

精製ツベルクリン $\pi$ による非定型抗酸菌感染の診断に関する研究

(人型結核菌と非定型抗酸菌の交叉反応を考慮して)

(その 1) 動物実験およびツ反応陰性集団における成績

大 谷 元 彦

名古屋大学医学部予防医学教室(指導 岡田 博教授)

受付 昭和 42 年 5 月 2 日

STUDIES ON THE CRITERIA TO DETECT THE INFECTION OF  
UNCLASSIFIED MYCOBACTERIA BY SKIN TEST\*

Motohiko OOTANI

(Received for publication May 2, 1967)

The problems of infection of unclassified mycobacteria have been discussed not only from the bacteriological but also from the clinical points of view. About 150 cases have been confirmed as unclassified mycobacteriosis in the last decade by Prof. Hibino, and a number of persons infected with unclassified mycobacteria has been estimated by the Research Committee on Epidemiology of Unclassified Mycobacteriosis (chairman: Prof. Okada). As a tuberculin skin reaction is the most useful method to detect the infection of tubercle bacilli because of its specificity and simplicity, it was considered that skin tests using tuberculin produced from various kinds of unclassified mycobacteria may be applicable to detect the infection of unclassified mycobacteria. However, as the prevalence of tuberculosis infection is still very high among adult population and BCG vaccination has been conducted extensively among younger generation in Japan, cross reactions to unclassified mycobacterial antigens among those infected with tubercle bacilli or BCG vaccinated must be taken into consideration.

The purpose of this study is to analyze quantitatively specific and nonspecific reactions to various mycobacterial antigens in experimental animals and men, and to establish the criteria to detect the infection of unclassified mycobacteria by skin tests.

Groups of guinea pigs were inoculated either with *Mycobacterium tuberculosis* or unclassified mycobacteria of the four different type (photochromogens, schotochromogens, non-photochromogens and rapid growers). Skin reactions to homologous and heterogous antigens were compared. A series of comparative intradermal skin test were carried out on 26,682 persons using tuberculin produced from tubercle bacilli and 4 kinds of unclassified mycobacteria.

In guinea pigs, the average size of reactions to homologous antigens was always bigger than that to heterogous antigens, but the strength of the reaction to heterogous antigens was markedly different by animals.

Among negative reactors to  $H_{37}Rv \pi$ , the frequency distribution of diameter of erythema to unclassified mycobacteria was expressed by the exponential distribution in all the age groups, and based on this fact, the upper limit of non-specific reaction to unclassified mycobacterial  $\pi$

\* From the Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Nagoya University, Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya-shi, Japan.

was calculated theoretically, and the following criteria was established :

- erythema less than 5 mm in diameter.....negative  
 erythema 5 to 9 mm in diameter .....positive doubtful  
 erythema 10 mm or over in diameter .....positive

Among those infected with tubercle bacilli, the reaction to unclassified mycobacterial  $\pi$  was smaller than that to  $H_{37}Rv$   $\pi$ , but the former was often larger than 10 mm in diameter. As the frequency distribution of cross reactions to unclassified mycobacteria  $\pi$  by the size of reaction to  $H_{37}Rv$   $\pi$  fit to normal distribution, the upper limit of cross reaction was determined by calculating "M+3 $\sigma$ " point in each size of reaction to  $H_{37}Rv$   $\pi$ , and the statistical analysis was made. Regression of "M+3 $\sigma$ " points to each size of reaction to  $H_{37}Rv$   $\pi$  fit with a cubic regression curve by using methods of least squares, and it was proved by a test of significance that these cubic regression curves could be replaced by regression lines. As the distribution of "M+3 $\sigma$ " points in each group was expressed by normal distribution, a zone of "M+3 $\sigma$ " points was calculated. As shown in Figures 12 to 14, a larger reaction out of zone was considered as positive, a reaction within a zone was considered as positive doubtful, and a smaller reaction out of zone as negative.

In conclusion, criteria were established to detect the infection of unclassified mycobacteria, and by applying the criteria to the clinical cases and epidemiological investigations, satisfactory results were obtained.

