

原 著

PPD の定量およびガラスへの吸着についての検討

新 沼 佐代子 ・ 河 尻 克 秀 ・ 戸 井 田 一 郎

日 本 B C G 研 究 所

受 付 平 成 7 年 8 月 3 日

受 理 平 成 7 年 9 月 20 日

STUDIES ON THE METHOD TO QUANTIFY PPD AND
ITS ADSORPTION ONTO GLASS-SURFACESayoko NIINUMA^{*}, Katsuhide KAWAJIRI
and Ichiro TOIDA

(Received 3 August 1995/Accepted 20 September 1995)

The potency of PPD is very stable when kept as a lyophilized preparation or as a solution of high concentrations, but, as is well known, when diluted to the practical concentrations such as used in skin-testing for human, its potency diminishes rather rapidly. It has been considered that such decrease in potency is not due to denaturation of PPD, but due to its adsorption onto the surface of glass- or plastic-container. The adsorption of PPD had been studied by several authors with radiolabeled PPD or by the potency test in experimental animals or human. However, either method is not satisfactory because they are not quantitative and not reproducible.

Consequently, we developed a new method basing on ELISA to measure such low concentrations of PPD as used in skin-testing in human. Using this new method, we analyzed the adsorption of PPD onto glass-surface. The major characteristics of the PPD adsorption revealed by the present studies are as follows ; (1) The adsorption of PPD takes place very rapidly immediately after the distribution of PPD solution to a new container and then proceeds in slower rates. (2) The rate of adsorption is influenced by both temperature and concentration of PPD solution. The rates of adsorption are almost the same at -80°C and at 6°C , much higher at 22°C and further higher at 37°C at any concentration tested. At -80°C and 6°C , there is no difference among the adsorption rates at three different concentrations, but at 22°C and 37°C , the rate of adsorption at the lowest concentration ($0.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$) is much higher than those at higher concentrations. (3) The amounts of PPD adsorbed are determined by the surface area of glass in contact with PPD solution. (4) The larger the volume of PPD solution distributed, the bigger the absolute amount of PPD adsorbed, but the smaller the rate of adsorption. (5) So-called "volume effects" are evidenced.

Commercially available Japanese PPD preparations have been produced and adjusted their potency taking such adsorption phenomena into consideration. But, if undue adsorp-

* From the Japan BCG Laboratory, 3-1-5 Matsuyama, Kiyose City, Tokyo 204 Japan.

tion is induced by inappropriate handling and/or usage, the potency might be diminished. Especially, the single-dose preparation may be affected most strongly by so-called "volume-effects". Standard handling and usage recommended by the manufacturer are strictly required.

Key words : PPD (Purified Protein Derivative), Adsorption, ELISA, Potency testing, Volume effect

キーワード : PPD, 吸着, ELISA, 力価試験, 容積効果

はじめに

精製ツベルクリン (PPD) の凍結乾燥品あるいはその濃厚溶液の力価は非常に安定であるが、希釈された低濃度溶液では、その力価が急速に低下することが知られている。この原因は、PPD 自体の変性によるものではなく PPD が容器の内壁に吸着され、溶液中の PPD 量が減少するためであると考えられている¹⁾。

これまで、PPD の吸着現象について ¹⁴C や ¹³¹I などのラジオアイソトープ (RI) で標識した PPD を用いた定量実験や、動物あるいは直接ヒトを対象に行なった皮内反応によって検討した報告がいくつかある²⁾⁻⁵⁾。しかし、RI を取り扱うにあたってわが国では使用上の規則が多く特別な施設を必要とし、通常の実験室で行える方法ではない。また皮内反応による方法では力価の強弱は確認できるが、その程度を定量的に算出することは困難である。そこでわれわれは、ELISA 法を基にした簡単な PPD の定量法について検討を行い、さらにその方法を用いて PPD のガラスバイアルへの吸着について種々の検討を行った。

材料および方法

[試薬]

抗原 ; CIP (試験管内検査用 PPD 抗原, 日本ビーシー製造社製)

溶解液 ; 精製ツベルクリン用溶解液 (注射用蒸留水 10 ml 中に, Na₂HPO₄ 152.8 mg, KH₂PO₄ 14.5 mg, NaCl 48.0 mg, phenol 50.0 mg を含む, 日本ビーシー製造社製)。アンプルをカットした際にガラス片が液内に混入する場合がありますので 5 μm のフィルターで濾過してから使用した。

