

原 著

## 個人用 PPD 製品の力価について

徳 永 徹・片 岡 哲 朗  
山 本 三 郎・室 橋 豊 穂

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 50 年 1 月 29 日

## POTENCY OF A NEW TYPE OF PPD PREPARATION FOR SINGLE DOSE

Tohru TOKUNAGA\*, Tetsuro KATAOKA, Saburo YAMAMOTO  
and Toyoho MUROHASHI

(Received for publication January 29, 1975)

Social needs for a single dose preparation of purified protein derivative (PPD) have been increasing year by year in the fields of surveillance for tuberculosis and of cancer immunotherapy. For the purpose of meeting these requests, the authors examined a new type of PPD preparation that was developed recently by the Japan BCG Laboratory and named "PPD Disposable (one dose)".

Potency test was carried out in sensitized guinea pigs and human subjects according to the method described in the Minimum Requirement of Biological Products published by the Ministry of Health and Welfare, Japanese Government in 1973. As shown in Tables 1 and 2 in the text, difference in the potency between the test PPD and the standard PPD was statistically insignificant ( $p=0.01$ ) in both animal and human subjects.

The potencies of 10 lots of the PPD preparations were examined in sensitized guinea pigs comparing with the standard PPD. As shown in Table 3, the difference among them was not significant from each other with  $p=0.01$ . Quantitative analysis on the amount of lactose distributed into the each preparation and lyophilized and on the moisture content of the final products were performed. No significant difference among the values obtained was found.

At 30 and 60 minutes after dissolving the test PPD, potency test was carried out by using sensitized guinea pigs. The results obtained are shown in Table 4, indicating that the decline of the potency was not significant even 60 minutes after the dissolving.

When the procedures of sucking up the buffer solution to dissolve the test PPD were incorrectly or carelessly carried out, the skin reaction sizes reduced than those elicited by the standard PPD.

The aluminum foils sealed hermetically the single dose PPD preparations were intentionally broken and the PPD preparations that became wet within 2 days by absorbing atmospheric moisture were picked up, and potency test of these preparations were carried out by using guinea pigs, and no significant decline of the potency was demonstrated.

The single dose PPD preparation can be used conveniently and effectively in the daily practice, provided that the directions for use are kept correctly.

\* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health 2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

## は じ め に

今日わが国で市販されている診断用の精製ツベルクリン(PPD)には、一般診断用(強反応者用を含む)と確認診断用の別があるが、いずれも約20人あるいは約100人の被験者を対象として作られた製品である<sup>1)</sup>。これらの製品は、一たん溶解すると比較的速やかに力価が減弱するという報告があるため<sup>2)~5)</sup>、溶解後なるべく速やかに使い切り、残部を長期間保存した後に再び使用することのないように指示されている<sup>6)</sup>。したがってこれらは、集団を対象とした検診には便利であるが、日常の臨床において、1人の被験者にツベルクリン反応を実施したいと思つても残部を無駄にするなど不経済に感じられる面もあるため、より少数数の PPD の開発、実用化が各方面から要望されていた<sup>7)8)</sup>。

一方、結核予防審議会の答申に基づく結核予防法の一部改正案が、昭和49年5月4日に国会で成立し、定期的なツベルクリン集団検診は、0~3歳時、小学1年生時および中学2年生時の計3回だけが義務づけられることとなつた。したがって結核感染発見の主要な手だてとして、定期集団検診のほか、きめ細かな定期外健康診断や、診療時のツ反応検査などの比重が増大することとなつた<sup>9)~11)</sup>。このことは、結核診断やBCG免疫の効果持続を知る目的で、個人単位にPPDを使用する機会が将来増加する可能性を示唆しており、個人用PPD製品の有用性は一層増しつつあるものと考えられる。

さらに他方、悪性腫瘍の免疫療法の可能性が近年斯界の注目を集めるようになり、それに伴つて担癌体の免疫応答能をチェックする手だてが追求されるようになった<sup>12)13)</sup>。今日、種々の試験管内検査法とならんで種々の抗原による皮内反応試験が用いられているが、その皮内反応抗原として世界的にもつとも多用されているのはPPDである<sup>12)14)~16)</sup>。この面でもPPDの個人単位の使用の傾向が年ごとに増大しつつある事実を見逃すことができない。