## I 緒 言

人型および牛型結核菌以外に人体に病原性を有する抗酸菌が存在することは早くから推定されていたが、はなはだまれな事象としてあまり注目を集めていなかった。1951年 Timpe and Runyon<sup>1)</sup>, Buhler and Pollak<sup>2)</sup>らは、いままで非病原性と考えられていた未分類の抗酸菌によると考えられる症例を報告した。その後かかる症例が少なからず存在していることが分かり、1957年 Crow<sup>3)</sup>は系統的にこれらをまとめ臨床的観察を発表したが、本症が1959年第15回国際結核病学会の中心課題の一つとして取り上げられるにいたつて、本症の存在は一躍世界の関心を集めるにいたつた。わが国においても戦前よりかかる抗酸菌が人体から分離されており、これらの抗酸菌によると考えられる髄膜炎や膿瘍の報告があつた<sup>4)</sup>。1952年染谷らは最初の肺非定型抗酸菌症(Ⅱ群 Scotochromogens)を発表したが、以来散発的に症例報告があつた。1959年来岡田らを中心とする非定型抗酸菌感染の疫学研究班の活動や、戸田らによる抗酸菌分類研究班の研究を中心に漸次関心が高まり、1966年末までに約150例の症例が名大日比野らにより認定されるにいたり、年々増加の傾向がみられている。

本症は臨床像が肺結核症にきわめて類似し、かつ菌の抗結核剤に対する感受性も低く、したがつて化学療法の効果も期待しにくく臨床的にも問題となる疾患である。

一方本菌による感染の問題として1924年すでに Ha-

stings<sup>6)7)</sup>は無病巢家畜牛の疫学的研究から、人型および牛型結核菌以外の抗酸菌感染がかなり広範に存在することを推定しており、その後 Meyer<sup>8)</sup>, Crowford<sup>9)10)</sup>, Hagen<sup>11)</sup>, Seibert<sup>12)</sup>らの動物実験により、人型・牛型結核菌と鳥型あるいは非病原性とも考えられていた抗酸菌の間に共通抗原が存在し、高濃度ツベルクリン液(以下ツベルクリン液はツと表わす)による結核診断のさいにはこの点を十分考慮せねばならぬことが指摘されていた。Palmer<sup>13)14)</sup>, Edward<sup>15)16)</sup>らは第二次大戦後数年間にわたつて実施した看護学校生徒を中心とする高濃度ツ液を用いた疫学的調査によつて、米国東南部では弱陽性者が多く、人型菌感染の特異的な2峰性分布を示さず、いわゆる low sensitivity と呼ばれる現象があることを観察した。これは人型菌以外の抗酸菌による感染が高率に存在するためとかれらは考えたが、Nyboe<sup>18)</sup>も世界各地の33カ国の小学生について低濃度および高濃度ツ液による調査から、熱帯および亜熱帯地方で同様の人型結核菌(以下人型菌)と異なる菌の感染が相当高率に存在することを推定している。これらの菌はすでに1935年 Pinner<sup>19)</sup>により atypical acid-fast bacilli 非定型抗酸菌(以下非定型菌)と命名されていた。Palmer, Edwards<sup>13)~16)</sup>らはその後非定型菌症から分離された菌から精製したツ液、すなわち非定型菌 Nonphotochromogens(以下 Nonphoto.) Battey 株より作製した PPD-B と人型菌由来の精製ツ PPD-S を用いて海軍徴募兵 26,496名を調査し、米国東南部の出身者は PPD-B

に高い陽性率を呈していたと報告し、その他にも同様な報告が相ついでみられている<sup>20)21)</sup>。また Photochromogens (以下 Photo.) Bostrum 株より PPD-Y, Scotochromogens (以下 Scoto.) Gaus 株および Bridge 236 株より PPD-Scoto., 患者から分離した Rapid Growers より PPD-F 等の非定型菌ツ液が作製され、こうしたツ液を使用した野外調査が行なわれ、本菌による感染状況が各地で報告されるようになった<sup>22)~24)</sup>。わが国の非定型菌感染の研究は 1959 年にすでに岡田<sup>25)</sup>らによつて Edwards より提供された PPD-S, PPD-Y, PPD-B を用い結核患者、小学生、健康成人を対象に行なわれており、交叉反応のため確実なことはいえないが、感染者の存在が推定された。