酵素標識 2 次抗体 ; Anti-human IgG (Fc piece specific) Alkaline phosphatase Conjugate (Atlantic 社製)

ホスファターゼ基質溶液 ; p-Nitrophenyl phosphate (SIGMA 社製), 使用直前に DEA buffer で 1 mg/

ml に調製した。

1% ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液 ; フラクシオン V (和光純薬社製), Tween-PBS buffer で 1% に調製した。

Tween-PBS buffer ; KH₂PO₄ 13.6 g, NaCl 86.5 g, Na₂CO₃ 2.0 g および Tween 20 5.0 ml を精製水に溶かし全量 1 l とした。5N-NaOH で pH 7.0 に調整し、10 倍希釈して使用した。

BSA-PBS buffer ; KH₂PO₄ 13.6 g, NaCl 86.5 g, Na₂CO₃ 2.0 g および BSA 10.0 g を精製水に溶かし全量 1 l とした。5N-NaOH で pH 7.0 に調整し、10 倍希釈して使用した。

DEA buffer ; Diethanolamine (DEA) 9.6 ml および MgCl₂ · 6H₂O 0.203 g を精製水に溶かし全量 1 l とし、5N-HCl で pH 9.8 に調整した。調製後は 4°C で保存した。

酵素反応停止液 ; 1.5N-NaOH 溶液

ガラスバイアル ; φ16×33 mm および φ16×85 mm ガラスバイアル (ニッショー社製)

[機器]

Microplate ; 96 well, ELISA 用 immunoplate (Nunc 社製)。POLYSORP (中結合能タイプ, 約 100 ng/cm² IgG) および MAXISORP (高結合能タイプ, 約 400 ng/cm² IgG)

Microplate Reader ; Microplate Reader MPR A4 (TOSOH 社製)

[方法]

1. ELISA 法による PPD の定量

使用する血清は、PPD 陽性である健康人の血清数検体について抗 PPD-IgG 抗体価を測定し、その中でも抗体価の高いヒトの血清を採取、小分けして凍結保存し、すべての実験について同一人の血清を用いることにした (測定用血清)。標識抗体にはアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いた。

