

PPDs の力価検定法に関する研究

逐次抽出法の確立および人体試験の精度との比較

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 40 年 4 月 7 日

STUDIES ON THE POTENCY ASSAY METHOD OF PPDs*

Settlement of Sequential Test Method and Comparison of the
Accuracy of This Method with the Human Test Method

Tetsuro KATAOKA

(Received for publication April 7, 1965)

In the preceding paper, a new rational assay method of Old Tuberculin employing "sequential test" on sensitized guinea pigs was presented. In the present paper, investigation was made whether sequential test on sensitized animals is applicable also for the potency assay of PPDs. Furthermore, the accuracy of this method was examined in comparison with the test on human subjects.

In animal test, female albino guinea pigs weighing between 350 gr and 450 gr were sensitized with intramuscular injection of paraffin oil suspension of killed and dried tubercle bacilli (Aoyama B strain) in an amount of 0.05 mg in 0.5 ml. Six weeks later, animals were injected intradermally on shoulder with 1:2,000 and 1:6,000 dilutions of OT to select those which fill up the conditions as described in the previous paper.

Nine groups of each 5 sensitized and selected animals were injected with 2 different doses, 0.05 mcg and 0.2 mcg, of PPDs on each 3 points of back of both sides symmetrically. Reaction sizes after 24 hours were measured on 135 points and the differences of the reaction sizes due to these 2 different doses were calculated. And the mean square (u^2) of these sizes and that of their differences was calculated respectively. As these values converged respectively, they can be analyzed statistically.

Then, the requirement of PPDs which is applicable for the practical use was determined as follows: 1) the difference of reaction sizes between the standard dose and that of the sample to be assayed must be within 1 mm, 2) the probabilities of producer's risk and consumer's risk must be 0.10 and 0.05, respectively, 3) the value of standard deviation must be calculated from the mean square of the differences of reaction sizes by using chi-square distribution. Thus, the acceptance number (a_n) and the rejection number (r_n) were determined, and the assay diagram and table were newly established.

From the data obtained, the ability of differentiating the potency of PPDs, in these animals was evaluated and was compared with that of human test. The slope (b) calculated was 12.01, the differentiable limit ($D = \pm t \sqrt{u^2}$) was 1.467, and the differentiating ability ($\frac{\log |D|}{b}$) in these animals was 0.0116.

In human experiment, 5 groups of each 80 schoolchildren who reacted positively to tuberculin were injected intradermally with PPDs on the flexor side of both upper arms.

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

On one side, 0.05 mcg of PPDs was injected, and on the other side, 5 different doses i. e. in Group-I 0.150 mcg, in II 0.087 mcg, in III 0.050 mcg, in IV 0.029 mcg and in V 0.017 mcg of PPDs was injected. Reaction sizes after 48 hours were measured and the differences of reaction sizes and their mean square were calculated. Thus, the ability of differentiating the potency of PPDs in these human subjects was found to be mathematically slightly inferior to that of animal test. The slope (b) was 11.23 and the differentiable limit was 0.0167.

It was concluded that this method of potency assay of PPDs is believed to be very useful with a high accuracy and practicability.

緒 言

さきに著者は旧ツベルクリン（以下旧ツと略す）力価試験に関して、感作動物を用いる推計学的に合理的で精度のきわめて高い力価検定法を確立して報告した¹⁾。この方法は、わが国の旧ツの力価検定に有用なばかりでなく、その原理は今後広く PPDs や各種の形態のツ活性を有する物質をも含めて、ある標準の力価に合わせた dose の決定が必要とされる場合にも応用されうると推察される。

ところでわが国でも最近旧ツに代えて精製ツ (PPDs) を使用しようとする機運が昂まつてきた²⁾が、この逐次抽出法による旧ツの力価の新検定法が、その場合にも応用できるであろうとの予想のもとに PPDs の力価試験にこの原理を用いる検定法の適用を検討し、新たに検定図表を作製した。ここに確立された検定法の精度を、人体による力価試験のそれと比較してみた結果、精度の優れた十分に実用に供しうる方法であることが確認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、前報¹⁾のごとく感作したのち選別したもの*45 匹を用いた。

2. 人体対象 (被検者)

