

## ツベルクリン反応に及ぼす Tween 80 添加の影響

## 1. 感作動物における Tween 80 添加 PPDs による反応

浅見 望・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 8 月 4 日

## EFFECT OF TWEEN 80 ON THE TUBERCULIN REACTION\*

## 1. Tuberculin Reaction in Guinea Pigs Caused by the PPDs Added with Tween 80

Nozomu ASAMI and Tetsuro KATAOKA

(Received for publication August 4, 1965)

PPD solution in world wide use by WHO, RT 23, is added with Tween 80 to protect the drop of its potency. The present study was carried out to know the effect of Tween 80 addition on the tuberculin reaction.

Samples tested were PPDs solution in phosphate buffer and phosphate buffer with or without addition of Tween 80 in a concentration of 0.005%, respectively. The permeability of blood vessels was checked employing Voisin's method. Namely, Evans blue solution was injected intravenously at the destined time intervals from 0 to 48 hours after intradermal injection of the samples, and the size of spot appeared at the site of intradermal injection was measured.

Results: 1) Difference was observed in the effect of Tween 80 according to the difference of lot or the manufacturing date, and the older the Tween 80, the more marked was the modification of the tuberculin reaction.

2) The relative potency of PPDs added with Tween 80 was 3 to 4 times stronger than that without addition of Tween 80, and the reaction caused by the former was remarkably larger than that of the latter. Above mentioned modifying effect was more pronounced in the case where tuberculin reaction was weak.

3) Tween 80 resulted in the obvious increase in the permeability of blood vessels from the start to 30 minutes after the intradermal injection.

From these results the addition of Tween 80 to PPDs seemed to be unfavorable to expect accurate diagnosis of tuberculosis infection by tuberculin.

## 緒 言

精製ツベルクリン (PPD) は、希釈溶液にすれば力価の低下が比較的速やかである<sup>1)2)</sup>。その原因は Waaler<sup>3)</sup> によれば活性因子が容器の硝子面に吸着されるため、分注量が少ないほど力価の低下も顕著であるという。彼らはこの現象を Volume effect と名づけ、この現象を阻止する方法について種々検討を加えた結果<sup>4)</sup>、Tween 80 を添加することによつて力価の低下を予防することができたと報じている。著者ら<sup>5)~8)</sup> もその追試を

行ない、Tween 80 のほかに Triton およびゼラチンにもその作用のあることを認めた。最近、Marks は<sup>18)I</sup> でラベルした PPD を用いて、硝子容器への吸着現象を調べたところ、0.2 mg/ml の濃度では 77% が吸着されるが、これに Tween 80 を添加すると 3% に止まつたと述べている。

これらの研究に基づいて、WHO では 1958 年以降、世界各国に配布する PPD の希釈液に Tween 80 を 0.005% の割合で添加するようにしたが、この Tween 80 を添加した 5 TU (0.1 μg/0.1 ml) PPD 溶液を使用

\* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Tokyo, Japan.

した国々から、従来のものに比し反応が著しく増強され、広く使用することができないとの非難を浴びた。そこで、種々の検討が加えられ<sup>10)</sup>、Tween 80 添加 PPD 1 TU が無添加の PPD の 3 TU にほぼ相当することを明らかにし、現在では Tween 80 加 PPD 1 TU (ごく最近の情報によれば 2 TU) が検診用として、世界各国に配布されている。

以上のごとく PPD 溶液に Tween 80 を添加することは力価の低下を阻止するのに役立つが、その反面、反応自体に強く影響することは、広く検診に用いる場合慎重に考慮されねばならない点である。そこで、Tween 80 添加がツ反応に及ぼす影響を及ぼすかについて実験を行なったのでそれを報告する。

### 実験方法

#### 1. 使用動物

ツベルクリンの基準<sup>11)</sup>に示された方法によつて感作したモルモットと非感作健康モルモットとを用いた。

#### 2. 注射試料および注射量

PPDs は予研製 No. 15 である。その希釈には WHO 方式にならつて 0.01% キノゾール加磷酸塩緩衝液を用い、これに Tween 80 を 0.005% の割に加えたもの (Tw-PPDs と略称)、加えないもの (たんに PPDs と略称) とを調製した。このほか Tween 80 を加えた対照液 (Tw-対照液と略称) と加えないもの (たんに対照液と略称) とを用いた。