Nunc 社製のマイクロプレートには MAXISORP と POLYSORP の 2 種類あり、固相化に用いる試料によっ

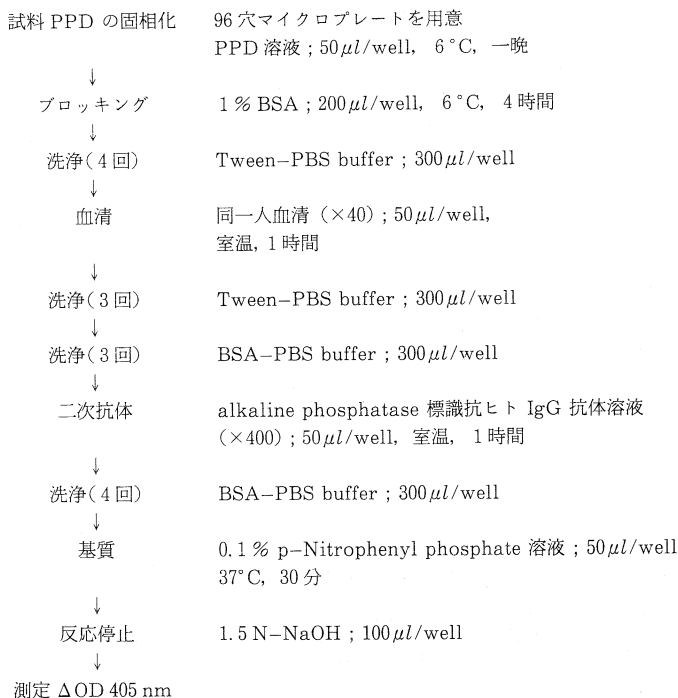


図1 PPD-ELISA の手順

て固相化する程度が異なっている。今回その両方を用いて PPD にはどちらが適しているのか比較した。

試験管内検査用 PPD 抗原を溶解液で 50 μ g/ml に調整し、さらに、0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 および 1.0 μ g/ml に調製した。2 種のマイクロプレートを用い、各濃度の PPD 溶液を 1 well につき 50 μ l ずつ分注した。プレート毎に Back Ground として、溶解液を 50 μ l ずつ分注し、6 °C で一晩放置して固相化した。次に、1 % BSA を 200 μ l/well 加えて、6 °C で 4 時間放置してブロッキングを行った。ブロッキング終了後、Tween-PBS buffer で 4 回洗浄して過剰の BSA を除いた。血清を Tween-PBS buffer で 40, 80, 160 および 320 倍に希釈してそれぞれ 50 μ l/well 分注し、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS buffer で 3 回、続けて BSA-PBS buffer で 3 回洗浄した。

標識抗体を BSA-PBS buffer で 400, 2,000 および 4,000 倍に希釈し、それぞれ 50 μ l/well 分注し室温で 1 時間反応させた。BSA-PBS buffer で 4 回洗浄して過剰の標識抗体を除いた後、基質溶液を 50 μ l/well 分注し、37 °C で 30 分放置して発色させた。反応停止液を 100 μ l ずつ加えてよく振盪した。プレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定し、横軸に PPD 濃度、縦軸に Back Ground の OD 値を引いた Δ OD 値をとって各

希釈毎にグラフを作成した。ELISA 法の手順を図 1 に示す。

2. 種々の条件による PPD 量の変化

試験管内検査用 PPD 抗原を溶解液で 50 μ g/ml に調製し、さらに必要濃度に調製した。それをガラスバイアルに分注し、種々の条件下においたものを試料として、マイクロプレートに固相化し、以下図 1 に従って ELISA を行い Δ OD 値を求めた。試料溶液中の PPD 濃度は、同時に測定した既知濃度の PPD による検量線から算出した。バイアルに分注する前の PPD 溶液についても同様に算出し、分注前後での差を求めた。また、プレートによる変動を除くため、検量線はプレート毎に作成して PPD 量を算出した。

結 果

1. PPD 定量のための ELISA 法の条件検討

ELISA に用いるマイクロプレートとしては、POLY SORP の方が MAXISORP よりも PPD の固相化に適していること、また測定用血清および標識抗体の濃度を検討しそれぞれ 40 倍および 400 倍希釈が最適であり、この条件下で PPD 濃度 0.0625~1.0 μ g/ml の範囲で PPD 濃度と Δ OD との間に直線関係が成立することが確認された (図 2)。したがって、以上の条件で ELI

