Studies on the Preparation, Standardization and Preservation of Lepromin.

II. Standardization by Bacillary Counting.

MASAHIDE ABE, MICHIAKI MAEDA AND TETSU NAKAYAMA
National Institute for Leprosy Research

KEN YANAGISAWA AND NOZOMU ASAMI
National Institute of Health

NOBORU TACHIKAWA AND KAZUKO OKAMURA
National Leprosarium Tama Zensho-en

SHIGENOBU KOBAYASHI
National Leprosarium Kuriu Rakusen-en

AND KIKUO HAYASHI
National Leprosarium Hoshizuka Keiai-en

The reliability of bacillary counting for the standardization of lepromin was examined using the undiluted standard lepromin and its 1:2, 1:4, and 1:8 dilutions. A linear relationship was demonstrated between the dilution degree and numbers of leprosy bacilli contained there. Size of the skin reactions was read in leprosy patients comparing between those elicited by the undiluted standard and by diluted antigens. The result indicated that the reaction size becomes smaller with the dilution degree of the antigen. Therefore, a parallelism between the potency of lepromin and the number of bacilli in the antigen was made clear. It is possible to settle the criterion of lepromin potency in the term of bacillary number. It was found that when lepromin is prepared by the same procedure using a pool of many leprous nodules, it contains leprosy bacilli in number from 150 million to 160 million per ml.

レプロミンの製法，力価試験並びに保存に関する研究

第2報 菌数計算による力価基準

阿部正英 前田道明 中山哲 (国立多摩研究所)

柳沢謙 浅見望 (国立予防衛生研究所)

立川昇 岡村和子 (多磨全生園)

小林茂信 (栗生楽泉園)

林喜久夫 (星塚敬愛園)

(受付, 6月8日, 1963)

レプロミン (光田抗原) の力価試験法には生物学的
方法と菌数計算法とがある¹⁾。しかし、実験動物にお
いては、光田(晩期)反応の観察が困難であり、多数の

人体について力価試験を行うことも実施上の難点があ
る。そこで現在最も有力視されるものは、*in vitro* に
おける菌数計算法である。最近、Hanks²⁾ はレプロ

ミンに $\frac{1}{10}$ 量のクロロホルムを加えてよく振ることにより、菌塊を分散させたのちに、一定量の塗抹標本をつくり、菌数をかぞえる方法を提唱しているが、菌数と力価との関係についての詳しい報告はない。わが国ではレプロミンを作製の都度、林の方法³⁾により菌数計算を行なっているが、それにより力価基準を定めるためには、なお二三の検討すべき問題がある。その第一はレプロミンの菌数と力価との平行性であり、第二は菌の性状あるいは組織成分の差異が力価に及ぼす影響についてである。この報告では、まず第一の問題を解決するために、正規のレプロミンとその希釈液とについて菌数計算を行い、希釈度と菌数との平行性を確めた上で、癩患者について比較試験を行なった。

材 料 と 方 法

1) レプロミン 多数の結節プルより Wade の方法⁴⁾で作製したレプロミン (Lot 12) を用いた。これを原液とし、0.5%石炭酸食塩水で 2, 4, 8 倍の希釈レプロミンを作った。

2) 菌数計算 林の方法³⁾により行った。すなわち、白金線(0.6mm)で直径3mmのループを持つ白金耳をつくり、あらかじめこの白金耳の恒数を定めておく。それには生菌数 $10^9/\text{ml}$ の大腸菌液からこの白金耳で1白金耳の菌液を採り、のせガラス上に直径1cmの正円形に広げて、一定倍率で1視野中の平均菌数(a)を数え、 $10^9/a$ をこの白金耳の恒数とする。この白金耳を使用して、被検レプロミンから1白金耳を採り、のせガラス上に直径1cmの正円形に広げ、できるだけ菌を洗い落さないように静かに染色したのち、同じ倍率で少なくとも100視野以上について鏡検し、1視野の平均菌数を計算する。この値に $10^9/a$ を乗じたものがレプロミン1ml中の菌数となる。鏡検時に菌塊に遭遇したときは、強拡大でできるだけその菌数をていねいに数えた。20個以下の菌数の塊であれば、大体数えることができるが、それ以上の個数の菌塊は面積などからおよその菌数を推定した。