注射量は次の量を 0.1 ml 中に含むように希釈した。予備実験では 0.2 μg, 実験 1 では 0.1 μg および 0.005 ~ 0.08 μg, 実験 2 では 0.5 μg である。分注瓶には液を充滿すれば 12 ml となる容量のものを用い、これに試料を充滿したものを full, 1.2 ml 分注したものを 1/10 と

した。いずれも 10°C 前後に 1 夜おいたのち皮内注射した。なお、実験 2 では Tw-対照液と対照液も用いた。

#### 3. 注射および判定方法

予備実験および実験 1 では感作動物 6 匹ずつを用い、その背部に 6 試料をラテン交絡法によつて皮内注射し、24 および 48 時間後における硬結の大きさを測定した。ただし実験 1 の一部では 4~72 時間における発赤と硬結とを調べた。

#### 4. 血管透過性の検査

Voision<sup>12)</sup>の方法を一部変更して用いた。実験動物に Tw-PPDs, PPDs, Tw-対照液および対照液の 4 試料を皮内注射後、直後から任意の各時間ごとに体重 100 g 当り 0.25 ml ずつの 0.5% Evans blue (E. B.) 液を臍静脈から注入し、その後、2, 10, 30 および 60 分ごとに皮内注射部位に現われた青色のスポットの大きさを測定した。皮内注射後 E. B. 液注入までの時間は 0~48 時間である。この間 14 回測定しうるように、3 匹ずつの 5 群を用い、1 群で 3 点が同時に測定されるよう、E. B. 静注前に試料を皮内注射した。

### 実験成績

予備実験: Tween 80 のロット差について

研究室保存の Tween 80 の 4 lot について Volume effect を調べた成績は表 1 のごとくである。PPDs は従来の成績と等しく 1/10 量のものは full に比して、著しく力価の低下がみられた。これに対し、Tw-PPDs は full の場合、PPDs より著しく反応が増大した。また、4 lot の Tween 80 について比較すると、Tw-PPDs 1/10 量による反応は PPDs の full と比較して、Ratio で 1.02~1.18 の幅を示し、Tween 80 の製造年月の古いものほど値の大きい傾向がみられた。4 lot の Tween 80

のうち有効期間内のものは No. 17 のみで、他はすべて有効期間を数年経過していた。しかも No. 14 と 15 とは製造月日がほぼ等しいにもかかわらず、反応上かなりの差異がみられた。すなわち Tween 80 の製造後の日時および lot 差などは反応にかなり著しい影響を及ぼすことが分かる。そこで、以下の実験では No. 17 を用いた。

実験 1: Tween 80 添加の反応に及ぼす影響

a) 反応の経時的変化の比較

成績は図 1 のごとくである。Tw-PPDs は PPDs に比し発赤、硬結とも大きく現われているが、反応の出現時間および消退時間には著しい差異が認められなかつた。

Table 1. Effect of Tween 80 on the Intradermal Tuberculin Reaction

Addition of Tween 80	Amount dispensed in a container	Tween 80*		Tuberculin reaction		
		lot No.	Expiration date	Erythema size (mm)	Ratio**	
					a	b
-	(A) full	—	—	12.5	1.00	0.88
	1/10	—	—	8.6	0.69	0.60
+	(B) full	15	17, Jan. '59	14.2	1.13	1.00
	1/10	14	12, Jan. '59	14.8	1.18	1.02
	1/10	15	17, Jan. '59	13.3	1.07	0.94
	1/10	16	10, Nov. '61	13.5	1.08	0.95
	1/10	17	12, Jan. '63	12.7	1.02	0.90

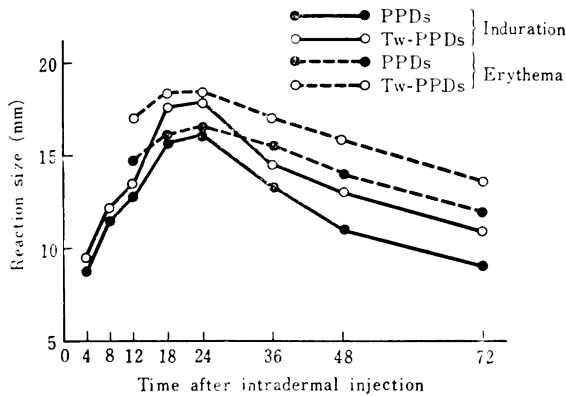
\* Atlas Powder Co. Ltd.

