STUDIES ON THE PREPARATION, STANDARDIZATION AND PRESERVATION OF LEPROMIN. I. Comparative Experiments with Lepromins Made by the Mitsuda-Hayashi's Original or the Wade's Improved Method and with a Lepromin Preserved by Freez-drying in Vaccuo.

Masahide ABE and Tetsu NAKAYAMA

National Institute for Leprosy Research

Ken YANAGISAWA, Michiaki MAEDA and Nozomu ASAMI

National Institute of Health

Noboru TACHIKAWA and Kazuko OKAMURA

National Leprosarium Tama Zenshoen

To establish the best method of the preparation, standardization and preservation of lepromin, comparative studies on the skin reactions in leprosy patients were commenced using the following lepromin samples:

- 1) In the first experiment, two lepromins made by different methods (Mw, by Wade in 1956 and M8, by the Mitsuda-Hayashi's method in 1958) were compared with each other. With respect to the early reaction, the two lepromins gave no significant difference. The Mw, however, elicited weaker late reactions than the M8. The results of bacillary counting of the Mw and M8 were 150 and 220 millions per ml, respectively.
- 2) To ascertain the effect of heat on the potency of lepromin, fresh nodules from leprosy patients were homogenized and divided into two parts, the one was autoclaved to make the Wade's lepromin (Ma) and the other was boiled with saline to make the Mitsuda-Hayashi's (Mb). The bacillary counting of the two lepromins gave nearly equal results, 276 millions per ml in Ma and 289 in Mb. The Ma antigen, however, elicited stronger late reactions than the Mb, while no difference was found with respect to the early reactions. From these results and from practical considerations, lepromin used actually in Japan are always made by the Wade's method.
- 3) An attempt was made to preserve the standard lepromin by freez-drying in vaccuo. After the storage in ice-box during one year, the dried lepromin was resuspended in 0.5% carbol water and its potency was compared to the standard lepromin stored in ice-box during one year. No significant difference was observed between the two lepromins with respect to the early as well as late reactions.

レプロミンの製法、力価試験並びに保存に関する研究

第1報 光田・林の原法および Wade の変法により 作ったレプロミン、凍結乾燥レプロミンな どによる比較試験

阿部正英*・中山 哲*・柳沢 謙**・前田道明**
浅見 望**・立川 昇***・岡村和子***

レプロミンの製法に関して、Fernandez & Olmos Castro, Dharmendra その他¹⁾による改良が行われたにもかかわらず、それらの抗原では早期反応は強く起るが、晩期反応は弱いので、前者がアレルギー性反応であり、後者がらい菌に対する抵抗力をあらわすと主張する Wade は光田・林の原法²⁻³⁾あるいは Wade の変法⁴⁾によるレプロミン(光田抗原)の使用を奨めており、国際的にもこの抗原による晩期反応の検査がひろく行われている。しかしこの抗原の最大の欠点は適当な力価試験法のないことであり、そのために国際的な力価基準も定まっていない。柳沢ら⁵⁾は結核菌感作モルモットの皮内反応による力価試験法を考案し、最近わが国で作られた抗原はすべて使用前にこの方法で前年度の製品と比較し、同じ力価を示すように調整された。しかしモルモットの皮内反応では、早期反応の大きさの計測は容易であるけれども、光田抗原に重要な晩期反応の計測は困難であるので、晩期反応の力価の正確な試験法とはいいいがたい。

昭和30年から5年間にわたって、全国のらい療養所で行われたレプロミン反応の研究成績⁶⁾によれば、各年度の光田抗原によるらい患者の早期反応の大きさの平均値には有意差は認められなかったが、晩期反応の陽性率は調査年度によりかなり異なることが注目された。この原因は晩期反応の判定基準の定め方の如何にあることが既に指摘⁶⁾されているが、そのほかに、各年度の光田抗原の晩期反応の力価に多少の差異が見逃されていた可能性が考えられる。従って、一層適切な力価試験法の確立が急務であり、ひいては国際的力価基準の確立が要望される¹⁾。そのためには、力価に大きな影響を与える抗原の製法の吟味がまず必要であり、また毎年作られる抗原の力価を比較するために、保存中の力価の変動をしらべることも必要である。

昭和30年から33年までは、光田、林の原法に準じて作

製されたレプロミンが用いられたが、34年以降は Wade の示唆により、彼の変法に従って作られるようになった。このさい、両方によるレプロミンの力価を比較する必要が生じた。それをきっかけとして、わが国のレプロミンと外国のものとの比較を行う機会が生まれ、また本研究課題に関する一連の実験が試みられるにいたったのである。