本症の臨床診断は 1962 年日比野により発表された criteria によりなされているが、本基準により定型的に本症と診断された症例は 1965 年末までに全国で 100 余例という少数であり、本症の感染、発病等の全貌を伺い知るためには集団の感染状況についての疫学的調査が必要である。一方すでに 1960 年非定型抗酸菌感染の疫学的研究委員会 (班長岡田博)<sup>26)~32)</sup>が組織され、ついで結核症類似疾患の疫学と臨床研究委員会 (班長岡田博) に引きつがれ、本邦で分離された非定型菌より作製したツ液による調査が行なわれて、case finding とともに感染を基礎として本症の疫学像を追求しようとしている。

抗酸菌感染を知るには結核菌と同様各種非定型菌から精製されたツによる皮膚反応が用いられるが、これは手技が簡単であり、広く実施できるので好都合である。さらに Edwards<sup>47)</sup>, Magnusson<sup>37)</sup>, Takeya<sup>50)</sup>, 岡田<sup>26)</sup>らにより報告されたように、抗酸菌未感染者および動物実験から皮膚反応は、感染菌と同種の抗原に特異的な反応を示し、異種抗原にはより弱い反応を示すので、人型菌ツと非定型菌ツを同時に注射し、両者を比較することにより非定型菌感染の診断に十分利用しうることが証明されている。しかしわが国においては人型菌感染がなお高率であり、また未感染者に BCG が高率に接種されているので、人型菌感染者、BCG 接種者には人型菌ツに対すると同時に、非定型菌にも抗酸菌間の共通抗原による交叉反応を示す者がはなはだ多いため、判定はそれほど容易とはいえない。著者はこの点にかんがみ各種抗酸菌感染時における同種および異種ツ反応について考察し、その特異反応、非特異反応および交叉反応について推計学的に検討して非定型菌感染の判定基準を設定するための参考資料にしようと試みた。

## II 研究方法

### 1. 動物実験における皮膚反応

各種抗酸菌感作時の皮膚反応の発現様相について観察した。300 g 前後の白色雄モルモットを 1~2 週間観察

した後人型ツ反応陰性であることを確かめ実験対象とした。感作菌株はグループ I (以下 I 群と略す) Photochromogens P<sub>16</sub> 株, II 群 Scotochromogens 石井株, 三池株, III 群 Nonphotochromogens 蒲生株および人型菌 H<sub>37</sub>Rv 株を用い、対照として無感作群を用いた。上記の菌で流バラ包埋加熱死菌 10 mg/ml 含有菌液 0.2 ml を作製し、人型菌あるいは非定型菌の一種を感作し、皮膚反応を感作後 4, 8 週後に実施した。皮膚反応の抗原は九大武谷教授により各種抗酸菌について作製された精製ツ液を用いた。抗原は 0.1 ml 当り 1.5 mcg (OT 200 倍相当) を用い、注射部位はモルモットの背部を選んで注射し 24 時間後に硬結を計測し、同種および異種抗原による皮膚反応の発現状況を比較検討した。

### 2. 人間集団における皮膚反応

同一人の左右両腕の初回部位と思われる局所を選んで、人型菌πおよび非定型菌π (P<sub>16</sub> π, 石井π, 蒲生π, 佐藤πのうち一種類) を同時に注射した。原則として左右差を考慮して一人ごとに左右交互にかえて実施した。注射量は 0.15 mcg/0.1 ml (OT 2,000 倍相当) である。判定は 48 時間後に行ない発赤および硬結を計測した。人型菌ツの反応 5 mm 以下の者を人型菌ツ陰性者群とし、このグループについて非定型菌πの皮膚反応の分析から非特異反応の限界を知ることにした。対象は発赤 5 mm 以下の中学生 759 名, 成人 380 名を選んだ。また人型菌ツ陽性者集団としては、中学生 11 集団 10,870 名, 高校生 11 集団 7,667 名, 自衛隊 6 集団 4,096 名, 一般住民 5 集団 838 名, 結核患者 7 集団 2,572 名を選び人型菌πの反応を基準として非定型菌πの反応状況を検討した。なおこのうち高校、自衛隊および結核患者集団の一部は結核症類似疾患の疫学と臨床班での資料を用いた。

