

ツベルクリンの稀釈用溶液について

浅見 望・清水 裕子・室橋 豊穂

国立予防衛生研究所結核部

前田 道明

国立多摩研究所

受付 昭和40年8月4日

DILUTING SOLUTION FOR THE OLD TUBERCULIN*

Nozomu ASAMI, Yuko SHIMIZU, Toyoho MUROHASHI and Michiaki MAEDA

(Received for publication August 4, 1965)

Since 1947 boric acid-borax buffer has been used in Japan as the buffer solution to dilute old tuberculin. However, erythema due to non-specific reaction was noticed not seldom by the use of the tuberculin diluted with this buffer. Then, the comparative studies were conducted on the appearance of non-specific reaction and the preservability of the potency when various kinds of diluting solution were employed.

In these studies the inhabitants of Amami main island were examined, where no tuberculin injection has previously been made. The diluting solutions compared were boric acid-borax buffer, phosphate buffer and physiological saline, and the old tuberculin was diluted by them into 1:2,000, respectively. The resulting dilutions were compared of their potency not only immediately after preparation but also after about 2 years preservation either in a refrigerator or in an incubator.

Results :

1) Erythema due to non-specific reaction appeared obviously more frequently by boric acid-borax buffer than by phosphate buffer. Quite the same trend was observed by the old tuberculins diluted with above mentioned buffer solutions.

2) After 2 years preservation in a refrigerator no decrease was noticed in the potency of both tuberculins diluted with either boric acid-borax buffer or phosphate buffer, while the potency of tuberculin diluted with physiological saline alone decreased markedly. Preservation in an incubator resulted in the decrease of potency of all of the tuberculin solutions prepared with the above mentioned 3 kinds of diluting solutions.

From these results, it became clear that phosphate buffer and physiological saline are preferable to minimise non-specific reaction, and boric acid-borax buffer and phosphate buffer, on the other hand, are preferable to keep the potency of diluted old tuberculin unchanged for a rather long time period.

As the conclusion, phosphate buffer seemed to be most adequate as the diluting solution of old tuberculin.

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

緒 言

わが国では昭和20年ころまで、ツベルクリンの稀釈用溶液として0.5%石炭酸加生理食塩液を用いていたが、昭和24年に新しく診断用ツベルクリンの基準が制定されるに及び、現在使用されている硼酸硼砂緩衝液(Palitsche)が用いられることになった。この制定に先立つて、著者ら¹⁾はそれまで用いられていた生理食塩液とPalitsche液との比較を行なつたところ、ツベルクリン力価保持の点では後者のほうがはるかに勝っていることが分かつた。沢田ら²⁾もこの点について追試を行ない、著者らと同様の結果を得ている。以上の理由ならびに当時はGHQの強い勧めもあつたので、この緩衝液がツベルクリン稀釈用に制定されて、今日にいたつているわけである。

しかし、この緩衝液で稀釈されたツベルクリンを用いると、皮内注射30~60分後局所に非特異反応と思われる発赤が現われる例にときどき遭遇したので、その頻度を確認すべく人体を用いて反応を繰り返し追求したが、当時、対象に選ばれたものの多くはツベルクリンの頻回注射を受けた集団に属していたために、反応が不明確のことが多く、したがって研究の目的を果たすことができなかった。

たまたま、かつて一度も集団検診を受けたことがなく、したがってツベルクリン注射やBCG接種に関してはまったくの処女地と考えられる奄美大島住用村の住民検診を行なう機会に恵まれたので、前記緩衝液をも含めて、ツベルクリン稀釈用溶液に関して非特異反応惹起の程度を比較検討した。さらに、これらの稀釈液を用いて作られたツベルクリンについて約2年間保存した場合、力価に及ぼす影響を及ぼすかをも検討したので、その成績を報告する。