材料と方法

使用抗原：Wade より分与されたレプロミン(Mw)は1956年に彼の変法で作られたものである。これと比較試験を行ったレプロミン(M_s)は1958年にらい研において光田・林の原法に従って作製し、全国において使用された製品である。また、製法の比較研究には1959年に、多磨全生園の患者より採取した結節を新鮮のまま細碎し、半分を120°Cに20分加熱したのち、20倍量の生理食塩水で浮遊液を作った(M_A)。ただし、粗大な組織成分の除去には Wade より分与されたナイロン・フィルターを用いた。残りの半分の材料は20倍量の生理食塩水とともに100°Cに30分加熱したのち、上記と同様に浮遊液を作った(M_B)。両抗原に石炭酸を0.5%の濃度に加え、小瓶に密封したのち、M_Aは120°Cに20分、M_Bは100°Cに30分において再加熱した。

凍結真空乾燥による保存：1959年にレプロミン(M₁₀)を作製した直後、石炭酸を加える前にその2ccずつを10

表1 比較試験に用いたレプロミンの種類と菌数

記号	作製者	作 製 年 月 日	製 法	1cc中の菌数 (単位:億)
M _W	Wade	1956	Wade 変法	1.5
M _s	らい研	1958.9.11	光田・林法	2.2
M _A	"	1959.7	高圧加熱	2.76
M _B	"	1959.7	煮 沸	2.89
M ₁₀	"	1959.9.2	Wade 変法	1.84
M _D	"	1959.9.2	M ₁₀ を凍結 乾燥	—

* 国立らい研究所 ** 国立予防衛生研究所

*** 多磨全生園 (1961年10月1日受稿)

ccの小瓶に分注し、ドライアイス・アセトン中で急速に凍結したのち真空(約20 μ Hg)乾燥し、密閉して氷室内に保存した(M_D)。1年後に0.5%石炭酸水 2ccを加えて再浮遊液とし、皮内反応に使用した。

菌数計算：上記の各レプロミン中に含まれる菌数を林⁷⁾の方法に従って計算した。その結果を表1に示す。

レプロミン反応検査：すべて多磨全生園の患者について行った。1959年夏に、1群の患者の右前膊屈側に M₈ の0.1ccを、左前膊屈側には M_W の0.1ccを皮内注射し、注射後48時間目(早期反応)および3週目(晩期反応)に両抗原による反応の大きさを計測した。また同時に、別の群の患者の右側に M_A を、左側に M_B を同様に皮内注射して、早期並びに晩期反応を観察した。1960年秋には、1群の患者の右側に M₁₀ を左側に M_D を皮内注射して、同様に比較試験を行った。

成績

1) Wade 製レプロミン(M_W)とらい研製レプロミン(M₈)との比較

らい腫(L)型患者4例、結核様(T)型患者45例について、M_WおよびM₈両抗原による早期反応の大きさをしらべた結果を図1および図2に示す。早期反応においては斜線より上側に多くの点が集り、M_Wの方がM₈より発赤値の大きいものが多いことを示しており、晩期反応においては斜線より下側に多くの点があり、M₈の方がM_Wより硬結値が大きいものが多いことを示している。これらの所見を推計学的に検討するために、各患

図1 わが国のレプロミン(M₈)とWadeのレプロミン(M_W)とによる早期反応の比較
● L型 4例 ○ T型 45例

図2 わが国のレプロミン(M₈)とWadeレプロミン(M_W)とによる晩期反応の比較
L型 4例 ○ T型 45例

者について左右の反応の大きさの差をとり、それらの平均値を求めて、母平均0の母集団の無作為標本とみなしうるか否かをしらべた。その結果は表2に示すごとく、早期反応におけるM₈-M_Wの平均値は-1.695となるが、“Student”のtsの絶対値は1.94となり、t分布においてこの値より大きな値が得られる確率は0.05と0.1との間にあるので、M₈-M_Wの平均値が0であるという仮説はすてられない。いいかえれば、M₈とM_Wとの早

表2 各種レプロミンの比較試験成績の推計学的検討

比較抗原	検査例数 L T 計	反応	左右の反応の読み の差		ts	確率
			平均値	不偏分散		
M ₈ -M _W	4 45 49	早期	-1.695	6.13	1.94	0.05<0.1
		晩期	+1.796	2.98	4.23	<0.001
M _A -M _B	49 49 98	早期	-0.469	13.35	0.35	0.7<0.8
		晩期	+0.592	2.09	2.7	<0.01
M ₁₀ -M _D	21 23 44	早期	+1.453	8.68	1.11	>0.9
		晩期	-0.341	3.76	0.60	>0.9