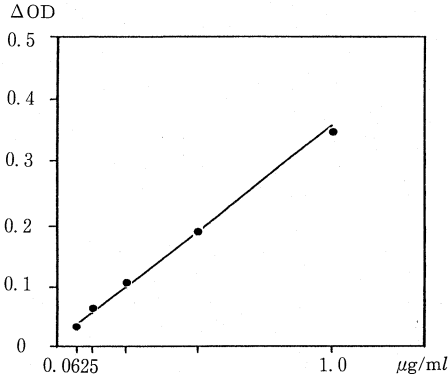


図2 PPD 濃度とΔOD 値の関係

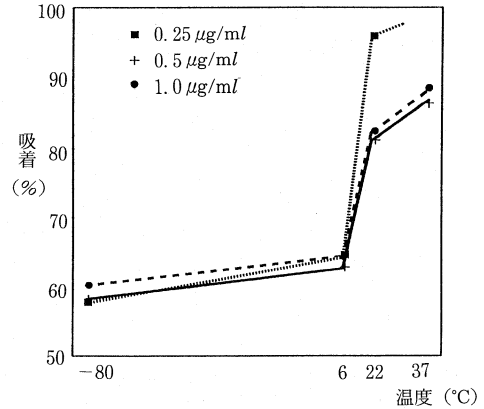


図4 温度と吸着の関係

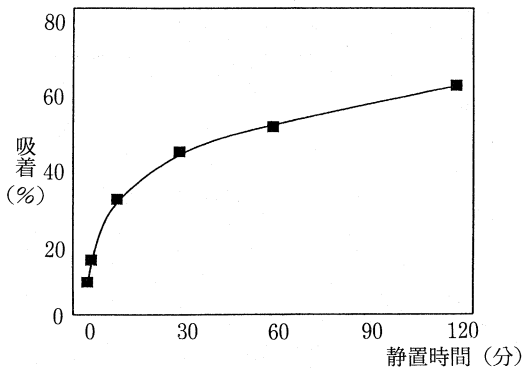


図3 吸着の経時変化

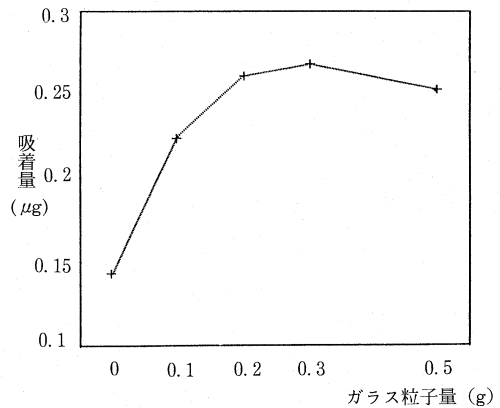


図5 ガラス粒子量と吸着量の関係

SA 法により微量の PPD を定量することができ、さらにこの方法を用いて以下の実験を行った。

2. ガラスとの接触による PPD 濃度の低下と PPD のガラスへの吸着

0.5 μg/ml に調製した PPD 溶液を φ16×33 mm のバイアルに 0.5 ml ずつ分注し、溶液をバイアルの内面に十分に接触させた後、溶液中の PPD 量を測定した。分注前の濃度と比較して、PPD 濃度の低下が認められた。この濃度の低下が PPD のガラス壁への吸着によるものかどうか確認するために、PPD 分注後のバイアルを PBS で十分に洗浄し図 1 に示した BSA によるブロッキング以下の ELISA と同様の操作を行った。対照として PPD 溶液の代わりに BSA 溶液を分注したバイアルで同様に行ったものと比較して発色に差が認められた。すなわち、ガラスバイアルに分注された PPD の一部は、PBS では洗い出されにくい状態でガラスバイアル壁に吸着していることが確認された。

3. PPD 濃度低下の経時変化

φ16×33 mm のバイアルに 0.5 μg/ml の PPD 溶液

を 0.5 ml 静かに分注し、直後および 1, 10, 30, 60 および 120 分間室温 (22°C) に静置した後に PPD 濃度を測定した。図 3 に示したように PPD 濃度は分注後急速に低下し、時間の経過に伴い低下の速度は緩慢となり、120 分後にはほぼ 60% の低下が認められた。

4. PPD 吸着に及ぼす温度および PPD 濃度の影響

PPD 濃度および静置した温度が吸着に及ぼす影響について検討した。0.25, 0.5 および 1.0 μg/ml に調製した PPD 溶液を φ16×33 mm バイアルにそれぞれ 0.5 ml ずつ静かに分注しできるだけ振動を与えないように静かに -80, 6, 22 および 37°C の温度環境に移し 24 時間静置した後 PPD 濃度を測定した。図 4 に示すように -80°C および 6°C では PPD の濃度による吸着率 (PPD 濃度減少率) の間に差はみられず、また両温度間でそれほど明瞭な差はみられなかったが、22°C, 37°C での静置ではいずれの濃度でも著しい濃度低下がみられ、特に 0.25 μg/ml では 22°C で 95%, 37°C ではほぼ 100% の吸着がみられた。0.5 μg/ml と 1.0 μg/ml の間では吸着率に差はなかった。

