

ツベルクリン反応に及ぼす Tween 80 添加の影響

2. 人体における Tween 80 添加 PPDs による反応

浅見 望・水口康雄・片岡哲朗・室橋豊穂

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 40 年 8 月 4 日

EFFECT OF TWEEN 80 ON THE TUBERCULIN REACTION*

2. Tuberculin Reaction in Human Subjects Caused
by PPDs Added with Tween 80

Nozomu ASAMI, Yasuo MIZUGUCHI, Tetsuro KATAOKA and Toyoho MUROHASHI

(Received for publication August 4, 1965)

In the present studies the effect of Tween 80 both on the tuberculin reaction in human subjects and on the protection against the drop of potency by preservation were investigated.

Samples tested were the PPDs solutions in phosphate buffer with or without addition of Tween 80 and the phosphate buffer solution with Tween 80. Human subjects tested were the school children from 6 to 14 years old, to whom these samples were injected intradermally.

Results : 1) Non-specific reaction due to the control, phosphate buffer, solution with Tween 80 appeared in a low percentage as similar degree as the other kinds of control solution.

2) In the same PPDs doses, erythema appeared obviously larger by the PPDs added with Tween 80 than that of without, but the rate of palpable induration was not markedly different between them.

Frequency distribution curves of erythema size according to the various doses of PPDs revealed that by PPDs without Tween 80 the distribution curves shifted to the smaller erythema size proportionally according to the decrease of PPDs doses, whereas by PPDs with Tween 80 such a shift proportional to the dosage was not observed.

3) Marked drop was noticed in the potency of PPDs solution added with Tween 80 after about 2 months' preservation and transportation to a long distance at the temperature of about 20°C to 25°C.

From these results, the addition of Tween 80 to PPDs solution to keep its potency unchanged seemed to be undesirable.

緒 言

既報¹⁾の動物実験において、Tween 80 を添加した PPDs は添加しない PPDs に比し、反応が約 3~4 倍増大され、ことに低濃度を使用した場合、発赤の増大が著しいことを認めた。Wijsmuller²⁾⁻⁴⁾らは、はじめ Tween 80 は硝子壁に吸着されたツベルクリンの反応性物質中、特異性活性因子のみを遊離するため反応が強く現われるのではないかと推察したが、後になつてニューギニアに

において多数の対象を用いて検討を加えた結果、アレルギーの強弱によつて、Tween 80 添加 PPD による反応の現われ方が異なることを報じている。われわれも PPDs による人体の皮内反応に及ぼす Tween 80 添加の影響ならびに Tween 80 添加 PPDs の力価保存に関する実験を行なつたので、その成績を報告する。

研究 方 法

1. 対 象

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

研究1では埼玉県下の学童205名を、研究2および3では新潟県下の学童1,605名を用いた。これらの対象は毎年1回結核の集団検診を実施しているものである。

2. 注射試料

a. PPDs: 標準液としては0.01%キノゾール加磷酸塩緩衝液を用いてPPDs 0.05 μ g/0.1ml液(これを標準液と略称す)を作った。試料としては研究2ではPPDs 0.05, 0.025, 0.0125 μ g/0.1mlのものを、Tween 80の0.005%添加緩衝液と無添加緩衝液とを用いて、それぞれ希釈した(前者をTw-PPDs, 後者をPPDsと略称する)。研究3ではPPDs 0.03 μ g/0.1mlをTween 80添加緩衝液で希釈した。各試料とも10ml分注瓶にfullに分注し、マホウ瓶に入れて現地に運んだ。なお研究3の保存実験に用いたものは、9月下旬東京を出発し、奄美大島に約1カ月間置き、11月初旬再び東京に持帰ったもので、輸送距離は往復約3,000km、保存温度は20~25°C、期間は50日間であった。

b. 対照液: 前記の緩衝液にTween 80を0.005%の割合に添加したものである。

3. 皮内反応検査法

研究1ではツ注射の初回部位として上膊屈側を用いた。他の対象はいずれも反復注射部位である前膊屈側を用いた。注射方法はツ基準に示された方法により、判定は48時間後に行なつた。