\*\* Ratio a:  $\frac{\text{Erythema size by each sample}}{\text{Erythema size by "full" sample without Tween 80, (A)}}$

Ratio b:  $\frac{\text{Erythema size by each sample}}{\text{Erythema size by "full" sample added with Tween 80, (B)}}$

This experiment was carried out on the 17, Aug. 1962.

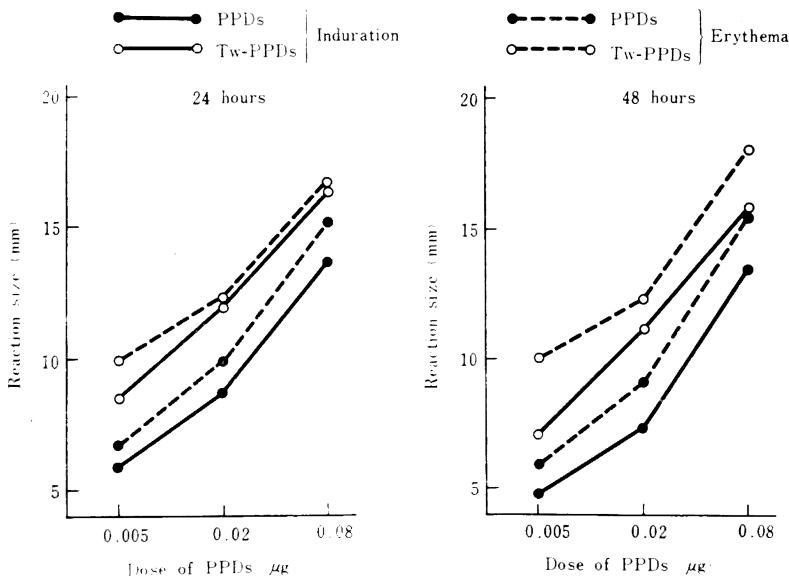
Fig. 1. Time Course Curves of the Reaction Sizes Induced by PPDs with or without Addition of Tween 80



b) 注射量による反応の比較

反応の弱いところを比較するため注射に少量を用いた場合の成績は図2のごとくである。24時間値についてみるに、Tw-PPDsはPPDsに比し反応がかなり大きく現われた。硬結の大きさは注射量の差に対しほぼ直線的で、Tw-PPDsとPPDsともほぼ平行していた。発赤の大きさはPPDsでは硬結とほぼ平行しているが、Tw-PPDsでは0.02および0.08  $\mu\text{g}$ では硬結とほぼ等しいが、0.005  $\mu\text{g}$ では発赤が硬結よりも約1.5 mmも大きかった。48時間値では、一般に、発赤の大きさが硬結の大きさよりも大きくなった。すなわち、Tw-PPDsは反応の弱い場合において発赤の大きさを増大させることが分かる。

Fig. 2. Reaction Size after 24 and 48 Hours of Intradermal Injection of PPDs and Tw-PPDs in Various Concentrations



c) Tw-PPDs と PPDs との力価の比較

図2のごとく、Tw-PPDsによる反応はPPDsよりも数倍増大している。そこでTw-PPDsの相対力価を計算したところ、3,969倍となった。また別にPPDsとTw-PPDsの0.025, 0.05および0.1  $\mu\text{g}$ による反応の差を比較し、Tw-PPDsの相対力価を計算したところ、3,352倍であつた。したがってTween 80添加によつて反応が約3~4倍増大するとみてよからう。

