

原 著

## ELISA による肺結核患者血清中の抗 PPD-IgG 抗体の検出

越 野 健・西 岡 真 二・藤 村 政 樹  
岡 藤 和 博・金 森 一 紀・森 孝 夫  
松 田 保

金沢大学第三内科

北 尾 武・近 藤 邦 夫・林 敏

国立療養所金沢若松病院

受付 昭和 59 年 8 月 23 日

### ELISA FOR IgG ANTIBODY TO PURIFIED PROTEIN DERIVATIVE (PPD) OF PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Takeshi KOSHINO\*, Shinji NISHIOKA, Masaki FUJIMURA, Kazuhiro OKAFUJI,  
Kazunori KANAMORI, Takao MORI and Tamotsu MATSUDA  
Takeshi KITAO, Kunio KONDO and Satoshi HAYASHI

(Received for publication August 23, 1984)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for IgG antibody against purified protein derivative of tuberculin (PPD). PPD antibodies of 15 patients with active pulmonary tuberculosis and 19 patients with inactive patients were measured at admission to hospital. The control material consisted of 7 healthy blood donors and negative sera consisted of 7 healthy umbilical cord bloods. The mean antibody levels correlated to the tuberculosis infection. The mean antibody levels were significantly higher in the active tuberculosis patients than in the inactive patients. The mean antibody levels were higher in the active patients than in the controls. The mean antibody levels in the patients, within 6 months after stopping the discharge of bacilli, were still as high as in the active patients.

We thought that this assay was very simple and useful for diagnosis of the tuberculosis patients.

**Keywords :** Tuberculosis, Diagnosis, Purified protein derivative, Enzyme-linked immunosorbent assay, IgG, Antibody

**キーワード :** 結核, 診断, ツベルクリン蛋白, 酵素免疫試験; ELISA, 免疫グロブリン G; IgG, 抗体

\* From the 3rd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, 13-1 Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920 Japan.

## はじめに

1950年以降結核患者が激減した大きな要因として2つ考えられる。まず第一は、戦後の食糧事情の改善による国民の栄養状態の向上である。しかし、現在でも結核患者の栄養状態を調べると、北尾ら<sup>1)</sup>は90%以上の患者に malnutrition が認められ、結核治療に際して重要な因子であると強調している。第二にツベルクリン反応（以下ツ反反応と略す）による結核の初期感染のスクリーニングと、BCG 接種による早期免疫の確立である。現在早いところでは生後6ヵ月の乳児期にBCG接種を行っており、健康人の82.1%はツ反陽性となっている<sup>2)</sup>。このことは逆にツ反の陽性であることが結核の診断の必要条件ではなくなっている。現在でも肺結核の診断には、胸部写真と喀痰検査によるところが多いが、喀痰陽性とならない場合、治療開始にとまどうことが多く、諸家の臨床家を悩ませている。

今回著者らは、結核患者の血中にツ反の抗原である purified protein derivative (PPD) 抗原に対する特異的 IgG 抗体を、マイクロプレートを使用した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定しようと試み、診断および治療の一つの手がかりとしての検討を行なったので報告する。

## 対象および方法

## 1) 患者血清

国立療養所金沢若松病院入院中の結核患者34名で、その内訳は検査時排菌陽性患者15名を活動型（以下 active MTB と略す）、排菌の止っている患者19名を非

活動型（以下 inactive MTB と略す）と仮に分類し、それらの患者から3 ml 採血して血清分離し、使用まで-20℃で保存した。

## 2) コントロール血清

結核の既往歴のない健康妊婦の出産した健康児の臍帯血（以下 cord blood）を10ml 採取し、血清分離して-20℃で保存した。

## 3) ELSA (enzyme-linked immunosorbent assay) による PPD に対する特異的 IgG の測定 (図1)

(1)96個の well をもつマイクロプレート (Pinafech Laboratories, Inc. Alexandria, Uirgina U. S. A.) の well に0.1M NaHCO<sub>3</sub>液に溶かした50μg/ml の PPD 抗原 (日本ビーシージー社製 N.M49-1) 100μl を入れ、37℃で90分間 incubation した。アスピレーターで PPD 液を吸い取った後、pH7.4 の PBS にて3回洗浄し、PBS に溶かした5%ウシ血清アルブミン (BSA) の200μl を入れ、4℃で一晩放置した。

(2)アスピレーターで吸い取った後、pH7.4 の PBS にて3回洗浄し、患者血清を100倍に希釈し、その100μl を well に入れ37℃で45分間 incubation した。患者血清の至適濃度は種々の希釈液を作って予備実験を行なって決定した。

(3)アスピレーターで吸い取った後、pH7.4 の PBS で溶かした0.5% BSA 溶液で3回洗浄した。アルカリフォスファターゼ標識抗 IgG (TAGO 社製 LOT901004) を0.5% BSA 入り PBS にて1,000倍に希釈し、各 well に100μl ずつ加え、37℃で45分間 incubation した。

(4)(3)と同様に0.5% BSA 入り PBS で3回洗浄した後、使用直前にエチレンジアミン液で溶かした p-nitrophenylphosphate (Sigma 社製) 液100μl を加え、20分間室温に放置した。