材料および方法

1. ツ稀釈用溶液の種類と処方

a 硼酸硼砂緩衝液

硼 酸	9.94 g
硼 砂	1.70 g
食 塩	2.34 g
5%石炭酸水	100 ml
4%アラビアゴム液	10 ml
水を加えて	1,000 ml とする。

pH 7.0~7.4, 細菌濾過器で無菌, これをB-bufferと略称する。

b 磷酸塩緩衝液

磷酸一水素ナトリウム	15.28 g
磷酸二水素カリウム	1.45 g
食 塩	4.80 g

5%石炭酸水	100 ml
水を加えて	1,000 ml とする。

pH 7.38, 加熱滅菌, これをP-bufferと略称する。

c 生理食塩液

食 塩	8.5 g
5%石炭酸水	100 ml
水を加えて	1,000 ml とする。

NaOHを用いてpH 7.0に修正し, 加熱滅菌, これをS液と略称する。

2. 稀釈ツベルクリン液

a 同一ロットのツ原液を上記3種の稀釈用溶液を用いて2,000倍に稀釈した。それぞれB-bufferツ液, P-bufferツ液およびS-ツ液と略称する。このうちB-bufferツ液を標準液とした。

b 保存に伴う稀釈ツ液の力価の変動をしらべるには, 各種稀釈ツ液を切半し, 半数を氷室(0~5°C)に, 半数をフランキ(37°C)に保存し, 約1年後と2年後との2回に力価を比較した。

3. ツベルクリンの皮内反応の検査

各種稀釈液による非特異反応をしらべるには, かつてツ注射を行なつたことのない奄美大島の全年令を含む住民を対象とした。実験1では4,713名の右前膊にB-bufferツ液を, 左前膊にB-buffer, あるいはP-bufferを注射し, 実験2では1,154名の右前膊にB-bufferツ液を, 左前膊にP-bufferツ液をそれぞれ0.1mlずつ皮内注射し, 48時間後に判定した。長時間保存した稀釈ツ液の力価の比較には, 新潟県下の学童の対象と感作動物とを用い, ツ力価試験法に準じて行なつた。

成 績

1. 各種稀釈用溶液による反応

a. B-buffer

成績は表1のごとくである。B-bufferで発赤5mm以上を呈したものは163名(6.6%), そのうち10mm以上のものは74名(3.0%)で, 比較的多い。発赤10mm以上を呈したもののうち, 男は女より多く, 年令別には10才以上の者に約4~6%認められた。

次にB-bufferツ液との相関をみると, ツ液による反応Ⅱのものから29名(3.8%), Ⅲのものから44名(10.9%)にB-bufferによる反応が認められ, ツ反応の強い者にはこの稀釈用溶液による非特異反応が比較的多く認められている。また, B-bufferの反応の発赤が5mm以上のもので硬結を伴うものは58名(35.6%)の多きにのぼり, これらの硬結触知者はすべてツ反応がⅡないしⅢの強い反応を示す者であつた。

b. P-buffer

成績は表2のごとくである。P-bufferによつて5mm以上の発赤を呈したものは77名(3.4%), そのうち

Table 1. Reaction More Than 5 mm Caused by the Boric Acid-borax Buffer Solution in the Inhabitants of Amami Main Island

	Sex	Number of examinee	Erythema size (mm)					More than 10 mm	
			5~9	10~14	15~19	20~24	25~	Number	%
Sex	Male	1,236	49	19	14	13	7	53	4.3
	Female	1,206	40	11	1	8	1	21	1.7
Age	0~9	781	4						
	10~29	1,011	45	17	8	11	3	39	3.9
	30~49	400	21	7	6	8	4	25	6.3
	50~69	190	14	3	1	2	1	7	3.7
	70~	60	6	3				3	5.0
*Grade of reaction to OT in a dilution of 1:2000	—	811	3						
	±	258	8						
	+	209	5	1				1	0.5
	++	763	49	16	7	4	2	29	3.8
	+++	401	24	13	8	17	6	44	10.9
Total		2,442	89	30	15	21	8	74	
%		100.0	3.7	1.2	0.6	0.9	0.3	3.0	

Note: * — erythema size less than 4 mm.
 ± " between 5 and 9 mm.
 + " more than 10 mm without definite induration.
 ++ " " with measurable induration.
 +++ " " " and double erythema, vesicle on necrosis.

Table 2. Reaction More Than 5 mm Caused by the Phosphate Buffer Solution in the Inhabitants of Amami Main Island

	Sex	Number of examinee	Erythema size (mm)					More than 10 mm	
			5~9	10~14	15~19	20~24	25~	Number	%
Sex	Male	1,019	16	1				1	0.1
	Female	1,252	52	6	1	1		8	0.6
Age	0~9	549	3						
	10~29	583	10	1				1	0.2
	30~49	606	16	1				1	0.2
	50~69	399	24	1				1	0.3
	70~	134	15	4	1	1		6	4.5
Grade of reaction to OT in a dilution of 1:2000	—	810	5						
	±	108	3	1				1	0.9
	+	175	8	2	1	1		4	2.3
	++	773	34	2				2	0.3
	+++	405	18	2				2	0.5
Total		2,271	68	7	1	1		9	
%		100.0	3.0	0.3	0.04	0.04		0.4	

Note: Same as Table 1.