実験 2: 血管透過性について

a) 未感作動物

4試料を皮内注射した直後と1時間後におけるE. B.によるスポットの大きさは図3のごとくである。直後: Tw-PPDsおよびTw-対照液とも2分後に7 mmのスポットが現われ、時間の経過とともに漸次増大し、60分後においてTw-PPDsでは16.5 mm、Tw-対照液では12.2 mmとなつた。その後、このスポットは時間の経過に伴つて境界が不明瞭となつた。これに対して、PPDsおよび対照液では60分後においても約4 mmのスポットしか認められなかつた。1時間後: 4試料ともE. B.静注60分後においても2~3 mmのスポットしか認められず、その後、48時間までの各時間におけるE. B.のスポットの大きさは、終始3~4 mmを示した。したがってTween 80添加の場合、きわめて早期にE. B.スポットが極値を示し、血管の透過性を高めることが分かる。

b) 感作動物

a)と同一方法で実験した、そのうち皮内注射直後、1, 7および24時間後におけるE. B.静注によるスポットの大きさは図4のごとくである。直後のE. B.静注では未感作動物の場合と等しく、Tw-PPDsとTw-対照液を注射した局所にもE. B.のスポットが現われた。しかし1時間後のE. B.静注では4試料とも皮内注射部位にスポットは現われなかつた。7時間後のE. B.静注ではPPDsおよびTw-PPDsを注射した局所にもE. B.のスポットが現われ、24時間後のE. B.静注でも同様にPPDsおよびTw-PPDsの注射局所にもスポットが認められた。すなわち、4試料を皮内注射したのち任意の各時間にE. B.の静注を行なつた場合、皮内注射局所にスポッ

Fig. 3. Appearance of the Evans Blue Spot in Nonsensitized Control Animals at the Sites Injected Intradermally with PPDs and Buffer Solution

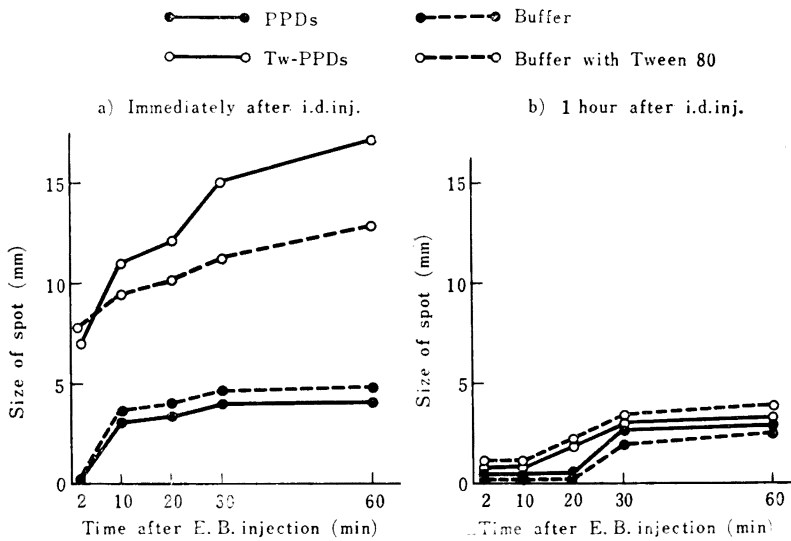
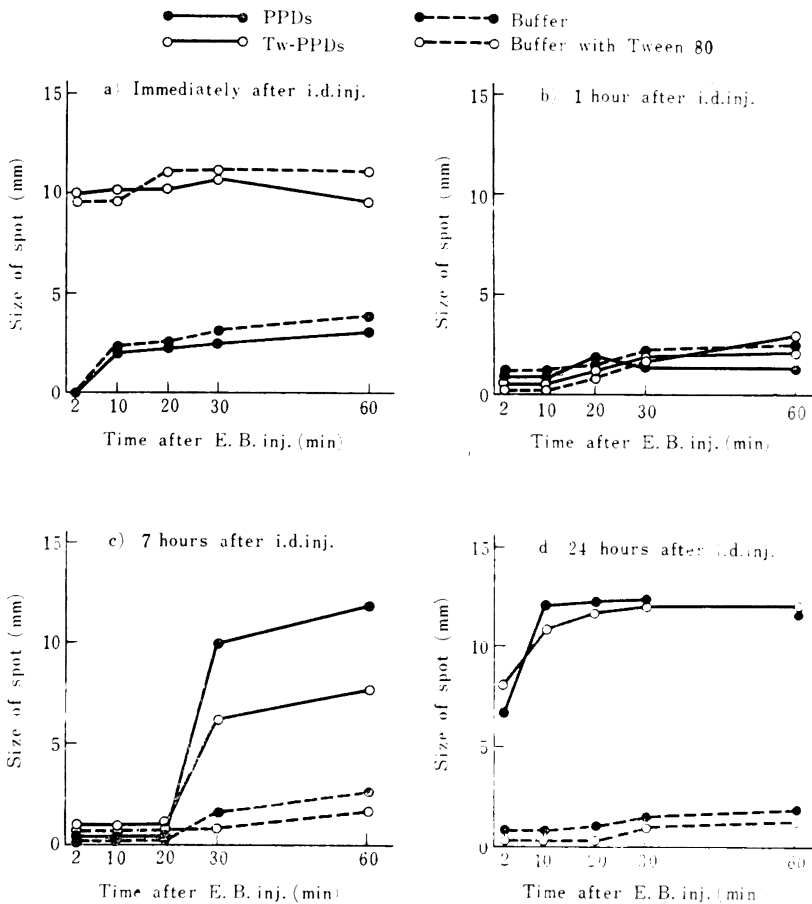