(5)1 N-NaOH を50μl ずつ加え、反応を停止させた。各 well の吸光度 (OD405nm) をダイナテック社オートリーダー MR-580にて測定した。

操作はすべて duplicate で行ない、またマイクロプレート間の性質の違いから生ずる誤差を除くために、抗体の測定は1枚のプレートで行なった。

有意差検定は、Students' unpaired t-test で  $p < 0.05$  を有意とした。

## 結 果

## 1. 患者血清の最適希釈度の検討

図2は排菌患者6例、非排菌患者6例より採血した血清および健康新生児6例の臍帯血 (cord blood) の血清を10倍、10<sup>2</sup>倍、10<sup>3</sup>倍、10<sup>4</sup>倍に希釈した希釈系列に、アルカリフォスファターゼ標識抗 IgG の1,000倍希釈を加えた時の結果である。排菌患者血清では、10倍希釈よりも100倍希釈の方が吸光度が高い。非排菌患者血清も cord blood の血清も10倍希釈では吸光度がかなり高

## 1) Coating of PPD antigen

PPD 5 μg/well in microplate  
↓  
incubation for 90 min at 37°C  
↓  
wash 3 times in PBS (pH7.4)  
↓  
200 μl/well of 5% BSA  
↓  
overnight at 4°C  
↓  
wash 3 times in 0.5% BSA (pH7.4)

## 2) Assay of samples

100 μl/well of sample serum diluted with 5% BSA  
↓  
incubation for 45 min at 37°C  
↓  
wash 3 times in 0.5% BSA  
↓  
100 μl/well of Alk.,-phosph.,-conj., anti-IgG  
↓  
incubation for 45 min at 37°C  
↓  
wash 3 times in 0.5% BSA  
↓  
100 μl/well of p-Nitrophenylphosphate  
↓  
incubation for 20 min at 20 to 25°C  
↓  
stop with 50 μl/well of 1 N NaOH  
↓  
read at OD 405 nm

図1 マイクロプレートを使用したELISA法による PPD-IgG 抗体の測定

いが、cord bloodの方は $10^2$ 倍、 $10^3$ 倍、 $10^4$ 倍希釈の吸光度がほぼ同じであり、非排菌患者の方は $10^3$ 倍、 $10^4$ 倍ではほぼ同じとなった。このことより100倍希釈の血清が最適と考えた。

2. 抗 PPD-IgG 抗体の測定

1により被検血清を100倍に希釈し、アルカリフォスファターゼ標識抗 IgG と反応させ、P-ニトロフェニールで発色させた時の吸光度は図3のようになった。排菌患者血清では、吸光度の高いものが多く、15例の平均は $0.74 \pm 0.30$  (mean  $\pm$  S.D.) であった。非排菌患者19例の平均は $0.42 \pm 0.32$ であり、特に排菌が止ってから6ヵ月以内の患者血清(白い四角印)では比較的高いものが多いが、排菌が止って6ヵ月以上の患者血清(白丸)では殆んど吸光度が0.4以下であった。排菌患者15例と非排菌患者19例の吸光度を比較すると、排菌患者の方が $p < 0.01$ で有意に高かった。また、cord bloodの血清の平均値は $0.07 \pm 0.003$ と非常に低く、排菌患者および非排菌患者ともに cord bloodのそれよりも有意に高かった。

考 察

結核患者血清中に結核菌に対する液性因子の存在することは古くから Middle brook ら<sup>3)</sup>により知られていた。しかし、Mackness<sup>4)</sup>により結核の免疫機構の主役は、T細胞とマクロファージであると報告されて以来、結核の免疫学的検討は細胞性免疫の分野で活発となり、結核腫の発生機序が解明されるようになった。しかし、慢性感染症である肺結核においても、血清中の IgG, IgA

等が増加することが知られており<sup>5)</sup>、結核菌に対する生体の防御機構によるものが考えられる。そこで、PPD 抗原に対する特異的抗体を検出することは、その感染の有無の手掛りとなることが考えられる。著者らの研究では、マイクロプレートの well 壁に PPD 抗原を  $5 \mu\text{g}/\text{well}$  くっつけた。その後非特異的免疫グロブリンがくっつくのを防ぐために、各々の well を 5% BSA にて coating し、更に患者血清を加えて、血清中の PPD に対する特異的抗体と反応させた。その後アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG と反応させて、P-ニトロフェニールにて発色させた。図3で示したように、排菌患者血清 ( $n=15$ ) では吸光度は $0.74 \pm 0.30$ と抗 PPD-IgG 抗体が多いことが示された。また、排菌が止り6ヵ月以内の患者血清 ( $n=7$ ) では吸光度は $0.73 \pm 0.32$ とその量がまだ比較的多い例もみられるが、排菌が止り6ヵ月以上治療している患者 ( $n=12$ ) では、吸光度は $0.25 \pm 0.06$ と抗 PPD-IgG 抗体の量は少ないものと考えられ、結核の活動の低下とともに、特異的抗体の産生能も低下することがうかがわれる。