研究成績

1. Tween 80 添加対照液による反応

成績は図1のごとくである。反応の度数分布曲線は、対照液のみによる反応および結核未感染 BCG 未接種者における PPDs の非特異反応の曲線とほぼ等しかつた。すなわち対照液に Tween 80 を添加しても皮内反応にはほとんど認むべき影響を及ぼさなかつた。

2. Tw-PPDs と PPDs とによる反応

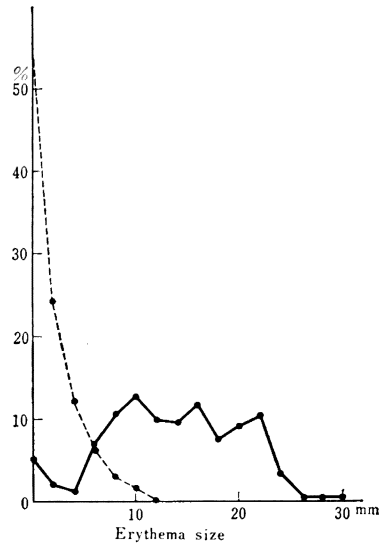
a. 同一濃度液を用いた場合

発赤の度数分布曲線および相関表は図2および表1のごとくである。発赤の度数分布曲線をみるに、Tw-PPDs は PPDs よりも反応の山が大きいほうに移動していた。このために、発赤平均値、発赤比、Sign test なども Tw-PPDs のほうが大きくなつてゐる。しかし硬結触知率には大差がなかつた。また相関表でみても明らかに Tw-PPDs のほうに片寄つてゐた。すなわち、Tween 80 を添加することによつて既報のごとく、発赤の大きさの増大が認められた。

b. 両試料の注射液量を変えた場合

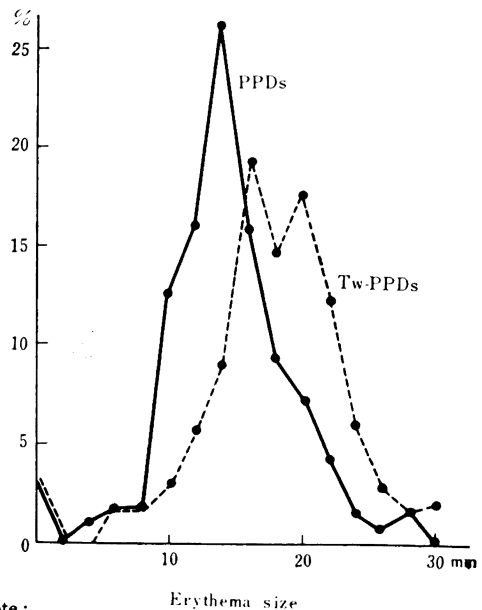
まず発赤の度数分布曲線についてみると図3のごとくである。PPDs においては注射量が減ずるに伴つて、特異反応曲線の山は正規分布のまま、反応の小さいほうに移つてゐた。しかるに Tw-PPDs の 0.05 μ g および 0.025

Fig. 1. Frequency Distribution Curves of the Erythema Size Due to Standard PPDs (0.05 μ g) and Tween 80 Buffer Solution in School Children



Note:
Number tested; 205
Mean size of erythema; 14.1mm(PPDs) 1.7mm(buffer)
Measurable induration; 51.8% (PPDs) 1.5% (buffer)

Fig. 2. Frequency Distribution Curves of the Erythema Size Due to Standard PPDs (0.05 μ g) and Tw-PPDs (0.05 μ g) in School Children



Note:
Number tested; 234
Mean size of erythema; 14.9mm(PPDs) 18.2mm(Tw-PPDs)
Measurable induration; 58.1% (PPDs) 59.0% (Tw-PPDs)
Ratio of erythema to standard; 1.26
Sign test; +0.726

Table 1. Correlation Table of Erythema Size due to Standard PPDs (0.05 μg) and Tw-PPDs (0.05 μg) in School Children