3) レプロミン反応の検査 癩腫型および非癩腫型から成る3群の癩患者(各群とも約230名)の1側の前膊内側に、各群とも原液レプロミンの0.1mlを、他側には群別に2, 4, 8倍希釈レプロミンをそれぞれ0.1mlづつ皮下注射し、注射後48時間目の早期反応と、3週目の晩期反応との大きさを計測した。なお、反応の注射部位差をなくすため、各群ともその約半数づつの患者について、レプロミン原液と希釈液との注射部位を入れかえた。

成 績

1) レプロミンの希釈度と菌数との平行性
レプロミン原液とその2, 4, 8倍希釈液とについて、それぞれ菌数を計測した結果を表1に示す。希釈度と

Table 1. Lineality between the bacillary counts and the dilutions of lepromin.

Dilutions	Bacillary counts (millions per ml)
1 : 1(undiluted)	146
1 : 2	71.6
1 : 4	35.5
1 : 8	17.5

菌数とがきわめてよい平行性を示すことが明かであり、菌数計算法がかなりよい正確さを持つことがわかった。

2) レプロミン原液と各希釈液との比較試験

癩腫型並びに非癩腫型患者について、レプロミン原液とその希釈液とによる晩期反応の大きさの度数分布を図1に示す。レプロミン原液に比べて、希釈レプロ

Fig. 1. Distribution curves, by sizes of reactions, of leprosy patients, comparing standard and serially-diluted lepromins.

ミンでは希釈度の増加とともに、反応の大きさが減少する傾向が癩腫型においても非癩腫型においても見られる。早期反応においても、同様な傾向が観察された。それらを推計学的に検討するために、各被験患者について、レプロミン原液とそれぞれの希釈液との反応の大きさの差をとり、差の平均値が0でないといえるか否かを、F分布表を用いてしらべた。

その結果を表2に示す。各平均値は1%以下の危険率で有意であり、レプロミンの菌数が半減すれば、力価に明らかな減弱が起ることがわかった。なお、希釈液相互間の比較は被験者が異なるので厳密には行いえないが、表2の平均値に示される如く、レプロミンの希釈度が高まるとともに、原液との晩期反応の大きさの差は増大するように思われる。

Table 2. Statistical significance of the differences in size of early and late reactions caused by undiluted and diluted lepromins.

Reaction	Differences (x) in size of reactions by two lepromins:	Cases	mean of x ($\bar{x}$)	u^2 a)	F_0 b)	Significance of F_0 (Probability)
Early	Undil.—1 : 2 dil.	235	1.481	26.17	19.7	< 0.01
	Undil.—1 : 4 dil.	242	2.404	32.99	42.5	< 0.01
	Undil.—1 : 8 dil.	238	2.126	32.10	33.6	< 0.01
Late	Undil.—1 : 2 dil.	235	1.123	5.89	51.2	< 0.01
	Undil.—1 : 4 dil.	234	1.910	6.74	126	< 0.01
	Undil.—1 : 8 dil.	230	2.452	6.01	230	< 0.01

$$a) u^2 = 1/N - 1 \sum (x - \bar{x})^2$$

$$b) F_0 = N\bar{x}^2/u^2$$

考 察

レプロミンの力価基準を菌数計算法により定めるにさいして、第一に問題となるのはこの方法の正確さであろう。レプロミン中に菌塊が多い場合には、菌数計算法が不正確になる恐れがあるが、比較的小さな菌塊はその中の菌数を大体推定しうるので、その他の操作に伴う誤差を考えれば、Wade の批判¹⁾の如き菌塊による不正確さをさほど重大視する必要はないであろう。事実、表1に示した如く、レプロミンの希釈度と菌数とはきわめてよい直線関係を示すので、林の方法は実用上十分な正確さを持つことがわかった。ただし、菌塊がきわめて多いレプロミンの場合には、Hanks²⁾が行なった如きクロロホルム処理が必要となろう。