新潟県下の小中学校生徒約 600 名を用いた。

3. 注射試料

予研製の PPDs lot No. 15 を 0.5% フェノール加燐酸緩衝食塩液 (pH 7.38)³⁾ で希釈して次の各濃度の溶液を調製した。

動物実験のためには、0.2 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ および 0.05 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ の 2 濃度、人体試験のためには、対数的に等間

隔の 0.150 μg , 0.087 μg , 0.050 μg , 0.029 μg , および 0.017 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ の 5 濃度を用いた。なお使用 PPDs 溶液は各実験の直前に調製した新しいものを用いた。

4. 注射方法

(a) 動物実験：前報¹⁾に記した背部両側に 3 点ずつ対称に 0.2 μg と 0.05 μg とを 0.1 ml ずつ皮内注射した。

(b) 人体試験：皮内反応に未使用の上膊屈側の一侧には 0.05 μg を他側の対称部に上記 5 濃度のいずれか一つを皮内注射した。

5. 判定方法

動物実験では注射 24 時間後に、人体試験では 48 時間後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 動物実験

1. 各数値の推計学的検討

年間の各時期ごとに感作したモルモットの中から、前報¹⁾に述べた規制条件により各回 5 匹ずつ選び出し、9 回の実験を行なつた。すなわち全部で 45 匹の背部の左右 3 カ所計 135 点で、2 濃度による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。次に各数値の累積平均値を計算してその収斂性をみた。

まず図 1 に示すように、2 濃度による反応値は第 3 回 45 点で、その不偏分散も第 5 回 90 点で、ほとんど一定の値に収斂した。すなわち第 9 回で 0.2 μg および 0.05 μg による反応の大きさは、それぞれ 17.6 mm および 13.7 mm に、またそれらの不偏分散は 0.78 および 0.83 にそれぞれ収斂した。また図 2 から明らかのごとく、2 濃度による反応差とその不偏分散も、それぞれ 3.9 mm および 0.55 とに収斂した。すなわち PPDs の 2 濃度による反応差は推計学的に処理してよい数値であることが示された。

2. 逐次抽出法による検定図表の作製

前報で旧ツの力価検定図表の作製に当たつて、詳細に

* 青山 B 株死菌液 0.05 mg/0.5 ml 浮遊液を後肢筋肉内に注射 6 週後に、肩部において OT 2,000 倍および 6,000 倍希釈液による皮内反応を調べ、2,000 倍液による反応が 14~19 mm の範囲でかつ両者による反応差が 4.0 mm 以上のものを選別して感作 7~8 週の間を使用した。

Fig. 1-a. Convergence of the Reaction Sizes due to PPDs 0.2 μ g and That of Their Mean Square

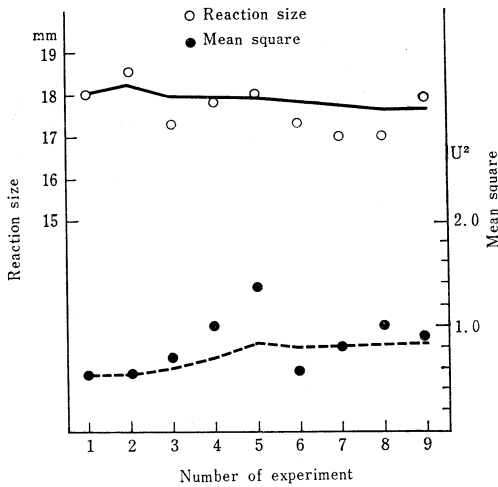
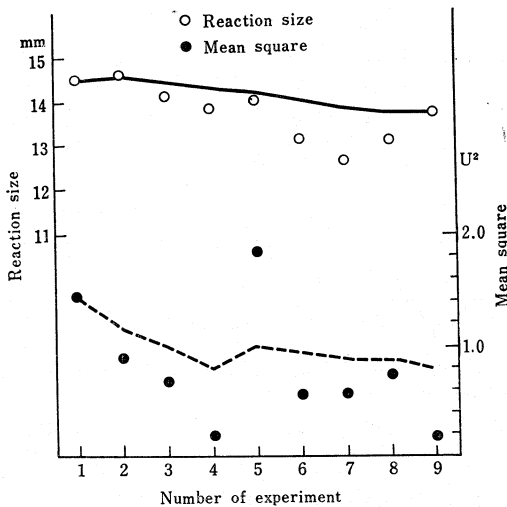


