試験者、動物の飼養法など、条件の異なる別の環境下で、一般的に使用する場合の方法について次に述べる。

まず感作動物の条件、試験を行なう者の技術など諸条件が一定に規制されていることが必須である。そこでま

ず一定条件の感作動物を用い、任意の2濃度のツ液による反応の大きさ、その差およびそれぞれの不偏分散(u^2)を求め、それらの数値が100点以内の検査である値に収斂するか否かを調べる。諸条件がきちんと規制されているならば、必ず収斂するはずである。

次に差の不偏分散の値から標準偏差 σ の推定値を求めることができる。一方、標準液との反応差1mm以内を合格の許容範囲とし、また生産者および消費者危険率をそれぞれ0.10と0.05と規定した。したがつて、検定にさいしての採択域 a_n と棄却域 r_n の算出に必要な諸数値も決めることができる。これらの値を前述の諸式に挿入して、検定図表が得られる。このようにして得られた図表を用いれば、その環境下(すなわち感作動物の条件、術者の個人差などを含む)において妥当な検定がなされるわけである。

次に、このようにして得られた検定図表を用いて、実際に検定を行なう方法を記すと次のようになる。

検定図表作成に用いたのと同一条件の感作動物を使い、背部の左右対称部位に、一方に標準液を他方には検定品を注射する($a_n \geq 0$ であるような n の数が必要である)。24時間後におのおのの反応値を測定し、各点について、標準液による反応の大きさと検定品による反応の大きさとを差を求める。ついで各点での差を総計する。得られた値の絶対値が、比較に用いた点の数 n における a_n より小であれば合格、 r_n より大であれば不合格と判定する。また a_n より大で r_n より小の範囲であれば、さらに逐次 n の数を増して試験を続けると合否の判定が下される。

次に著者が行なつたモデル実験から1例を引用して実

Table 4. An Example of the Assay
($n=15$, Pass)

Animal No.	Reaction sizes by Standard solution (x_0)	Reaction sizes by Tested solution (x_i)	($x_i - x_0$)
1	16.0 mm	17.0 mm	1.0
	16.5	17.5	1.0
	17.0	17.5	0.5
2	17.0	17.0	0
	15.0	16.0	1.0
	16.0	15.0	-1.0
3	19.0	18.0	-1.0
	18.0	18.0	0
	18.5	18.0	-0.5
4	16.0	15.0	-1.0
	15.0	15.0	0
	16.0	16.0	0
5	16.0	15.0	-1.0
	16.5	16.0	-0.5
	17.0	16.5	-0.5

$$|\Sigma(x_i - x_0)| = 2.0$$

例とする。この場合感作動物5匹を用い、 $n=15$ で判定した。この例では $x_i - x_0$ の総計は -2.0 、したがって $|\sum(x_i - x_0)| = 2.0$ で、これは $n=15$ における $a_n = 4.3$ より小であるから合格と判定される。

最後に、この新検定法を人体における試験と比較してみると、動物のほうが条件を一定にしやすく、さらに人体による試験には各種の制約が伴うのに反して、少数の動物で容易に、しかも精度の高い検定がなされる等の利点を有する。ただ人体と動物において反応性の異なるような抗原があつた場合¹³⁾、両者の成績に違いが生ずるという不安もあるが、現行の基準に照らしても明らかになように、ツベルクリンは同一菌株から同一の製法で得られ、しかも一定濃度で診断用に使われるのであるから、おそらく問題はないと考えられる。

結 論

現在行なわれているツ力価検定法の改善を意図して、さきに、三浦は逐次抽出法を導入した新検定法を提唱した。その後、著者はこの新検定法の実用化を期して、一定のツ感受性を有しかつ分離能の優れた感作動物を選別するための条件を検討した。その結果、(1) 2,000 倍液による反応値が 14~19 mm で、2,000 倍と 6,000 倍液による反応差が 4 mm 以上のものを用いることがよいことが分かつた。次に (2) その条件で選別した感作モットを用いて特定の 2 濃度のツ液による皮内反応の大きさとその不偏分散、両反応の差とその不偏分散に関し

て検討を加えたところ、各数値は収斂し推計学的処理が可能であつた。(3) 合格範囲としては、標準液との反応差を 1 mm 以内とすることが妥当と考えられた。次に (4) 生産者および消費者危険率をそれぞれ 10% および 5% とし、前述の数値に基づいて逐次抽出法による検定図表を作成した。さらに (5) 検定のモデル実験を行ない、この新検定法の十分実用に供しうることを認めた。

終りに、御指導御校閲をしてくださつた室橋部長ならびに浅見室長、統計学的な御助言をいただいた興博士(労衛研)に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省：生物学的製剤基準，1964.
- 2) 前田道明，小山寛二郎：胸疾，1：6，1957.
- 3) 松島正規他：小児科臨床，10：13，1957.
- 4) 伊東恒夫，浅見 望：結核，31：74，1956.
- 5) 浅見望，三浦馨，細井正春：同誌，32：73，1956.
- 6) 三浦馨，浅見望：同誌，32：146，1957.
- 7) 三浦馨，浅見望：同誌，32：619，1957.
- 8) 三浦馨：胸疾，4：57，1960.
- 9) 三浦馨：同誌，4：61，1960.
- 10) 三浦馨：同誌，4：66，1960.
- 11) 三浦馨：同誌，4：345，1960.
- 12) 坂元平八他：新しい抜取検査法の理論と実際，産業図書，1951.
- 13) 片岡哲朗，浅見望：結核化学研究グループ第12回総会，1964.