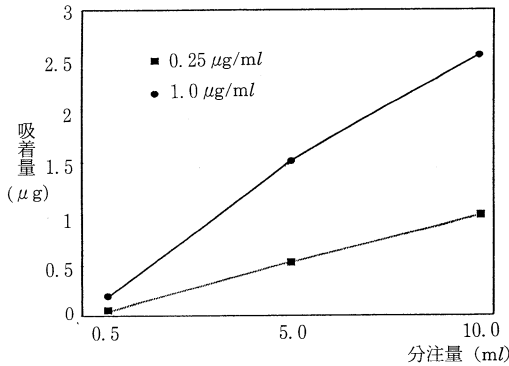


図6-a 分注量と吸着量の関係

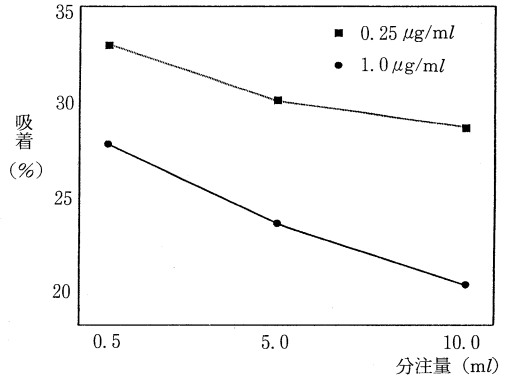


図6-b 分注量と吸着割合の関係

表 各分注量における単位面積あたりのPPD吸着量

	PPD吸着量 ($\times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2$)		
分注容量 (ml)	0.5	5	10
接触面積 (cm^2)	2.97	15.8	30.1
分注 PPD 濃度			
0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2.23	3.48	3.48
1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6.06	9.66	8.76

5. ガラスとの接触面積の影響

$\phi 16 \times 33 \text{ mm}$ バイアルを破砕しふるいにかけて直径 $840 \sim 300 \mu\text{m}$ のガラス粒子とした。これを同じ $\phi 16 \times 33 \text{ mm}$ バイアルに 0.1, 0.2, 0.3 および 0.5 g 量りとり、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の PPD 溶液を 1 ml ずつ分注し、手早く攪拌して 22°C で 1 時間静置した。その結果粒子量が多い、すなわち PPD が接触するガラスの表面積が大きいほど、溶液中の PPD 吸着量は多かった (図 5)。

6. 分注容量の影響

次に分注容量の影響をみるため、 0.25 および $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した PPD 溶液を $\phi 16 \times 85 \text{ mm}$ のバイアルにそれぞれ 0.5, 1.0, 5.0 および 10 ml ずつ分注し、室温で 1 時間放置した後 PPD 量を測定した。

結果は図 6-a に示すように、いずれの濃度においても分注容量の増加とともに溶液中の PPD の減少の絶対量 (吸着の絶対量) は増加する傾向を示したが、分注した絶対量に対する減少の割合 (吸着割合) として表した場合 (図 6-b) は分注量の増加にともなって低下の傾向がみられた。また、単位面積あたりの吸着量を計算で求めると、各濃度において一定ではなく、分注量の違いによってその値が異なる結果となった (表)。

考 察

タンパク濃度を測定する方法としては、ビュレット法やロウリー法などが知られているが、微量のタンパクは感度の点でこれらの方法で測定することはできない。RI 法では、微量測定が可能になるような高い比活性を持つ標識 PPD を調製することが困難である。その上、使用上の規制により容易に行える方法でもない。そこで、抗原抗体反応および酵素反応を利用した ELISA 法を基に PPD 定量法を検討した。現在行われている血清診断を目的とした ELISA 法は、ある一定濃度の PPD を固相化し、血清抗体価を測定しているが、この実験では固相化する PPD の量を変えて、一定の抗 PPD 抗体価を示す血清を用いて PPD の測定が可能であるか、そしてどれだけ感度があるのかを調べた。その結果、 $0.0625 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ という低濃度の範囲で PPD 濃度と吸光度との間に直線関係が認められ、PPD の測定については十分に感度が高く、実際に皮膚反応に用いられる PPD 濃度 ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) での測定も可能であることが示された。

そこで、本来の目的である PPD のガラスへの吸着について実験を行った。理想的にはガラスへ吸着した PPD 量を直接測定することが望ましい。しかし、吸着した PPD を溶出させて取り出すことは容易でなく、これまでに界面活性剤を用いて溶出させた報告もあるが⁶⁾、今回行う ELISA 法では Tween 80 などの界面活性剤は、固相 (マイクロプレート) に対してタンパク質と強く競合して、PPD の固相化を妨害するため用いることはできない。実際に Tween 80 を含んだ PPD 溶液で測定を試みたがほとんど固相化されなかった。そこで、既知濃度の PPD 溶液を調製しガラスと接触させた前後の溶液中の PPD 量を測定し、接触前後の差を求めた。PPD 溶液がガラスバイアルと接触することで、その PPD 濃度が低下し、さらに PPD と接触後のバイアル

内に PPD が残留していることが確認されたことは、PPD がガラスに吸着するという過去の報告を裏付ける結果であり、よって今回の実験で得られた PPD 濃度の差はガラスへの吸着量に相当すると思われる。