Erythema size (mm)		Tw-PPDs 0.05 μg								
		0	10	20	30					
PPDs 0.05 μg	0	4	1	1	1					
			2							
		1	1	1	1					
	10	1	2	6	4	6	8	2	1	
				7	10	12	3	4	1	
		1	2	3	18	19	11	5	2	1
	20				4	6	8	5	2	1
						1	9	9	3	1
				1	2	7	5	2		
	30					5	1	1	2	1
							1	2	1	1
								1	1	1

μg ともに標準液 (0.05 μg) よりも特異反応の山が反応の大きいほうにやや寄っており、標準液の 1/4 量による反応曲線の山が標準液のそれとほぼ等しかった。しかし 1/2 および 1/4 量では 10mm 以下のところに小さい山がみられた。これを相関表でみると、Tw-PPDs の 1/2 および 1/4 量では 2つの楕円形分布がみられ、18 mm

前後の反応は正中線上においてよく相関していたが、8 mm 前後の反応は標準液側に寄っていた。

次に反応値についてみると表2のごとくである。標準液と各試料液とによる反応の陽性率(発赤 10 mm 以上)の差は、PPDs では濃度が低くなるに従ってその差も大きくなり、その傾向は濃度差にほぼ比例していたが、Tw-PPDs ではその差は比較的小さかった。これに反し、硬結触知率の差は Tw-PPDs のほうが PPDs よりも濃度に対する差が大きく示された。このことは Tween 80 を添加すると発赤は増大するが、硬結は反対に減弱する傾向を示している。また朽葉色を呈する反応や色調の著しくうすい反応も Tw-PPDs のほうに明らかに多くなっていた。

さらに Ratio 値および Sign test 値は図4のごとくである。この両値とも Tw-PPDs が PPDs よりもやや大きな値を示している。また Tw-PPDs の Ratio は 0.0125 μg がその 2倍の 0.025 μg とほぼ等しかった。

このように PPDs に Tween 80 を添加すると濃度差に相応した反応が示されず、反応にかなりの影響を与えることが明らかである。

3. 室温保存の力価に及ぼす影響

新調の標準液と Tw-PPDs の新調品および保存品とによる成績は表3のごとくである。新調品の Ratio, Sign test などはほとんど等しいが、保存品は各反応とも著しく弱くなった。すなわち本実験条件のもとではたとえ

Fig. 3. Frequency Distribution Curve of Erythema Size Due to Various Concentrations of PPDs with or without Addition of Tween 80 (S=standard PPDs 0.05 μg)

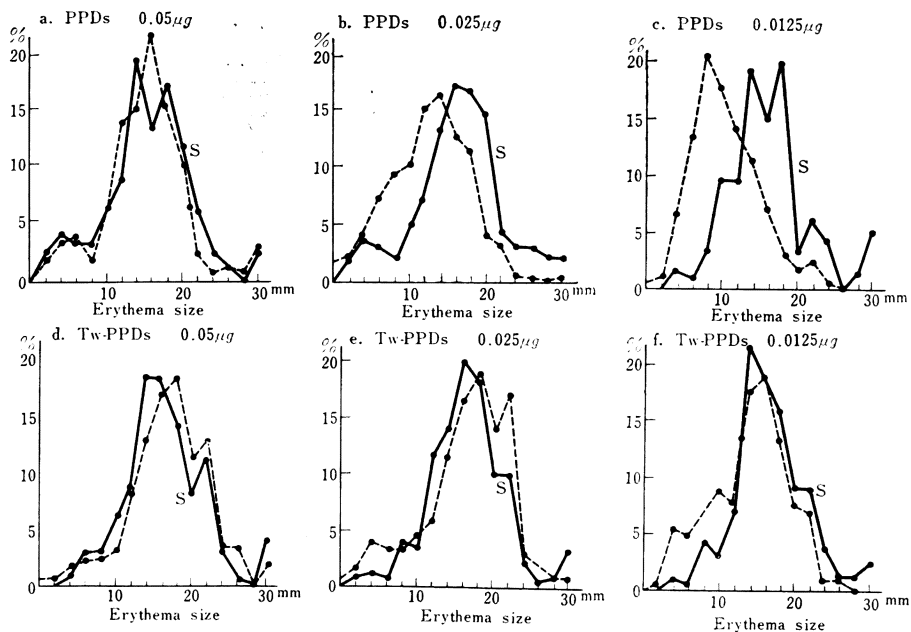


Table 2. Comparison of the Intradermal Reactions in School Children due to Various Amount of PPDs with or without Addition of Tween 80