第二の問題はレプロミンの力価を菌数のみで規定しうるか否かということである。レプロミン中の組織成分が晩期反応の強さに多少とも影響を及ぼす可能性が論じられている¹⁾。組織成分の関与の程度を知るためには、主因子である菌の量を一定にする必要があり、従ってレプロミンの力価を菌数計算法で一応の基準に合わせることが前提となる。そこでまず菌数と力価との平行性を確めたのちに、菌数による力価基準を設けることを目的として、希釈抗原を用いて比較試験を行った。その結果は図1および表2に示す如く、レプロミンの2, 4, 8倍希釈液は原液に比して早期並びに晩期反応ともに減弱することが明らかになり、希釈度と力価の減弱度とは大体平行する傾向が見られ、これ

は柳沢ら⁵⁾の所見と一致する。彼等は菌数をしらべていなかったが、今回は菌数と希釈度との平行性を確めたので、レプロミンの菌数と力価との平行性が明らかとなった。

そこで最後に、菌数計算によるレプロミンの力価基準の設定をいかにするかという問題であるが、これは国際的力価基準の確立を目指すものでなければならず、現状において早急な結論を出すことはひかえたい。さいわい、外国のレプロミンを入手できたので、その菌数とわが国のこれまでの製品の菌数とを比較して表3

Table 3. Comparison of bacillary counts on various lepromins.

Makers	Lot no.	Date	Bacillary count (millions per ml)
NILR a)	8	Sept. 1958	223 b)
	9	Jun. 1959	168
	10	Sept. 1959	184
	12	Jul. 1960	146, 151 c)
	13	Sept. 1961	158
Wade		1956	150
		Aug. 1958	164
Mabalay		Jun. 1960	213, 208 c)

a) National Institute for Leprosy Research, Japan.

b) Lot 8 was made by the Mitsuda-Hayashi's original method.

c) Duplicated counting on the same lepromin.

に示した。レプロミン lot 8 は光田・林の原法に従っ

て作ったものである。菌数が相対的に多く、Mabalay の製品は結節の希釈度が不明であるが、この二つ以外のものはすべて Wade の方法で作られた製品であり、いずれも多数の結節ブールを30倍の乳剤としたので、大体似た菌数を示すことが注目される。また既報⁶⁾の如く、わが国のレプロミンと外国のものとの比較試験においても、両者の力価に差がないことが確められている。従って、Wade の製法でつくったレプロミンの力価基準を菌数計算で求めるならば、基準レプロミンの菌数は1 ml中に約1億5千万ないし1億6千万であると一応設定してよいように思われる。

総 括

レプロミン原液とその2, 4, 8倍希釈液とについて、それぞれの菌数計算を行った結果、菌数と希釈度との間には直線関係が証明された。レプロミン原液と各希釈液とを用いて、癩患者における光田反応の大きさを比較した結果、レプロミンの希釈度とともに反応の大きさが減弱することがわかった。従って、レプロミンの菌数と力価との平行性が明らかとなり、レプロミンの力価基準を菌数であらわしうることがわかった。多数の結節ブールから、同じ方法で作った各種のレプロミンの菌数計算値はおおよそ1億5千万ないし1億6千万/mlであるので、この値をレプロミンの基準菌数と設定した。

本研究は癩研究協議会における研究計画の一部として

実施された。本研究に対して、厚生省厚生科学研究補助会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。また本研究の要旨は第34回日本癩学会総会において発表した。

文 献

- 1) Wade, H. W.: Lepromin: standardization and technique. (Working document prepared for the Second Meeting WHO Expert Committee on Leprosy, Geneva, 3-8 Aug. (1959) (邦訳, レブラ, 29, 250 (1960))
- 2) Hanks, J. H.: Enumeration of Mycobacterium Lepræ for the standardization of lepromin, Internat. J. Leprosy, 27, 134 (1959)
- 3) 林喜久夫: 癩菌の菌数計算法およびそれを使って算定された各種臓器中における癩菌数, レブラ 28, 13 (1959)
- 4) WHO Expert Committee on Leprosy, First Report (1953) (Reprinted verbatim, Internat. J. Leprosy, 21, 535)
- 5) Yanagisawa, K. et al: Studies on the lepromin test. (6) Relation between the serial dilution of lepromin and lessening of reaction intensity, La Lepro, 25, 53 (1956)
- 6) 前田道明ほか: 外国の光田抗原と日本のそれとの比較 レブラ, 30, 169 (1961)