期反応の力価に有意差は認められない。それに対して、晩期反応におけるM₈-M_Wの平均値は1.796となり、tsは4.23となるので、0.1%以下の危険率でM₈-M_Wが0という仮説をすてることができる。すなわち、M₈の方がM_Wより晩期反応の力価は高いことが明らかである。

2) 同一結節を高圧加熱(M_A)あるいは煮沸(M_B)して作ったレプロミンの比較

L型49例, T型49例の患者について, M_A および M_B 両抗原による早期反応並びに晩期反応の大きさをしらべた結果を図3および図4に示す。これらの図からは両抗

図3. 高压加熱レプロミン (M_A) と煮沸しレプロミン (M_B) による早期反応の比較
● L型 49例 ○ T型 49例

原の力価に有意差があるか否かを直観的に知ることが困難であるので, 前と同じく, 各例について左右の反応の大きさの差をとり, その平均値を求めて推計学的に検討した。その結果は表2に示すごとく, 早期反応における $M_A - M_B$ の差の平均値は有意であるとはいきれない

図4. 高压加熱レプロミン (M_A) と煮沸しレプロミン (M_B) による晩期反応の比較
● L型 49例 ○ T型 49例

が, 晩期反応における $M_A - M_B$ の差の平均値は1%以下の危険率で有意であることがわかった。

3) 凍結乾燥して1年間保存したレプロミン (M_D) と氷室に1年間おいたレプロミン (M_{10}) との比較

M_{10} を凍結乾燥して1年間氷室に保存したのち, 0.5%石炭酸水を加えたところ, 直ちに安定な浮遊液にもどり, 皮内注射に何の支障も起らなかった。L型21例, T型23例の患者について, M_D と M_{10} とによる早期並びに

図5. 1年間氷室保存レプロミン (M_{10}) と凍結乾燥レプロミン (M_D) による早期反応の比較
● L型 21例 ○ T型 23例

図6. 1年間氷室保存レプロミン (M_{10}) と凍結乾燥レプロミン (M_D) による晩期反応の比較
● L型 21例 ○ T型 23例

晩期反応の大きさの比較を行った結果を図5と図6に示す。また前と同じく、両抗原による反応の大きさの差の平均値を求め、推計学的に検討した結果を表2に示す。早期並びに晩期反応ともに、両抗原の力価に有意差は認められなかった。

考 察

レプロミンの製法は以前は光田・林の原法に従っていたが、現在では Wade の変法が用いられている。前者が結節を20倍量の生理食塩水とともに100°Cに30分加熱したのち浮遊液を作るのに対して、後者では結節をオートクレーブで高圧加熱したのち30倍量の生理食塩水で浮遊液とする。従って、両法によるレプロミンの力価に差を生ずるのは当然であり、その理由として第一に濃度の差があげられよう。そのほか、レプロミンによる晩期反応の強さにはらい菌と組織成分との関与が考えられるので、加熱の温度と方法との影響も無視できない。Wade¹⁾によれば、結節を高圧加熱したのち浮遊液とした方が、組織中の膠原の除去が容易である上に、らい菌体の水溶性成分の流出が容易となるので、早期反応が強く起るといふ。そこでまず、わが国で光田・林の原法で作った製品(M_S)とWadeの作ったもの(M_W)との比較試験を行った。その結果は図1、図2および表2に示すごとく、早期反応においては両者の力価に有意差を認めることはできず、晩期反応においてはM_Sの方がM_Wより力価が高いことがわかった。しかし、表1に示した両者のらい菌数にはかなりの差があるので、仮にM_Sを1.5倍に希釈(このときには両者の浮遊液の濃度も等しくなる)して、M_Wと比較したならば、晩期反応の強さは差を生ぜず、早期反応はM_Wの方が力価が高いという結果が得られるかもしれない。これはWadeの説を肯定する所見となる。しかし、M_SとM_Wとは材料が異なるので、力価の差が製法の相違のみにもとづくとは断定することはできず、また保存期間も異なるので、保存中に力価が変わった可能性もある。

そこで次に、同一材料を2分して、一方は高圧加熱により、他方は煮沸により作ったレプロミンM_AおよびM_Bの比較試験を試みた。両抗原ともに材料を20倍量の生理食塩水で浮遊液としたので、その中に含まれるらい菌数は表1に示すごとく、ほとんど等しい。しかし、皮内反応の比較の結果は図3、図4および表2に示すごとく、早期反応の強さに両者の有意差を認めることはできず、晩期反応の力価はM_Aの方がM_Bより高いことがわかった。従って、この実験からは上述のWadeの説を肯定する結果は得られなかった。むしろ、レプロミン液の