Exp. group	Nos tested	Kind* and amount (μg) of PPDs injected	Positive rate (%)	Measurable induration (%)	Weak** reaction (%)
1	181	S-PPDs 0.05	87.8	69.1	6.1
		PPDs 0.05	89.5	65.2	3.9
2	187	S-PPDs 0.05	89.3	66.3	10.7
		PPDs 0.025	75.4	49.2	12.8
3	185	S-PPDs 0.05	94.0	64.9	9.2
		PPDs 0.0125	58.4	41.1	8.1
4	177	S-PPDs 0.05	93.8	66.7	13.6
		Tw-PPDs 0.05	92.6	48.0	19.2
5	182	S-PPDs 0.05	90.7	75.3	7.6
		Tw-PPDs 0.025	87.4	35.2	20.3
6	203	S-PPDs 0.05	94.1	65.0	13.8
		Tw-PPDs 0.0125	82.3	22.1	23.0

* S-PPDs : Standard PPDs
 PPDs : PPDs without Tween 80
 Tw-PPDs: PPDs added with Tween 80
 ** Very faint erythema without palpable induration

Fig. 4. Comparison of the Ratio and Sign Test due to Various Amounts of PPDs with or without Addition of Tween 80

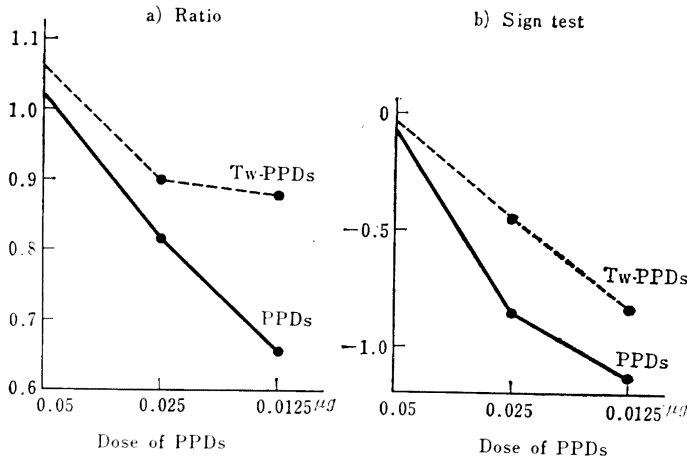


Table 3. Effect of Preservation Period on the Potency of PPDs Solution Added with Tween 80

Preserve period (Month)	Nos tested	Kind* of PPDs	Mean erythema size	Positive rate		Measurable induration		Double erythema		Ratio (T:S)	Sign test (T:S)
				No.	%	No.	%	No.	%		
0	146	S	17.2	139	95.1	76	52.0	6	4.1	1.00	-0.260
		T	16.2	127	87.1	50	34.3	1	0.7		
4	140	S	16.7	129	92.1	57	40.8	5	3.6	0.95	-0.528
		T	14.1	103	73.7	24	17.2	4	2.9		

* S : PPDs 0.05 μg without addition of Tween 80
 T : PPDs 0.03 μg with addition of Tween 80

Tween 80 を添加しても力価の低下を完全には阻止しえないことが示された。

総括および考察

人体における Tween 80 そのものによる非特異反応の有無および抗原性についての研究はほとんど見当たらない。本研究においてツベルクリン初回注射部位を用いて反応を調べたところ、非特異反応は無添加対照液とほとんど同一でとくに問題はないと思われた。Magnusson⁵⁾は動物実験によつて Tween 80 の感作原性のないことを確かめ、ついで RT 23 を Tween 80 の添加あるいは無添加の緩衝液で希釈したものを皮膚科患者51名の左右に皮内注射しておき、5ヵ月後に両試料を再注射したが、感作原性は認められなかったという。しかし Middlebrook⁶⁾ および新島⁷⁾ は血清反応上、Tween 80 単独では感作原性は起こらないが、これを結核菌体と混ぜた場合、感作原性の発現を認めている。したがつて少なくとも血清反応上に影響を及ぼすようなものを、正確な診断を要するツベルクリンに添加することは適当でないと思う。