Fig. 4. Appearance of the Evans Blue Spot in Sensitized Animals at the Sites Injected Intradermally with PPDs and Buffer Solution



トの現われたものを時間ごとに追ってみると次のようである。

皮内注射直後では PPDs の有無に関係なく Tween 80 を含む試料 (Tw-PPDs, Tw-対照液) のみに E. B. によるスポットが現われた。ついで皮内注射後 1/2, 1, 3 時間では 4 試料とも E. B. によるスポットが認められなかつた。ところが皮内注射後 5 時間から 36 時間までは Tween 80 の有無に関係なく PPDs を含む試料 (PPDs, Tw-PPDs) のみに E. B. によるスポットが認められた。しかし皮内注射 48 時間後においては 4 試料とも E. B. によるスポットは現われなかつた。

反応の色調をみるに、皮内注射後 18 時間から 36 時間までは、スポットは紫赤色を帯びていた。これは E. B. の青色に局所出血による色調が混合したものと思われる。この場合、ツ反応そのものは 48 時間に最大値を示した。

以上の所見からみて、Tween 80 は血管の透過性を上昇せしめる作用を有するが、その影響は PPDs の皮内注射直後から 30 分くらいまでしか続かないとみてよいであろう。

総括および考察

Tween 80 は製造後日数を経ると脂肪酸を遊離し、細胞に対して毒性を示すことがあるので、5°C 以下に保存し、有効期限内に使用することになっている。森川<sup>19)</sup>はこの点を調べ古くなつた製品では溶血作用が強

いことをみた。本実験においても、製造後の日数が多く経過しているものほど反応が修飾されて、大きく現われる傾向が示された。したがって PPD に Tween 80 を加えた場合にもその有効期限内にツ液を使用しうるようにしなければならない。このように不安定なものを診断用製剤に添加すること自体が好ましくないことであろう。しかも Tween 80 を添加した PPD が添加しない PPD に比べて、反応を増大せしめることを WHO<sup>10)</sup> においても最近認め、一般の検診用には Tw-PPD 1 TU (最近は 2 TU) を用いることにし、この 1 TU が PPD の 3 TU と等力価であると主張している。本実験で検討した成績も、Tw-PPDs の力価は PPDs の 3~4 倍に表現された。とくにこのことが濃度の低い場合に発赤の著しい増大として表現されることは、実際的に重要なことで、反応の弱い場合に反応の判定を誤らせることになる。