Fig. 1-b. Convergence of the Reaction Sizes due to PPDs 0.05 μ g and That of Their Mean Square



検討を加えたごとく、標準濃度による反応との差が 1 mm 以内の反応を呈する濃度を合格の許容範囲とした。これは 0.2 μ g を中心濃度とすると 0.141~0.286 μ g, 0.05 μ g を中心とすると 0.035~0.071 μ g の範囲に相当して、OT の場合の 2,000 倍液中心に 2,800~1,400 倍の範囲とまったく等しい関係であつた。

また生産者危険率 $\alpha=0.10$, 消費者危険率 $\beta=0.05$ と定め、標準偏差としては不偏分散 $u^2=0.55$ から x^2 分布より求めた信頼度 0.90 の推定値 0.806 を用いた。棄却域および採択域の計算術式は前報¹⁾⁴⁾⁵⁾に詳しいので省略するが、次のような値が得られた。

$$r_n = 4.533 + 0.5 n$$

$$a_n = -5.517 + 0.5 n$$

この式から検定図を描くと図3のごとくなる。縦軸は各点における標準濃度と被検試料とによる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。この図から感作モルモット 1 匹に標準濃度と被検試料を各 3 点ずつ注射して検定する場合の検定表をつくると表 1 のようになる。したがつて 12 点以上あれば検定可能である。

Fig. 2. Convergence of the Difference of Reaction Sizes due to PPDs 0.2 μ g and 0.05 μ g and That of Their Mean Square

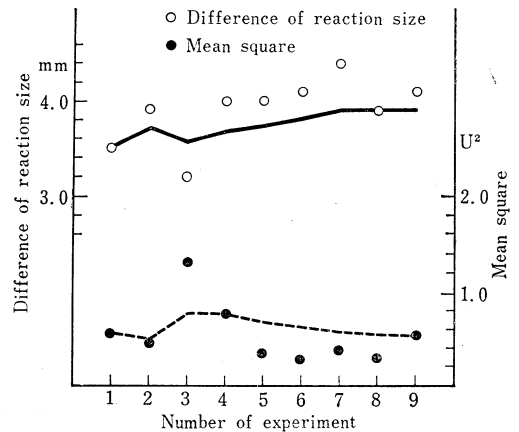
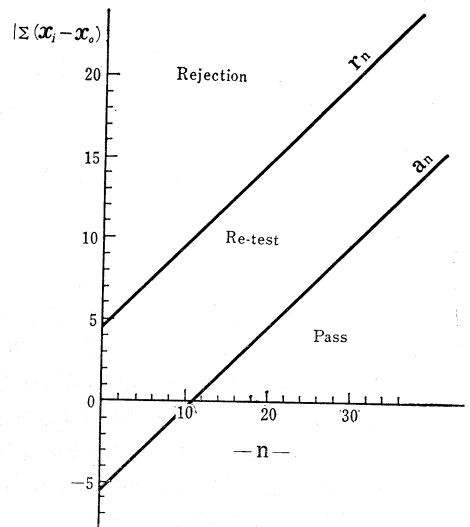


Fig. 3. Assay Diagram for Potency of PPDs

($\sigma=1.0, \alpha=0.10, \beta=0.05$)



3. 使用動物の分離能

次に本研究に用いた十分諸因子の規制された感作動物における分離能を求めた。各動物で 3 点ずつ総計 135 点における 2 濃度による反応の差が求められたので、その不偏分散を算出した。すなわち $u^2=0.5489$ となつた。

Table 1. Assay Table for Potency of PPDs
($\sigma=1.0, \alpha=0.10, \beta=0.05$)
(3 injections per one animal)

Number of animals	n	Pass	Re-test	Rejection
4	12	<0.5	0.5~10.5	<10.5
5	15	<2.0	2.0~12.0	<12.0
6	18	<3.5	3.5~13.5	<13.5
7	21	<5.0	5.0~15.0	<15.0
8	24	<6.5	6.5~16.5	<16.5
9	27	<8.0	8.0~18.0	<18.0
10	30	<9.5	9.5~19.5	<19.5