10 mm 以上を呈したものは9名(0.4%)で、B-bufferに比べて著しく少ない。発赤 10 mm 以上を呈した者のうちの大部分が女で、年齢別には70才以上に6名(4.5%)あり、他の年齢層に比してやや多かつた。また B-buffer ツ液による反応と P-buffer による反応との相関

をみると、P-buffer で 10 mm 以上の発赤を呈したものの大部分はツ反応が + 以上の者であつた。なお 5 mm 以上の発赤を呈した者では硬結を伴う者はなかつた。

このように P-buffer では発赤 10 mm 以上を呈する者は B-buffer の約 1/10 であり、非特異反応は明らかに少ないといえよう。

2. B-buffer ツ液と P-buffer ツ液による反応

成績は表3のごとくである。B-buffer ツ液による反応は P-buffer ツ液のそれよりもやや大きく、ことに、一方のツ液で一あるいは土でありながら他方のツ液で+以上の反応を呈した者をしらべると、P-buffer ツ液の28名(2.4%)に対して、B-buffer ツ液では83名(7.2%)で統計学的に明らかに B-buffer ツ液のほうに多い。これに対して、陽性率、硬結触知率などは B-buffer ツ液のほうにやや多かつたが、統計的に有意差は認められなかつた。また発赤平均値にも両者の間に大差はない。

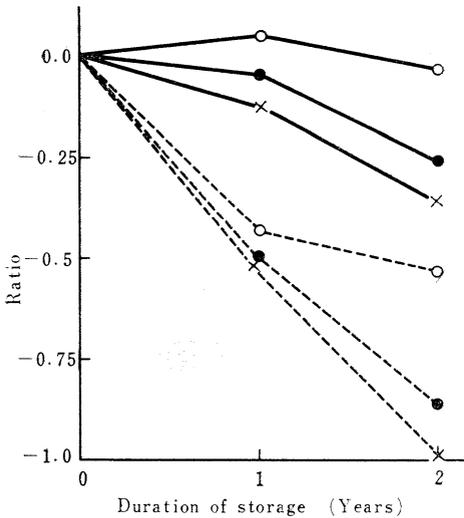
以上の成績からみると、B-buffer は非特異反応のために P-buffer よりもツ反応を修飾して、やや強く表現する傾向があるといえるであろう。

3. 各種稀釈溶液で作られたツ液の力価に及ぼす保存の影響

a 動物試験による力価(Ratio)の変動成績は図1のごとくである。

氷室保存の場合：1年後においては3者の間に大差は

Fig. 3. Effect of the Storage Conditions on the Potency of Old Tuberculins in Different Kinds of Diluent (By sign test method)



Note: Same as Fig. 1.

フランキ保存の場合：1年後3稀釈ツ液のRatioはそれぞれ0.86~0.90, Sign testはそれぞれ-0.44~-0.51を示し、力価の低下はかなり認められた。2年後ではP-bufferツ液の力価の低下は緩やかであったが、他の2稀釈ツ液は直線的に力価が低下した。

総括および考察

ツベルクリンを稀釈する稀釈用溶液による非特異反応に関する報告はほとんどみられない。それは戦前はもっぱら生理食塩液が用いられ、戦後は、GHQの指示によりMichiganの処方基準にとり入れられて硼酸硼砂緩衝液しか用いられなかつたからである。しかし硼酸緩衝液を作るための試薬品には高い純度のものを求めることは困難で、したがって非特異反応を起こさしめる可能性が十分考えられる。そこで基準制定にあたって、著者¹⁾らはこの点を検討するため食塩稀釈ツ液と硼酸稀釈ツ液とによる反応を比較したところ、前者よりも後者のほうがやや大きな反応を呈せしめること、磷酸稀釈ツ液と食塩稀釈ツ液とは製造直後であればほぼ等しい反応を示すことを知った。その後沢田²⁾、武谷³⁾らも同様の結果を報告している。