また、同方法で測定した結核の既往歴のない健常人の血清 ( $n=7$ ) では、(未公表データ)吸光度は $0.18 \pm 0.05$ であった。このことは、cord blood ( $n=6$ )の吸光度が $0.07 \pm 0.003$ であることを考えると、健常人でも PPD に抗する抗体産生の成立が BCG 等の機会になさ

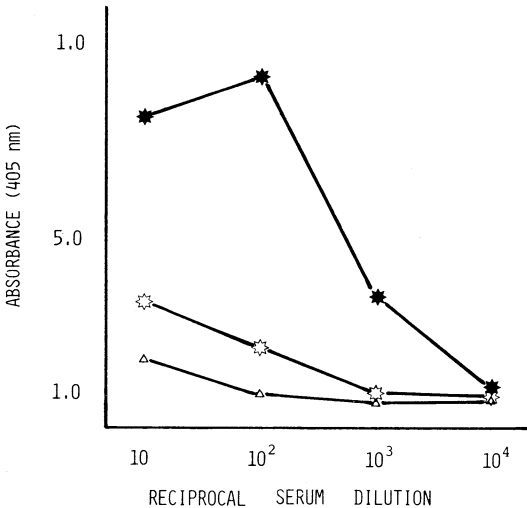


図2 血清希釈と PPD-IgG 抗体の吸光度 (OD405nm)

- : 排菌患者血清 (n=6)
- : 非排菌患者血清 (n=6)
- △-△: 臍帯血の血清 (n=6)

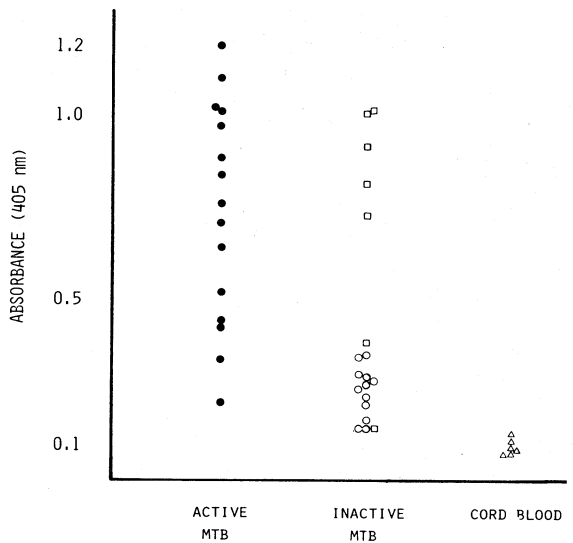


図3 活動型結核、非活動型結核および臍帯血の血清中の PPD-IgG 抗体の吸光度 (OD405nm)

- : 排菌患者血清 (n=15)
- : 排菌が止り6ヵ月以内の患者血清 (n=7)
- : 排菌が止り6ヵ月以上の患者血清 (n=12)
- △: 臍帯血の血清 (n=6)

れていることがうかがわれる。

いま健常人の吸光度の平均+2S.D.を求めると0.28となり、排菌者15例のうち0.28以下の者は1例のみで、他の93.3%以上は0.28以上である。排菌が止り6ヵ月以上の患者12例では0.28以下は9例75%がみられる。

以上の所見より著者は、抗 PPD 抗体の吸光度が0.3以上を陽性と考え、0.4以上は強陽性として結核の治療開始してよいと考える。また、排菌が止り6ヵ月間は同様な強化療法を続けることが望ましいと考えている。

また、結核の液性免疫の成立についても検討していきたいと考えている。

### ま と め

マイクロプレートを使用した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による抗 PPD-IgG の検出法を考案し、肺結核患者血清中の抗 PPD-IgG 抗体を測定した。排菌患者では吸光度が $0.74 \pm 0.30$ と高く、排菌が止り6ヵ月以内の患者でも $0.73 \pm 0.32$ と高かったが、排菌が止り6ヵ月以上の患者では $0.25 \pm 0.06$ であり、健常人では $0.18 \pm 0.05$ で、結核感染のないと考えられる新生児の cord blood では $0.07 \pm 0.003$ であった。これらの結果より、少量の血清で一度に多数の抗体を簡便に検査できる ELISA 法により特異的抗 PPD

抗体を測定することは、結核の治療および診断に有用であると考えられた。

### 謝 辞

臍帯血を提供して下さった金沢大学産婦人科大崎勝三先生に深謝いたします。

尚、この論文の要旨の一部は、第122回内科学会北陸地方会にて発表したものである。

### 文 献

- 1) 北尾武他：結核患者の栄養学的評価，結核，58：645，1983.
- 2) 泉孝英：ツベルクリン反応の臨床的意義，結核，58：541，1983.
- 3) Middlebrook, G. and Dubos, R. J. : Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli, J Exp Med, 88 : 521, 1948.
- 4) Mackaness, G. B. : Resistance to intracellular infection, J Inf Dis, 123 : 439, 1971.
- 5) 志摩清他：肺結核患者における免疫グロブリンの動態に関する研究，結核，51：337，1976.