このような個人用PPDに対する社会的需要の高まりを別にしても、生物製剤の一般的形態として、1人1回1容器という形式が望ましいことは論をまたない。しかしPPDの場合、1人1回の使用量が、通常0.05 $\mu\text{g}$ という超微量であつて、それを正確かつ無菌的に分注し、凍結乾燥し、包装して製品化することは、技術的に極めて困難なことと考えられた<sup>7)</sup>。しかし近年、日本BCG研究所のスタッフにより、注射針中に微量のPPDを分注し、それを凍結乾燥する技術が開発され、「PPD ディスポーザブル(1人用)」が試作されるに至つた<sup>17)</sup>。

著者らは、個人用PPDの実用化に対する上述の社会的要望にかんがみ、この試作品に注目し、種々の角度から検討を行つたので、モルモットおよび人を用いて実施

した力価試験の成績を中心に報告する。

## 材 料 と 方 法

1) 使用 PPD: 日本 BCG 製造株式会社で試作された「PPD ディスポーザブル(1人用)」<sup>17)</sup>を用いた。すなわち内部に標準 PPD 0.175  $\mu\text{g}$  に相当する力価をもつ PPD 溶液を分注し凍結乾燥してあるディスポーザブル注射針を、ツベルクリン注射筒に接合し、所定の方法に従つて、添付溶剤を注射筒の目盛の 0.2 ml まで正確にとり、注意深く PPD 溶液を調製した。調製後はなるべく速やかに使用した。対照として本研究所の標準 PPD を用いた。

2) モルモットによる力価試験: 厚生省の生物学的製剤基準の精製ツベルクリン力価試験法に準じて実施した<sup>1)</sup>。モルモットは、体重 350 ないし 400 g の Hartley 系雌(静岡県実験動物農業協同組合、浜松、静岡)を用い、あらかじめ結核菌青山 B 株の加熱死菌体加流動パラフィンを注射した。注射 6 週後に、標準 PPD の 0.2  $\mu\text{g}$  および 0.05  $\mu\text{g}$  を各側の肩部皮内に注射し、24 時間後の硬結が、前者では径 14~19 mm を示し、かつ後者による反応の径がそれより 4 mm 以上小さい動物を選別して、感作モルモットとした。

この感作モルモットの背部一側に、上述のように調製した被検 PPD の 0.1 ml を、一針一点ずつ、各匹 4 点宛皮内注射した。背部他側には標準 PPD の 0.05  $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$  を同様に 4 点注射した。注射 24 時間後のそれぞれの部位の硬結反応の大きさを測定した。反応値はそれぞれの長径と短径の平均値で表し、各対応する部位の標準 PPD の反応値との差をとり、その値の和を試料数で除した値をもつて標準 PPD との差を表し、推計学的処理を行つた。なお標準 PPD の用量反応曲線によると、0.02  $\mu\text{g}$  から 0.4  $\mu\text{g}$  の間は直線性を示すので<sup>1)</sup>、この方法により、被検 PPD の力価を測定することが可能である。

3) 人体における力価試験: 生物学的製剤基準の精製ツベルクリン力価確認試験の要領に準じて実施した<sup>1)</sup>。すなわち第 1 群においては 37 名、第 2 群においては 85 名のツベルクリン反応陽性者を選別し、各被検者の一方の前腕屈側皮内に標準 PPD の 0.1 ml (0.5  $\mu\text{g}$  を含む) を、また他側皮内に被検個人用 PPD の 0.1 ml を注射した。48 時間後の発赤の長短径の平均値をもつて反応値とし、各人についての被検 PPD と標準 PPD の反応値の差の平均値をとつて、推計学的処理を行つた。

その他必要事項は成績中に述べる。

## 成 績 と 考 案

1) モルモットによる力価試験  
同一製造ロット中より無作為に選んだ被検 PPD 試料

を、試験1においては12本、また試験2においては20本用い、定法に従って力価試験を行った。その成績を表1に示した。

被検品と標準 PPD との反応値の差の平均値は、試験1においては  $0.042 \pm 0.917$  mm、試験2においては  $0.225 \pm 0.752$  mm であった。これらの数値について *t* 検定を行った結果、両試験とも危険率 1% で有意差を認めず、したがって被検品は標準品と等力価とみなすことができる。