作製には、結節を高圧加熱した方が煮沸した場合よりも晩期反応の力価が高くなることに注目すべきであろう。他方、実用の面から見れば、結節をオートクレーブで加熱した方が、雑菌の混入による汚染の危険は少く、輸送も容易であり、浮遊液の濃度の加減による力価の調節も容易である。これらの利点を考慮して、昭和34年以降のわが国のレプロミンはWadeの変法に従って作製されることになった。

レプロミンの保存には、凍結真空乾燥法がよいことはすでに示唆されている⁸⁾。しかし、レプロミンに補助剤を何も加えずに凍結乾燥したのち、再び浮遊液としたときに、もとと同じような分散状態にもどるかどうかを確かめる必要がある。そこでまず試験的に、石炭酸を加える前のレプロミンの少量を無菌的に凍結乾燥し、氷室内に1年間保存したのち、0.5%石炭酸水を加えた。すると固形物は直ちに分散して、安定な浮遊液にもどり、1年間浮遊液のまま保存したものより、粗い組織成分は少いように思われた。両者による皮内反応の成績は図5、図6および表2に示すごとく、早期並びに晩期反応ともに、力価に有意差は認められなかった。すなわち、レプロミンの保存には凍結乾燥法が最も適していることが確かめられたが、同時に、製品のまま氷室に保存しても、少なくとも1年間は力価にほとんど変化を生じないことが明らかとなった。従って、これまでわが国で毎年作られたレプロミンを前年のものと比較して、力価の調整を行っていたことは正しかったといえよう。柳沢⁹⁾の報告した如く、らい患者における早期反応の強さと晩期反応の強さとの間には、かなりよい相関がみられるので、多数の結節をプールして作製したレプロミンについては、早期反応の力価試験により晩期反応の力価の調整を行うことは可能であろう。しかし、結節材料並びに製法を異にしたレプロミンの比較試験では、上述の如くに早期反応と晩期反応との力価が平行しない場合があること、またレプロミン中の菌数と晩期反応の力価とも平行しない場合のあることなどを考えると、レプロミンの力価試験法には、残された多くの問題があるように思われる。

総 括

レプロミンの製法、力価試験法並びに保存法の選定は相互に関連のある問題であるので、まずつぎの各種のレプロミン製品について、らい患者の皮内反応による力価の比較試験を試みた。

1) 1958年にわが国で光田・林の原法で作ったレプロミンと1956年にWadeの作ったレプロミンとを比較すると、早期反応では両者に差は認められず、晩期反応では

前者の方が力価が高いことがわかった。また両者に含まれるらい菌数の比は約 1.5:1 で、明らかな差が認められた。

2) 同一結節材料を2分して、一方は光田・林の原法により、他方は Wade の変法により作製したレプロミンの力価を比較すると、早期反応では両者に有意差を認めなかったが、晩期反応では Wade 変法によるレプロミンの方が、光田・林の原法によるものより高い力価を示した。従って、結節材料の処理にさいしての実際の利点をも考慮して、現在のわが国では、Wade 変法によるレプロミンを用いている。

3) レプロミンを凍結真空乾燥して、氷室に1年間保存したものと、浮遊液のまま同様に保存したものとを比較したが、両者の力価に有意差は認められなかった。従って、レプロミンは氷室内に保存すれば、少なくとも1年間は力価に変化を起さぬように思われる。

本研究はらい研究協議会において計画され、実施された。本研究に対して、厚生省厚生科学研究補助金並びに

藤楓協会より多大の御援助を賜ったことを厚く感謝する。

文 献

- 1) H. W. Wade: Report of 2nd WHO Expert Committee on Leprosy, 1959 (邦訳: レプラ, 29, 250 (1960))
- 2) 光田健輔: 皮泌誌, 19, 697 (1919)
- 3) 林 文雄: 東京医事新誌, 2661, 6 (1930)
- 4) WHO Expert Committee on Leprosy, 1953(reprinted verbatim, Internat. J. Leprosy, 21, 535 (1953))
- 5) 柳沢, 浅見, 石原: レプラ, 25, 26 (1956)
- 6) らい研究協議会: レプラ, 30, 1 (1961)
- 7) 林喜久夫: レプラ, 28, 13 (1959)
- 8) Transactions of the 7th International Congress of Leprology. p. 463 (1958)
- 9) 柳沢ほか: La Lepro, 24, 35 (1955)