この値から分離限界が求められる。

$$D = \pm t \sqrt{u^2}$$

いま, $n=135, \alpha=0.05$ で $t=1.98$

ゆえに

$$|D| = 1.98 \times \sqrt{0.5489} = 1.98 \times 0.74086 = 1.4669$$

一方、濃度の対数と反応の大きさの関係、すなわち方向係数 (b) を求めると、

$$b = 12.014$$

従つて、これら動物の力価分離能は、

$$\frac{\log |D|}{b} = \frac{0.1664}{12.014} = 0.01164$$

となつた。すなわちこの動物において判別可能な範囲の濃度は、

0.2 μg を中心とする場合

$$0.301 \pm 0.01164 = 0.31264 \text{ または } 0.28936$$

すなわち $>0.205 \mu\text{g}$ または $<0.195 \mu\text{g}$ となり、

また 0.05 μg を中心とする場合には

$$0.699 \pm 0.01164 = 0.71064 \text{ または } 0.68736$$

すなわち $<0.051 \mu\text{g}$ または $<0.049 \mu\text{g}$ となるわけである。

このように動物試験による力価検定の精度は著しく高いことが示された。

II 人体試験

各群約 120 人から成る 5 群の小・中学生徒の未使用部位である上膊屈側の、一側には 0.05 μg を、他側には、I 群には 0.150 μg 、II 群には 0.087 μg 、III 群には 0.050 μg 、IV 群には 0.029 μg および V 群には 0.017 μg をそれぞれ皮内注射して、両濃度による反応の大きさの差を求めた。各群ごとに 0.05 μg によつて陽性反応を呈したもののうちから、乱数表により at random に 80 名ずつを抽出した成績を表 2 に示した。

この総計 400 点における反応差から、不偏分散を求めると、

$$u^2 = 2.1560 \text{ となつた。}$$

この値から、分離限界を計算すると、

$$|D| = 1.960 \times \sqrt{2.1560} = 1.960 \times 1.468$$

Table 2. Difference of Reaction Sizes due to 0.05 μg PPDs as the Standard and 5 Different Doses of PPDs in Human Subjects

Difference of reaction size (mm)	Group					Total number of subject
	I 0.150 μg	II 0.087 μg	III 0.050 μg	IV 0.029 μg	V 0.017 μg	
-11					1	1
-10					3	3
-9					8	8
-8			1	1	6	8
-7				4	7	11
-6				7	11	18
-5	1	1	2	11	16	31
-4		2	3	14	15	34
-3			3	11	7	21
-2		2	7	9	1	19
-1	3	6	18	11	4	42
0	3	9	10	4	1	27
1	3	10	16	4		33
2	3	11	5	4		23
3	11	10	6			27
4	12	9	7			28
5	7	11	1			19
6	9	4	1			14
7	10	2				12
8	7					7
9	6	2				8
10	3	1				4
11	2					2
Total No. of subject	80	80	80	80	80	400
Mean	+5.04	+2.45	+0.15	-2.99	-5.54	

$$= 2.8773 \text{ (ただし, } t(n=\infty, \alpha=0.05) = 1.960)$$

一方、濃度を対数にとり方向係数を求めると

$$b = 11.234 \text{ となつた。}$$

したがつて、人体試験における分離能は、

$$\frac{\log |D|}{b} = \frac{0.45898}{11.234} = 0.01666 \text{ となる。}$$

この値は、従来われわれの研究室が、前膊屈側で得られたデータで経験しているものより、際立つて優れたものである。すなわちこの人体試験で判別可能な範囲の濃度は、人体の常用 dose である 0.05 μg を中心とするとき

$$0.699 \pm 0.0167 = 0.7157 \text{ または } 0.6823$$

すなわち $>0.052 \mu\text{g}$ または $<0.048 \mu\text{g}$ となる。

これを感作動物における分離能と比較してみると、モルモットでは濃度の増減を 2% まで判別しうが、人体

では4%であるということになり、理論的には、動物試験のほうが、その精度がやや高いことが認められた。

考 察

さき¹⁾に、著者は旧ツの力価検定に関して、厳密な規制条件により選別した一定条件の感作動物を用いることを可能とし、そのような背景のもとに、逐次抽出法を導入して推計学的にも合理的でかつ精度の高い新検定法を確立して報告した。この報告の中で強調したように、感作動物の条件、試験を行なう者の技術など諸因子が一定に規制されることにより、ツ・力価の差は推計学的に処理しうることになった。したがって理論的にはPPDsの検定にも自動的にこの新検定法が適用されうはずである。しかしわれわれの研究室での経験によると²⁾、PPDsはその反応様相において旧ツとやや異なると思われる点があり、また非特異反応の少ないことなども考慮すると、PPDs独自の検定図表の検討が必要である。