そこで Tween 80 添加によるツ反応の増強がおそらくは血管の透過性を上昇させるためではなかろうかと考えて、上述の実験を行なったところ、Tween 80 は皮内注射直後から約 30 分くらいまでにおいて血管の透過性を高めたが、その後には観察しうような影響はみられなかった。しかし組織細胞それ自体になんらかの影響を与えないとはいきれない。横手<sup>14)</sup>はペニシリンの殺菌作用を電子顕微鏡を用いて観察し、界面活性剤の存在はペニシリンが菌への吸着を早めるとともに、菌体の表面構造を変えて菌の酵素作用を阻止するため、少量の薬剤によつて殺菌作用が現われるのであろうといっている。津久間<sup>15)</sup>も結核菌について同様の成績を得ている。このように界面活性剤は菌または細胞に対しかなりの影響を与えるようである。

以上のことから、PPDs に Tween 80 を添加すれば Volume effect を阻止して力価の低下を防ぐことはできるが、その反面、皮内に注射されると抗原の細胞への吸着を促進し、細胞内への透過性を高め、かつ抗原分子の拡散をも起こさしめる等の機作によつて、抗原と抗体の反応性を高め、これが反応の増強として示されるのではないだろうか。要するに、現実的には Tween はあまり安定でなく、しかも、ツ・アの弱い場合に反応を修飾するので、PPD に添加することは好ましいとはいえない。Tween 80 添加 PPD 液は Volume effect を考慮しないでよいという点では実用的であるが、ツ反応自体を正しく惹起することのほうがより本質的な重要条件であることを忘るべきではあるまい。

## 結 言

ツベルクリン反応に及ぼす Tween 80 の影響をみるため、動物を用いて 2, 3 の実験を行なった。

1. Tween 80 は有効期間を過ぎて古くなると、反応に著しい影響を与える。また製品のロット差も考慮しなければならない。

2. Tween 80 を添加した PPDs は、これを添加しない PPDs に比べ、ツベルクリン反応を約 3~4 倍増大せしめる。とくに低濃度 PPDs の場合、Tween 80 添加のものは非添加のものに比べて発赤の大きさを著しく増大せしめた。

3. Evans blue を用いて Tween 80 の血管透過性に及ぼす影響を調べたところ、Tween 80 添加のものは、抗原の皮内注射直後から約 30 分のところまでは、明らかに血管透過性の上昇を来すことが認められた。

これらの成績から、PPD に Tween 80 を添加することは正確な診断を期するためには好ましくないと考えられる。

稿を終るに当たり、ご指導とご校閲をしてくださつた室橋部長に感謝します。

## 文 献

- 1) Magnus, K., Guld, J., Waaler, H. and Magnusson, M.: Bull. Wld Hlth Org., 19: 765, 1958.
- 2) 細井正春: 結核, 32: 622, 1957.
- 3) Waaler, H., Guld, J., Magnus, K. and Magnusson, M.: Bull. Wld Hlth Org., 19: 783, 1958.
- 4) Magnusson, M., Guld, J., Magnus, K. and Waaler, H.: Bull. Wld Hlth Org., 19: 799, 1958.
- 5) 細井正春・浅見望: 胸部疾患, 5: 1217, 1961.
- 6) 細井正春・浅見望・片岡哲朗・岡本裕子: 胸部疾患, 5: 1360, 1961.
- 7) 細井正春・浅見望・岡本裕子・片岡哲朗: 胸部疾患, 5: 1365, 1961.
- 8) 浅見望・片岡哲朗・清水裕子: 胸部疾患, 6: 1554, 1962.
- 9) Marks, J.: Tubercle, 45: 62, 1964.
- 10) WHO: The WHO standard tuberculin test, TB/Techn. guid/3, 1963.
- 11) 厚生省: 生物学的製剤基準, 1964.
- 12) Voisin, G. A. and Touillet, F.: Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity: 373, J. & A. Churchill Ltd. London, 1960.
- 13) 森川正利: 日本薬理学雑誌, 50: 193, 1954.
- 14) 横手孝: 北海道医学雑誌, 29: 873, 1954.
- 15) 津久間俊次: 京大結研紀要, 4: 156, 1956.