## III 研究結果

### 1. 動物実験における皮膚反応

表 1 は死菌感作後の同種および異種抗原の反応を示したものである。反応の平均値を比較すると、同種抗原の反応は常に異種抗原の反応より大きい反応を示し特異性がみられた。すなわち人型菌感染群では同種抗原の反応を 100 とすると I 群 P<sub>16</sub> 86.9, II 群 石井 48.5, 三池 75.4, III 群 蒲生 80.6 で、P<sub>16</sub> π, 蒲生 π にかなり強い交叉反応を示している。三池 π は P<sub>16</sub> π, 蒲生 π に次ぐ交叉反応を示しているが、同じ II 群でも石井 π による反応は弱く、II 群には交叉反応の強いもの、弱いものがみられている。非定型菌 P<sub>16</sub> 感作群は人型菌 π に 95.5 と同種抗原に近い反応を示すが、他の非定型 π には石井 π 47.7, 三池 π 59.0, 蒲生 π 67.6 の反応を示した。石井感作群では人型 π, 非定型 π に 34.6~57.7 と比較的小さい交叉反応を示し、同じ II 群の三池 π には 53.8 の反応を示

Table 1. Skin Reactions to 1.5 mcg of Homologous and Heterogenous Antigens in Guinea Pigs Sensitized by 2 mg of *M. Tuberculosis* or Various Strains of Unclassified *Mycobacteria*

Guinea pigs sensitized with	Number of animals	Purified protein prepared from					
			H <sub>37</sub> -Rv	P <sub>16</sub>	Ishii	Miike	Gamou
H <sub>37</sub> Rv	9	Mean	<b>17.5</b>	15.2	8.5	13.2	14.1
		Range	<b>15~20</b>	13.5~17.0	6~10.5	11~15	10~17
		%	(100)	(86.9)	(48.5)	(75.4)	(80.6)
P <sub>16</sub>	8	Mean	17.0	<b>17.8</b>	8.5	10.5	11.5
		Range	15~19	<b>16~20</b>	6~11	9~12	9~12.5
		%	(95.5)	(100)	(47.7)	(59.0)	(67.6)
Ishii	7	Mean	4.5	4.5	<b>13.0</b>	7.0	7.5
		Range	4~5.5	3~6	<b>10~15</b>	6.5~8.0	5~9.5
		%	(34.6)	(34.6)	(100)	(53.8)	(57.7)
Miike	8	Mean	14.2	10.5	8.6	<b>14.9</b>	6.0
		Range	11~14	8~11.5	6~12	<b>11~16.5</b>	5~8
		%	(95.3)	(70.5)	(57.7)	(100)	(45.5)
Gamou	7	Mean	14.5	7.8	11.2	10.6	<b>15.5</b>
		Range	13~16	6~9.5	9~13	8.5~12	<b>14~17</b>
		%	(93.5)	(50.3)	(72.2)	(68.2)	(100)
Control	5	Mean	4.5	3.2	3.3	3.4	3.2
		Range	4~5	3~4	3~4	3~4	3~5

\* The bold type figures indicates the homologous reaction.

す。三池感作群では人型πにかなり大きく反応し、P<sub>16</sub>πに 70.5、石井πに 57.7、蒲生πに 45.5 の反応を示し同じⅡ群の石井πより大きい反応を P<sub>16</sub>π に示した。蒲生感作群は人型πに 93.5 と大きく反応し他の非定型πには P<sub>16</sub>π 50.3、石井π 72.2、三池π 68.2 の反応を示すが、石井πの交叉反応が比較的大きくなっていることが注目される。なお対照の無感作群はいずれも 3~5 mm の反応であり、非特異的なものと考えられた。個々の動物の硬結値は平均値よりかなりのバラツキを示しており、同種抗原の反応が異種抗原と同じかあるいは若干小さい反応を示すものもあり、一方異種抗原にほとんど反応しない群もあり、交叉反応は必ずしも一定した大きさで現われてはいなかった。