しかし、もし硼酸稀釈ツ液による大きい反応が非特異反応によるものとすれば、ツ反応を正しく判定する目的には、硼酸稀釈ツ液はツの稀釈用溶液としては適当であるとはいえない。このような非特異反応を生じない溶液に替えるのが当然である。そのため数度、試験を行なったが対象の選定がよくなかつたためか、成績をまとめることができなかつた。すなわち稀釈用溶液による非特異反応を確かめるためには、まず頻回注射を受けたこと

のない者を対象に選ぶことが必要である。そこでかつて注射を受けたことのない住民(奄美大島)を対象としてこの点を調べた。その結果、磷酸稀釈ツ液では非特異反応の出現率が磷酸稀釈ツ液よりも明らかに高かつた。またこれらの稀釈用溶液をもつてツを稀釈した場合においても磷酸稀釈ツ液が磷酸稀釈ツ液よりもやや大きい反応を呈した。これらの成績から食塩溶液および磷酸稀釈ツ液では非特異反応は比較的少ないが、磷酸稀釈ツ液ではやや多く現われることが明らかにされた。

他方、ツの保存による力価の変動について Gottschall⁶⁾は各種稀釈用溶液を用いた結果、磷酸稀釈ツ液によるものもつともよかつたという。著者および沢田らの成績も同様であつた。ただ戸田⁷⁾、熊谷⁸⁾らはこの稀釈用溶液でも1年後には力価の低下を認めている。本報告の成績でも氷室に保存すれば2年後においても磷酸稀釈ツ液および磷酸稀釈ツ液によるツ液の力価の低下は微弱であるが、食塩稀釈ツ液は1年後でも力価は著しく低下することが示される。稀釈用溶液による非特異反応の惹起の程度と保存による力価保持能力との関係をみると、磷酸稀釈ツ液はツの力価の保持にはよいが、非特異反応が起こりやすい。このことはおそらく、試薬中のアラビアゴムのように化学的純品を求めたいものを用いるためと考えられ、ツの稀釈用溶液としては適切でないと思われる。食塩溶液はこれに対し非特異反応を起こさしめることは少ないが、その反面、力価保持能力の点では他の2者に劣りツの稀釈用溶液としては不適当である。もちろん保存期間を問題とせず、稀釈直後に使用するのであれば、食塩溶液を用いてもさしつかえないであろう。これらの点を検討した結果、磷酸稀釈ツ液はツの力価保持能力もよく、同時にまた非特異性反応を惹起せしめることも少なく、試薬の純品なものを入手することも容易であるなどの利点があるので、稀釈用溶液としてはもつとも適当と思われる。

ただ諸外国⁹⁾では磷酸稀釈ツ液に加える防腐剤としてはキノゾールを用いているが、すでに、PPDの保存実験において述べたように¹⁰⁾、キノゾールを添加すると石炭酸添加の場合よりも力価の低下がやや早く、しかも注射時に与える疼痛が強いということを考慮する必要がある。その意味から著者らは、PPDの場合にも石炭酸を用いているが、旧ツ稀釈液の場合にもキノゾールでなく石炭酸を用いるほうがよいと思われる。

結 言

旧ツベルクリンの稀釈用溶液として生理食塩溶液、磷酸緩衝液、硼酸硼砂緩衝液を用い、非特異反応の出現率、保存経過に伴う力価の変動を調べたところ、磷酸緩衝液を用いた場合には非特異反応の出現が少なく、しかも1年以上保存しても力価の低下が少ないことが分かつた。

したがつて、旧ツベルクリンの稀釈用溶液としては磷酸緩衝液を用いるのがよいと思われる。

文 献

- 1) 柳沢 謙・室橋豊穂・前田道明・浅見 望：ツベルクリン反応，金原出版株式会社，1955.
- 2) 沢田哲治・張仲鑣：結核予防会研究業績，2：31，1953.
- 3) 厚生省：生物学製剤基準，1963.
- 4) 沢田哲治・藪 邦彦：厚生科学研究委員会報告，1960.
- 5) 武谷健二：厚生科学研究委員会報告，1960.
- 6) Gottschall, R. & Bunney, W. E.: J. Immunol., 34 : 103, 1938.
- 7) 戸田忠雄・武谷健二・吉田長之：日本臨床結核，9 : 409, 1940.
- 8) 熊谷岱蔵：文部省結核研究委員会報告，1951.
- 9) Jensen, K. A., Bindslow, G., Möller, S., Hansen, A. & Lind, P.: Tubercle, 19 : 386, 1938.
- 10) 細井正春・浅見望：胸部疾患，5 : 1217, 1961.