2) 人体による力価試験

ツベルクリン陽性学童の前腕屈側を用い、一側に標準 PPD の  $0.05 \mu\text{g}$  を他側に被検 PPD の  $0.1 \text{ ml}$  を皮内注射し、48 時間後の発赤反応値を比較した。試験1においては、37名、試験2においては85名の被検者を用い、各人について標準 PPD による反応値と被検 PPD による反応値の差を求め、その平均値を計算して表2に示した。

試験1および試験2において、その値はそれぞれ  $-0.608 \pm 1.458$  mm および  $+0.335 \pm 1.428$  mm であった。*t* 検定により標準品と被検品との力価の間には、危険率 5% では有意差なしとはいえないが、危険率 1% では有意差を認めなかつた。このことは、対象集団の感作の程度にばらつきがあるため、対象数を増せばより精度が上がると考えられる。

Table 1. Potency Test of the Single Dose PPD in Sensitized Guinea Pigs

Test No.	No. of test samples employed	Reaction size (mm)		Difference between S and T (mm ± S. D.)	t-test
		S*	T**		
1	12	15.63	15.67	$0.042 \pm 0.917$	NS*** ( $p=0.01$ )
2	20	15.98	16.20	$0.225 \pm 0.752$	NS ( $p=0.01$ )

\*S: Standard PPD ( $0.05 \mu\text{g}$ )

\*\*T: Test PPD

\*\*\*NS: Not significant

Table 2. Potency Test of the Single Dose PPD in Tuberculin-Positive Human Subjects

Test group	No. of test samples used	Reaction size (mm)		Difference between S and T (mm ± S. D.)	t-test
		S*	T**		
1	37	15.25	14.64	$-0.608 \pm 1.458$	NS*** ( $p=0.01$ )
2	85	15.07	15.41	$+0.335 \pm 1.428$	NS ( $p=0.01$ )
1+2	122	15.12	15.18	$+0.049 \pm 1.557$	NS ( $p=0.01$ )

\*S: Standard PPD ( $0.05 \mu\text{g}$ )

\*\*T: Test PPD

\*\*\*NS: Not significant

両試験の被検者 122 名の全体の反応値について同様の計算を行った場合には、危険率 1% および 5% で共に有意差を認めなかつた。

図にこれら 122 名の 1 人 1 人について、標準 PPD による反応値と被検品による反応値の相関を示した。両者の間には全体として高い相関が認められた。以上の実験成績から、被検 PPD の力価は標準 PPD の力価に等しいものと考えられる。

3) 製造ロットによる力価のばらつきについて

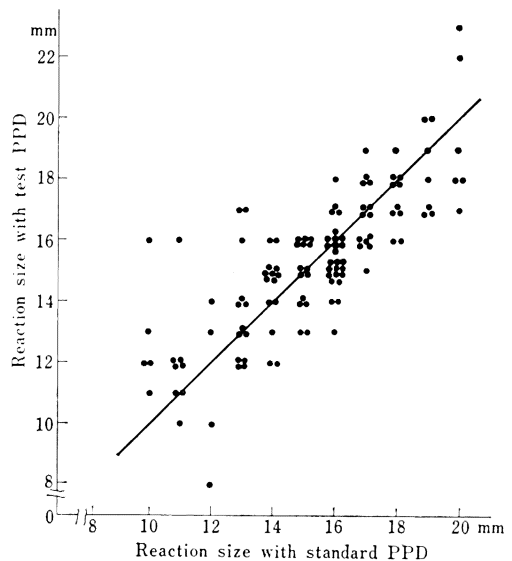
製造ロットによる力価のばらつきの有無を調べるため、表1に示したロットとは異なる計 10 ロットの製品について、その力価をモルモットを用いて試験した。試験方法は前述の通りであり、被検品は各ロットより 20 本宛、無作為的に選んだ。その成績を表3に示した。

これらの数値につき、それぞれ *t* 検定を行った結果、標準品と被検品との力価の間には、すべてのロットについて、1% の危険率で有意差を認めなかつた。

また各ロット間の力価の分散の一様性をテストするため、それぞれの不偏分散 ( $u^2$ ) について Cochran の方法により検定を行った。その結果、各ロット製品の力価の間には分散の一様性が認められた。