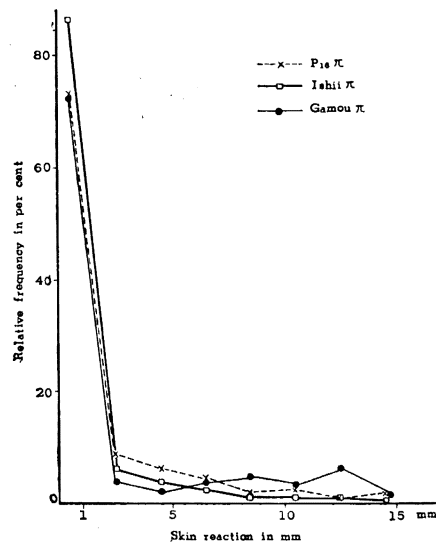
以上動物実験の結果を要約すると抗酸菌感作モルモットは同種抗原には異種抗原より大きい反応を示し、同種抗原に特異性がみられる。しかし非定型菌感作時には石井感作群を除き人型菌πに 90 以上の比較的大きい交叉反応を示し、また蒲生感作時には石井πにも比較的大きな反応を示している。また個々の動物でみると交叉反応はかなりのバラツキを示していた。

2. 人間集団における皮膚反応

1) 人型菌π反応陰性者群の皮膚反応

人型菌π反応 5 mm 以下すなわち人型結核菌未感染と考えられる者の非定型菌πの反応状況を発赤度数分布に

Fig. 1. Observed Frequency Distributions of Skin Reactions to 0.15 mcg of P<sub>16</sub>π, Ishii π and Gamou π in Junior High School Pupils whose Reactions to 0.15 σ of H<sub>37</sub>Rv π were Measured Less than 5 millimeters



より観察した。図1は中学生の P<sub>16</sub>π、石井π、蒲生π に対する発赤値の頻度を示したもので横軸は非定型πの反応の大きさ、縦軸はその度数を頻度により示したもの

である。P<sub>16</sub>πでは反応が0~1mmの者は73.8%と高く、2~3mmは8.7%に減少し以後4~5mm 6.4%、6~7mm 4.6%、8~9mm 1.8%と次第に減少している。また10~11mm 2.3%、12~13mm 0.5%、14~15mm 1.8%と10~15mmの反応を示す者もある。石井πでは0~1mm 86.6%、2~3mm 6.0%、4~5mm 3.8%、6~7mm 2.8%、さらに8~9mm 0.6%、10~11mm 0.3%、14~15mm 0.3%といずれも1%以下となりP<sub>16</sub>πとほぼ等しく減少を示している。蒲生πでは0~1mm 72.4%、2~3mm 4.0%、4~5mm 2.7%、6~7mm 4.0%、8~9mm 4.9%、10~11mm 3.1%、12~13mm 6.3%、14~15mm 1.8%で、P<sub>16</sub>π、石井πより6~15mmの者が多い。これらの分布はほぼ指数分布と推定されるのでP<sub>16</sub>、石井、蒲生各πの反応の実測値から計算される指数分布の理論曲線を求め、実測値の曲線と比較すると0~3mm以下の者は両者の頻度は一致するが、4~7mmの者は実測値の頻度が少なく8mm以上の者は逆に実測値が予測値よりも多くなっている。推計学的に実測曲線と理論曲線とは1%以下の危険率で有意差が存在し、実測値は指数分布曲線とみなすことができなかつた。これはなんらかの要因により実測者中に8mm以上の反応を示すものが多いためと推定される。しかし人における非特異の皮膚反応が指数分布に近い反応を示すことが野辺地、前田らによつて示されており、指数分布曲線から集団の95%、99%の者が含まれる上限点の反応の大きさを求めてみると、P<sub>16</sub>πでは7mm、11mm、石井π 5mm、7mm、蒲生π 9mm、15mmとなる。すなわちこれらの発赤値以下の大きさの反応は95%、99%の確かさで非特異反応と考えられる者の範囲を示している。同様に人型菌π陰性の成人の非定型菌πの反応状況を発赤度数分布により示すと図2のごとくになる。P<sub>16</sub>π、石井π、蒲生πおよび佐藤πでは0~1mmの反応を示す者は最も多くP<sub>16</sub>π、佐藤πは70%以上で、石井πでの58%、蒲生πの48%に比し高率となつている。2~5mmの頻度は石井π、蒲生πではP<sub>16</sub>π、佐藤πより高い。6~15mmの反応は蒲生πが8~9mm、石井πが12~13mmで若干頻度が高くなるが、ほぼ発赤径の増加とともに頻度は少なくなり、いわゆる指数分布に近い曲線を示す。佐藤πでは全員11mm以下であるがP<sub>16</sub>、石井、蒲生各πでは12~15mmの反応を示すものもある。これらの実測値から指数分布による理論曲線を求め、実測値との差異を発赤径0~3mm、4~7mm、8~15mmのおのおの頻度を比較することにより求めると、5%以下の危険率でみても有意差なく、成人の反応は指数分布を示しているとみなすことができる。指数分布曲線より成人で95%、99%の者が含まれる上限点を求めるとP<sub>16</sub>πで7mmと11mm、石井π 9mmと11mm、蒲生π 11mmと15mm、