Wijmsmuller⁴⁾ はニューギニアにおいて Tween 80 添加 PPD 1 TU と無添加 PPD 2.5 TU とを用いたところ、結核患者ではほぼ等しい値が得られたが、ツベルクリン-アレルギーの弱い対象では無添加 PPD が強く現われた。また同一濃度を用いた場合、反応の弱い対象では逆に、Tween 80 添加 PPDs のほうが強く現われた。ここで用いられた対象は BCG 接種を受けない者のものである。その原因について彼は Tween 80 は硝子器へのツ活性因子の吸着を阻止するのではなく、注射

されたツの皮膚内における分散を促進する作用があるのではなかろうかといひ、いずれにしても、このようなものを添加することが有益であるかどうか疑問であると述べている。本研究の対象はほとんど BCG 接種者であるためか、成績は Wijsmuller とは異なり、各対象に対し注射量をかえた場合、発赤についてみれば注射量の少ないときは Tween 80 添加によつて発赤の大きさの減少が比較的少なかったが、硬結は無添加のものよりも明らかに少なかった。

以上述べたごとく、Tween 80 を添加することは、Tween 80 の生体への作用の機作が不明である点から考えても本質的なツベルクリン反応の増強とはいえないと思われる。診断の正確を期するツベルクリンにこのようなものを添加することは望ましくない。

なお、たとえ Tween 80 を添加しても常温で長期輸送するという条件では、製造当初の力価を保存しえないことを忘るべきではない。そこで PPDs の実用化を図るには著者⁸⁾がすでに報じたごとく、媒質剤を添加して凍結乾燥品とし、使用時溶解するようにするのが最良の方法と思われる。

結 言

Tween 80 添加 PPDs および対照液を用い、人体における反応を調べ、さらに力価の保存実験を行なつた。

- 1) Tween 80 添加対照液による非特異反応は著しく少なく、とくに考慮を要しないように思われる。
- 2) 同一量の PPDs を用いた場合、Tween 80 添加 PPDs は無添加のものに比し、発赤は増大したが、硬結触知率には大差が認められなかつた。
- 3) PPDs の注射量を漸減した場合、Tween 80 添加

PPDs は無添加のものに比し、発赤の大きさの減少度は少ないが、硬結触知率の減少度は著しかつた。また反応の著しく弱い者も多く現われた。

4) Tween 80 添加 PPDs を約 3,000 km の輸送を含めて 20~25°C に約 2 カ月保存したところ、力価の著しい低下が認められた。

以上の成績から、PPDs の希釈溶液の力価を保持させるために Tween 80 を添加することは適当でないと思われる。

本研究のため埼玉県集団を提供して下さつた、結核予防会結研 島尾忠男博士、日本 BCG 沢田哲治博士ならびに新潟県下の集団検診に協力して下さつた国立多摩研究所前田道明博士のご好意を深謝します。

文 献

- 1) 浅見望・片岡哲朗：結核，41：7，1966.
- 2) Wijsmuller, G. : Am. Rev. Resp. Dis., 83 : 815, 1962.
- 3) Wijsmuller, G., Magnusson, M. and Larsen, S. O. : Acta Tuberc. et Pneum. Scand., 42 : 79, 1962.
- 4) Wijsmuller, G. : The Royal Netherlands Tuberculosis Association, Selected papers, 6 : 1, 1963.
- 5) Magnusson, M., Guld, J., Magnus, K. and Waaler, H. : Bull. Wld Hlth Org., 19 : 799, 1958.
- 6) Middlebrook, G. and Dubos, R. J. : J. Immunol., 56 : 301, 1947.
- 7) 新島恭樹：結核，35 : 271, 318, 1960.
- 8) 浅見望・片岡哲朗・前田道明・細井正春：日本細菌学雑誌，16 : 1017, 1961.