なお表3に示した 10 ロットの製品については、本研究所化学部において、生物学的製剤基準に基づく糖含量試験および含湿度試験が行われた。その結果の平均値および標準偏差は、糖含量は  $0.494 \pm 0.030$  mg、含湿度は  $4.0 \pm 0.7\%$  であった。これらの事実は、注射針中に PPD を分注するに当たつてのロット間の誤差、および凍結乾燥条件に関するロット間の誤差が、所定の範囲内に確実

Fig. Correlation between the Reaction Size Elicited with the Standard PPD and the Test PPD in Tuberculin-positive 122 Children



に抑えられていることを示しており、上記の力価試験の成績とよく一致するものと考えられる。

なお、これらの10ロットの製品について、生物学的製剤基準に基づく無菌試験<sup>1)</sup>が本研究所一般検定部において実施され、全く菌の混入を認めず合格と判定された。

Table 3. Potency Test of 10 Different Preparations of Single Dose PPD in Sensitized Guinea Pigs

Lot No.	No. of samples used	Difference between S and T* (mm±S.D.)		Mean Square (u <sup>2</sup> )
		S	T*	
SSP 23	20	-0.05±0.52		0.287
" 24	"	-0.15±0.75		0.582
" 25	"	+0.30±0.73		0.563
" 26	"	+0.03±0.70		0.513
" 27	"	+0.08±0.75		0.586
" 28	"	-0.13±0.82		0.707
" 29	"	+0.20±0.62		0.405
" 30	"	+0.20±0.66		0.458
" 31	"	+0.18±0.76		0.613
" 32	"	+0.15±0.73		0.555

\*S: Standard PPD (0.05 µg)

T: Test PPD

Table 4. Potency Test at Various Time Intervals after Dissolving the Single Dose PPD in Sensitized Guinea Pigs

Time after dissolving (min)	No. of samples tested	Difference between S and T* (mm±S.D.)	t-test
0	12	+0.208±0.782	NS** (p=0.01)
30	12	+0.042±0.532	NS (p=0.01)
60	12	-0.083±0.557	NS (p=0.01)

\*S: Standard PPD (0.05 µg)

T: Test PPD

\*\*NS: Not significant

Table 5. Decline of the Potency of the Single Dose PPD Preparations Dissolved with An incorrect Procedure

Dissolving procedure	No. of samples used	Mean reaction size (mm)		Difference between S and T (mm±S.D.)	t-test
		S*	T*		
Correct	12	15.63	15.67	+0.042±0.917	NS** (p=0.01)
Incorrect***	12	15.20	14.00	-1.208±1.076	Sig** (p=0.01)

\*S: Standard PPD (0.05 µg)

T: Test PPD

\*\*NS: Not significant

Sig: Significant

\*\*\*The single dose PPD preparations were dissolved intentionally with an incorrect technique against the rule. See the details in the text.

#### 4) 溶解調製後の力価低下の可能性について

本製品は個人用であるので、PPDの溶解調製は一般に使用直前に行われるものと考えられる。しかし場合によっては、溶解後若干の時間を置いて使用することもありうると想像されるので、溶解調製後1時間室温に放置して、力価低下の有無を調べた。すなわち被検品36本を用意し、それを12本宛3群に分け、まず第1群を溶解したのち注射筒内に入れたままの状態に室温(約23°C)に無菌的に放置した。次いでその30分後に第2群を溶解し同様に放置し、さらにその30分後に第3群を溶解した。第3群の溶解操作と平行して標準PPDの0.5 µg/ml液を調製した。これら36本の溶解被検品を感作モルモットの背部一侧に0.1 mlずつ3点皮内注射し、その各対側に0.1 mlの上記標準PPDを皮内注射した。48時間後の被検PPDによる硬結反応値と、それぞれに対応する標準PPDの反応値との差の平均値を、表4に示した。表中の放置時間に関しては、試料の溶解や注射などの操作に若干の時間を要したので必ずしも正確ではないが、しかしいずれも3分以上の狂いがないように実施した。

これらの数値に関してt検定を行ったが、危険率1%で相互の間に有意差がなかった。すなわち、一たん溶解後60分以内に使用した場合、モルモットの皮内反応によりテストした限りでは、力価の低下が認められないことが知られた。