Fig. 2. Observed Frequency Distributions of Skin Reactions to 0.15 mcg of P<sub>16</sub>π, Ishiiπ, Gamouπ and Satouπ in Healthy Adults whose Reactions to 0.15 mcg of H<sub>37</sub>Rvπ were Measured Less than 5 millimeters

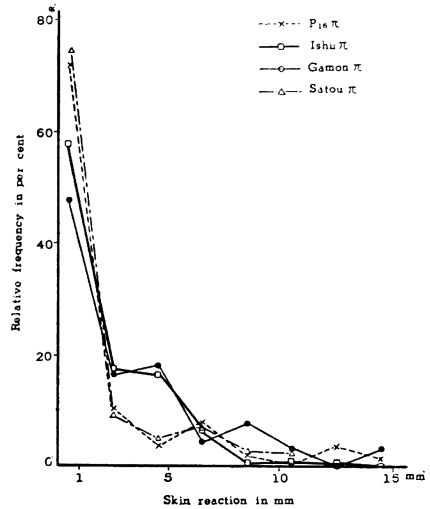


Table 2. 95 and 99 Per Cent Points of Cumulative Frequency Curve for the Junior High School Students and Healthy Adults whose Skin Reactions to 0.15 mcg of H<sub>37</sub>Rvπ were Measured Less than 5 millimeters

Antigen	Junior high school students		Healthy adults	
	95% points	99% points	95% points	99% points
P <sub>16</sub> π	7 mm	11 mm	7 mm	11 mm
Ishiiπ	5	7	9	13
Gamouπ	9	15	11	15
Satouπ	—	—	7	11

佐藤π 7mm と 11mm となる。以上の結果、中学生、成人の人型菌未感染群における95%および99%の者が含まれる上限値は表2のごとくになる。すなわち中学生では非定型πの95%上限値は5~9mm、99%上限値は7~15mmとなり、成人では95%上限値7~11mm、99%上限値は11~15mmとなる。成人の上限値は中学生より若干大きく、また蒲生πは他の非定型菌πより大きい傾向を示す。しかしこれらの上限値は人型菌π反応陰性者より求めたものであり、この群の中には非定型菌感染者も少数含まれているかもしれないので、非定型菌未感染者のみでの非特異反応の上限値は上記の上限値より若干小さいとも考えられる。また野辺地<sup>51)</sup>、前田<sup>39)</sup>らにより人型菌πの陰性者の非特異反応の上限値は5~9mmにあるとみなされており、こうした点を考えあわせると非定型菌πの非特異反応の上限値は、人型菌πの上限値と同様に設定しても問題はないと考えられ

る。したがって人型菌未感染者における非定型菌感染の判定基準としては非定型菌 $\pi$ の反応 4 mm 以下陰性, 5

~9 mm 疑陽性, 10 mm 以上陽性と考えるとよいと思われる。