PPD の吸着は、分注後数分という短い間に、急激に起こることが確認された。また、温度による影響では、室温以上で急激な吸着がみられ、これは放置する温度の高いほど PPD タンパクの分子運動が活発化し、よりガラスと接触しやすくなるため吸着量が増加するものと考えられる。ただし、本実験における -80°C という凍結状態での吸着は、分注から凍結までおよび再溶解に要した時間は溶液状態でバイアルと接触しておりその間に起こった吸着とも考えられるが、いずれにせよ低温下すなわち分子の運動を抑制した状態に置くことで吸着量も抑えられることは確かである。

結果 6 の項で示した分注量による変化は Guld らの容積効果を示している⁷⁾。すなわち、吸着する PPD の絶対量は加えた PPD 溶液の容量の増大に伴い増加するが、それを分注した絶対量に対する割合として表現した場合、添加容量の大きい方が吸着する割合は少ない。これは、吸着が接触する面積の増加に規定されることを示している。また、同一濃度でも分注量の違いによって単位面積あたりの吸着量が異なるのは、バイアル内面の構造が部位によって立体的に均一ではないこと、吸着がタンパク-ガラスおよびタンパク-タンパク間の相互作用の 2 段階で起こり、付着した多層吸着タンパク質からの吸脱着は可逆的であるなど、多数の要因が原因となっているものと推測される。

以上の結果は、PPD がガラスに接触する前後での濃度の比較により吸着量を求めているが、PPD は多種類のタンパクの混合物であるため、吸着に関与するタンパク分子と、遅延型過敏性反応 (DTH) に関与するタンパク分子との相関性については不明である。また、PPD 皮膚反応は細胞性免疫によって引き起こされる DTH であり、今回の ELISA 法における PPD 抗原に対する抗体の反応、すなわち体液性免疫による反応とは直接比較することはできない。よって、吸着によって皮膚反応惹起抗原としての力価の減少が起こるという事実を証明するためには、動物試験とこの ELISA との相関性をみる必要があるとあり、現在検討中である。ELISA 法を用いることにより、ガラスへの PPD 吸着という現象を定量的に知ることができた。このことは、

PPD を取り扱う上で重要な情報をもたらすとともに、ELISA 法が PPD 力価を測定する場合の動物試験に代わり得る方法としての可能性を示している。

現在、使用されている PPD 製品についても同様に、溶解後に容器への吸着が起こり、溶液中の PPD 量が減少するであろう。しかしながら、市販製品は吸着の影響を考慮して製造され厳重な品質管理がなされているので、規定通りの使用方法では診断においての影響はない。ただし、今回のわれわれの結果から、溶解方法やその取り扱いが規定通りに行われなかった場合には、吸着によって反応が大きく変動するものと推察される。特に一人用一般診断用 PPD 製品では、上に述べた容積効果のために最も影響を受けやすいと考えられ、規定通りの使用方法が強く望まれる。

なお、本研究の内容の一部については第 69 回日本結核病学会総会 (1994 年、長崎) にて発表した。

文 献

- 1) Magnus K, Guld J, Waaler H, et al. : Stability of purified tuberculin high dilution. Bull Wld Hlth Org. 1958 ; 19 : 765-782.
- 2) Marks J : Adsorption of tuberculin as a source of error in Mantoux tests. Tubercle (London). 1964 ; 45 : 62-63.
- 3) Landi S, Held HR, Haushild AHW, et al. : Adsorption of tuberculin PPD to glass and plastic surfaces. Bull Wld Hlth Org. 1966 ; 35 : 593-602.
- 4) Landi S, Held HR and Tseng MC : Evaluation of various substances to prevent adsorption of tuberculin Purified Protein Derivative (PPD) to glass surfaces. Bul Wld Hlth Org. 1970 ; 43 : 91-106.
- 5) 豊原希一, 折居昌志 : PPD 溶液の力価低下に関する一考察. 結核. 1970 ; 45 : 388-389.
- 6) Waaler H, Guld J, Magnus K, et al. : Adsorption of tuberculin to glass. Bull Wld Hlth Org. 1958 ; 19 : 783-798.
- 7) Guld J, Magnus K and Magnusson M : Instability of the potency of tuberculin dilutions. Am Rev Tub. 1955 ; 72 : 126-128.