ただし著者らの人体での経験によると、小学生1学級分の個人用PPDをあらかじめまとめて溶解調製し、一侧にこのようにして調製したPPDを、他側にその都度溶解調製したPPDを皮内注射した場合、前者による反応は後者による反応に比べ、5%の危険率で有意に小さいことが認められた。この成績は、1学級分のPPDをまとめて溶解調製してから注射するまでの時間が被検者1人1人について一定でないので、力価低下と溶解後の放置時間との関連についてモルモットで示されたような明確な結論を得ることはできなかつたが、しかしこの製

品の場合も、他の市販凍結乾燥 PPD の場合と同様に、溶解後はなるべく早く使用することが望ましく、上述のように多数を溶解調製後プールして集団検診に使用したり、あるいは注射後にその残部を保存し、さらに他の被検者に注射を試みるようなことがあつてはならないことを示唆するものといえよう。

#### 5) 溶解手順を粗雑に行つた場合の力価について

被検 PPD の溶解手順には多少の煩雑さを伴うので、実際問題として溶解手順を定法通りに行わず粗雑に行う場合もありうると考えられる。そのうち最も可能性が高いのは、溶解液を注射筒の 0.2 ml 目盛まで正確に吸い上げる以前に筒内に入つた空気をそのまま押し出す操作を行い、そのため注射針内に残留している PPD 液と一緒に押し出してしまふケースであろう。このような操作が力価に与える影響を調べるため、12本の被検品につき、一たん注射筒の 0.1 ml の目盛まで溶解液を吸い込んだ時点で、(注射針内の溶液を全部注射筒内に移すことなしに)筒内に入つた気泡をそのまま上に向けて勢いよく押し出し、さらに溶解液を吸い込んで 0.2 ml の目盛に合わせるという方法で PPD 液を調製し、その力価をテストした。感作モルモットの背部一側にこのようにして調製した PPD を 1 匹 3 本宛 4 匹に注射し、そのそれぞれの対側に標準 PPD の 0.05  $\mu$ g を注射した。また対照として、所定の方法に従つて注意深く調製した被検 PPD の 12 本を同様に 4 匹の感作モルモットの一側に皮内注射し、対側に標準 PPD を注射した。表 5 に 48 時間後の硬結反応の平均値と、被検 PPD とそれぞれの対側に注射した標準 PPD との反応値とその差を示した。 $t$  検定の結果、所定の手順に従つて注意深く調製した被検品の反応値は、標準 PPD との間に、危険率 1% で有意差がなかつたが、上述のように所定の溶解法によらずに調製した PPD では、有意の力価低下が認められた。この事實は、溶解調製に当たつての手順を定められた通りに注意深く行わなければならないことを示すものである。

#### 6) 外包の損傷により吸湿した PPD の力価について

被検品は密封容器としてアルミ箔を用いており、その密封度に関しては種々の角度からの検討成績が報告されているが<sup>17)</sup>、何らかの事故によりこのアルミ箔が損傷し、内部のプラスチック容器内に収納された注射針内の PPD が吸湿し、そのため力価が低下する可能性も考えられる。そこで外包アルミ箔を故意に損傷し、室内に放置したところ、室内の湿度により差があるが、数日以内に吸湿によつて注射針内に観察される PPD 粉末(実際には溶媒中の乳糖粉末)が、吸湿のため肉眼的に全く認め難くなつたもの、あるいはその形状に著しい変化が生じたものが、かなり多数認められた。そこで室内放置 2 日間後に、吸湿のため肉眼的に粉末を認めえないものを

Table 6. Potency Test of the Single Dose PPD Became Wet with Atmospheric Moisture because of Giving Damage onto Hermetical Seal of the Aluminum Foil

PPD	No. of samples employed	Mean reaction size (mm $\pm$ S.D.)
Complete*	8	16.31 $\pm$ 0.97
Wet 1**	16	16.27 $\pm$ 0.71
Wet 2***	16	16.08 $\pm$ 1.05
Standard	8	16.25 $\pm$ 0.97

\*The single dose PPD preserved in the complete form.

\*\*The single dose PPD the seals of which were damaged and had left at room temperature for 2 days; the form of the lyophilized powder within the needles had been changed by moisturing.

\*\*\*The same PPD described above; no lyophilized powder within the needles had been observable because of wetting.