かかる観点から本研究では、従来の経験と予備実験の成績に基づいて決定された0.05 μg と0.2 μg の2濃度を用いて、PPDsによる反応の大きさの差およびその不偏分散が、推計学的処理の可能な数値として示されるか否かを検討したが、得られた成績から明らかなように、旧ツの場合と同じく収斂することが認められた。とくに不偏分散は小さく、ばらつきの少ない成績であつたが、これはPPDsによる反応が旧ツによるものよりも、鮮明でかつ非特異性が少ないために、判定がより正確になしえたためと考えられる。これらの数値をもとにして得られた検定図表は、したがって、十分有用性を有している。とくに再試験域が旧ツのものより広くなり、より理想的な検定図表となつている。

この新検定法により、十分精度が高くより合理的な力価検定をなしうることが明らかにされたが、ツベルクリンの主要な使用目的が人体での診断用にあることから、動物における試験のみで検定をなすことを、危ぶむ論議もあるかもしれない。そこで人体を用いてPPDsの力価を調べた成績を、動物試験の成績と比較してみたのが、成績I-3およびIIに示した実験である。人体試験には、同一局所への頻回注射による反応の修飾に留意しなければならないので^{7),8)}従来一度もツ・注射を受けたことのない上膊屈側(未注射部位)を用いて、できるだけ理想的な条件を充たすようにした。実際この群で得られた分離能の値は、従来の注射部位ではまだかつて経験したことのないほど、感度の高いものであつた。それにもかか

わらず、その分離能は動物実験における分離能より、むしろ稍劣るくらいであつた。これがもし現行の検定法のごとく毎年1回注射を受けている前膊部でなされたならば、おそらく人体試験の精度はさらに一そう悪くなつたであろうことは容易に推測しうる。前報でも強調したが、動物のほうが諸条件を規制することにより、容易に諸要因を一定にすることができ、したがってその試験の精度も、人体でとくに理想的と考えられる条件のもとでなされた試験の精度よりも、優るとも劣らないことが示唆された。

結 論

逐次抽出法による旧ツの力価新検定法に準じ、一定条件で感作したモルモットから規制条件を充たすものを選別して、PPDs 2濃度による反応差とその不偏分散に検討を加えた。それらが推計学的に処理しうることが確かめられたので、標準濃度との反応の大きさの差1mm以内を合格範囲とし、生産者および消費者危険率をそれぞれ10%と5%として、前述の数値に基づいて逐次抽出法による検定図表を作製することができた。

次に人体の初回注射部位である上膊屈側を用いて、PPDs 0.05 μg と数濃度とによる反応の大きさの差を求め、人体試験における力価分離能を計算し、前記モルモットによる試験の力価分離能と比較したところ、動物試験の方が、その精度において人体試験より、やや勝ることが示された。将来PPDsが全国的に用いられるようになった場合、その力価検定には、このように感作された動物による新検定法が十分役立つであろう。

終わりに、ご指導ご校閲をして下さつた室橋部長ならびに浅見室長に深謝の意を表します。

文 献

- 1) 片岡哲朗：結核，40：12，1965.
- 2) 第39回日本結核病学会総会シンポジウム II：1964年4月，東京（結核，39：309，1964）.
- 3) Jensen, K. A., et al. : Tubercle, 19 : 385, 1938.
- 4) 坂元平八 他：新しい抜取検査法の理論と実際，産業図書，1951.
- 5) 三浦馨：胸疾，4：345，1960.
- 6) 前田道明 他：結核，33：7，1958.
- 7) 松島正視 他：臨床内科小児科，13：111，1959.
- 8) 岡田博：日本臨牀結核，18：555，1959.
- 9) 高部勝衛 他：結核，39：559，1964.