16 本、また肉眼的に形状に著しい変化が認められたものを 16 本選び、前者を 2 群、後者を 1 群とした。ほかに標準 PPD および外包が完全で内容に肉眼的な変化がない個人用 PPD 製品の溶解調製直後のもの 8 本を用意し、対照とした。これらの試料をラテン方格に従い、感作モルモットに注射し、24 時間後の反応を計測した。その成績を表 6 に示した。

各群の数値には、分散の一様性があり、平均値に関して F 検定を行つた結果、各群間に有意差がなかつた。すなわち、上述の条件で故意に吸湿せしめた PPD 製品においても、力価が一定に保たれていることが知られた。ただし、この実験条件においては、吸湿は外包損傷 2 日以内に起こつたものであり、吸湿後さらに長期間経過した場合の PPD の力価に関しては、この成績からは不明である。後者の場合には変性による力価低下や、あるいは汚染の可能性も考えられる。したがつて上述の成績にもかかわらず、アルミ箔損傷製品ないし、上記 1, 2 群のような肉眼的変化を認めた製品は使用しない方がよいと考えられる。

なおアルミ箔包装による保存性に関しては、経験が必ずしも多くないので、さらにそのアルミ箔を収納する外包の容器の工夫や、製造後製品使用までの過程を含む長期保存の検討が必要と考えられる。また実用化に当たつては、暫定的に有効期限を比較的短期間に区切るなどの配慮をするべきであろう。

## 結 論

個人用 PPD 製品の实用化に対する社会的要望にかんがみ、「PPD ディスポーザブル(1人用)」(日本 BCG 研究所試作)について、力価を中心とする検討を行つた。

モルモットおよび人体を用いて力価検定を行つた結

果、標準 PPD との間に力価の有意差を認めなかつた。

時期を異にして製造された 10 ロットの製品につき、力価を主とする検定を行つたが、ロット間に有意差を認めなかつた。

PPD を溶解調製後、皮内注射までに 60 分間を経過した場合でも、力価の有意の低下が認められないことが、モルモットによる実験で示された。しかし人体による経験では、PPD の溶解調製は使用直前に行うのが望ましい。

PPD の溶解調製の手順を故意に粗雑に行つた実験では、反応値の明らかな低下が見られ、溶解手順は使用書に従つて定法通り注意深く行う必要性が示された。

故意に外包装を損傷せしめ、吸湿状態にした製品につき、モルモットによる力価試験を行つたところ、吸湿後の時間経過が短い場合には、力価の低下を認めなかつた。しかし実際にはこのような状態の製品を使用することは好ましくないと考えられる。

#### 謝 辞

太田洋子、佐原チヅ子、竹川真理子技官の技術的援助に感謝する。

#### 文 献

- 1) 厚生省薬務局監修：生物学的製剤基準解説，細菌製剤協会：105, 1973.
- 2) 浅見望・片岡哲朗：結核，44：423, 1969.
- 3) 浅見望：日本医事新報，No. 2335：107, 1969.
- 4) 高井鏞二・森亨・石川信克：結核，44：425, 1969.
- 5) 豊原希一・折居昌志：結核，47：17, 1972.
- 6) 厚生省結核予防課編：精製ツベルクリン使用の手びき，財団法人結核予防会，1968.
- 7) 室橋豊穂：日本医事新報，No. 2373：32, 1969.
- 8) 厚生省薬務局細菌製剤課：日本医事新報，No. 2334：138, 1969.
- 9) 結核予防審議会：結核健康診断および予防接種の実施方法について（答申），1973.
- 10) 島尾忠男：バイオテック，3：830, 1972.
- 11) 島尾忠男：MEDICO，5：1829, 1974.
- 12) 徳永徹：日本医事新報：No. 2609, 43, 1974.
- 13) 徳永徹・片岡哲朗・中村玲子・山本三郎・室橋豊穂：医学のあゆみ。
- 14) Steward, A. M. et al.: J. Natl. Cancer Inst., 50：625, 1973.
- 15) Lamb, D. et al.: J. Immunol., 89：555, 1962.
- 16) 折田薫三：臨床科学，10：268, 1974.
- 17) 成沢省三・沢田哲治・川崎二郎 他：結核，50：115, 1975.