

原 著

補体フィルム膜を用いた結核補体結合反応の臨床応用

高井 晶子・室本 仁・倉田 昌彦

北野病院検査部・内科・胸部外科

永井 彰

国立療養所紫香楽病院呼吸器科

友田 恒典

大阪医科大学病態検査学教室

受付 昭和60年12月25日

CLINICAL APPLICATION OF SINGLE RADIAL COMPLEMENT FIXATION TEST WITH COMPLEMENT FILM AS A DIAGNOSTIC METHOD FOR PULMONARY TUBERCULOSIS

Akiko TAKAI*, Hitoshi MUROMOTO, Masahiko KURATA, Akira NAGAI and Tsunesuke TOMODA

(Received for publication December 25, 1985)

Single radial immunodiffusion technique using complement film was applied to tuberculous patients in order to evaluate its diagnostic value comparing with the traditional test tube technique (modified Ogata's method). As mycobacterial antigen for the reaction unheated tuberculoprotein was prepared from viable BCG cells.

The results by this new complement fixation test almost coincided with those by the test tube method. The reaction appears to be correlated with the sputum-positivity of tubercle bacilli. Though both serological methods showed negative reaction in 20 to 30 percent of tuberculous patients, only a few positive cases were found in healthy individuals. Thus, the positive reaction is thought to be highly reliable as a criterion of diagnosis.

Because of its technical simplicity, the single radial immunodiffusion method using complement film will be worthy of routine use for the differential diagnosis of tuberculosis.

Key words : Serological diagnosis of tuberculosis, Complement film, Single radial immunodiffusion, Unheated protein from BCG

キーワードズ : 結核の血清学的診断, 補体フィルム, 一元放射免疫拡散法, BCG 由来非加熱蛋白

* From Kitano Hospital, Kamiyamacho, Kitaku, Osaka 530 Japan.

はじめに

肺結核の診断あるいは予後の判定のために、結核血清反応が古くから行なわれてきた。即ち、Middlebrook-Dubos 反応¹⁾や Boyden ら²⁾多くの研究がある。しかし、これらの反応についての臨床的応用の評価については各研究者によって差がある。これは抗原の差、血清反応の術式の違い等の多くの因子が関係していると考えられる。

結核症は主として細胞性免疫が関与していると考えられているが、液性抗体の存在についても多くの報告があり、なお臨床的あるいは基礎的研究の対象として行なわれている。

長尾^{3)~5)}および我々共同研究者は古くから非加熱の結核菌蛋白を抗原とする結核血清反応(補体結合反応)を行なってその臨床的応用の有用性について本誌⁶⁾その他に報告してきたが、補体結合反応を実施する煩雑さのために、一般の検査として応用されることが少なかった。近年、補体結合反応を一元放射免疫拡散法として行なう方法が報告され^{6)~8)}、更に補体フィルム膜を用いる測定方法が開発され、主としてウイルス疾患の検査に应用されている⁹⁾(ウイルス、マイコプラズマの検査に関してはデンカ生研からキットとして発売されている)。そこで我々はこの方法を用いて結核血清反応を行ない、2, 3の知見を得たので報告する。

対象および方法

肺結核の確定診断をうけ、現在治療中の患者および健康者について検討した。

抗原は乾燥 BCG 菌を菌破砕器 (Cell Homogenizer, Braun 社) で破砕し、pH8.2の硼酸緩衝液で24時間抽出し、ついで酢酸で pH4.2として蛋白を遠心沈澱せしめ、沈澱物を pH4.2の酢酸緩衝液で洗浄した後、再び pH8.2の硼酸緩衝液にとかし、20,000rpm で10分間遠沈、残存菌体および破片を除去し、透明な上清蛋白液を得た。蛋白濃度は Lowry法で 200 mg/dl 位となる (BCG 菌と人型菌は共通抗原となることは既に報告¹⁰⁾したが、とり扱いやすい BCG 菌を用いた)。

上記の抗原を用いて補体結合反応を行なった。補体フィルム膜を用いる方法は佐藤ら⁹⁾の方法に準じた。2.2%アガロース(半井化学製)を Veronal 緩衝液 (pH 7.5) で溶解し、40~45°Cに保ち、その10.6mlに1.5%感作赤血球 8.4 ml, 40倍抗原 1.5 ml を加え良く攪拌後すばやくプレートにかため、3.5 mm径の孔をパンチして調製した。

血清は56°C30分で不活化して原液のまま10 μ lずつマイクロシリンジで注入、血清がアガロースゲル内に十分浸透後、補体フィルム膜(デンカ生研製)をのせて、水

室で一晩反応させる。翌日補体フィルム膜をのぞき、37°Cで溶血するまで(約2時間)反応させる。反応後直径5mm以上の不溶血リングの生じたものを陽性とした(図1参照:一元放射補体結合反応, プレート法と略す)。

試験管法による補体結合反応はさきに報告¹⁰⁾したとおり梅毒の補体結合反応の緒方法に準じて実施した(試験管法と略す)。判定は5倍以下は陰性, 10倍は疑陽性, 20倍以上は陽性とした。

結果

1) 結核補体結合反応のプレート法と試験管法の比較
プレート法と従来我々が行なってきた試験管法を比較した《結核患者, 即ち肺結核確診にて治療中の者50例(治療型6例を含む。この6例は治療終了後6カ月以内の例), 非結核および健康者15例, 計65例)》。

図2に示すごとく、プレート法が陽性であった32例は試験管法でも20倍以上の陽性であり、全例は結核であった。プレート法で陰性の33例は試験管法で疑陽性17例、陰性16例であった。即ち、両方法にはほぼ平行関係が認められた。

2) 病型および排菌との関係

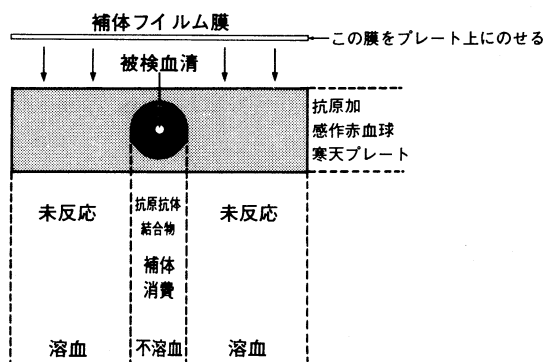


図1 補体フィルム膜を用いた一元放射補体結合反応

結核患者50例について排菌(培養判定)の有無別に両方法を比較検討した。

表1に示すごとく病型I, II, III型のうち排菌(+)の18例はプレート法, 試験管法の両法とも陽性であった。排菌(-)の結核患者中32例中14例はプレート法, 試験管法とも陽性であった。病型よりも排菌の有無と結核血清反応の陽性度とは関係がある傾向を認めた。

3) 結核患者および健康者の試験管法による結核補体結合反応

結核患者の試験管法による補体結合反応の成績については既に報告しているが、その後の追加例数も加えた成績を参考までに表2に示した。結核患者でも陰性例およ

試験管法	陰 性	疑 陽 性	陽 性		
	5×	10×	20×	40×	80×≤
プレート法	●●●●● ●●●●● ●●●●●	●●●●●● ●●●●●● ●●●●●●			
-					
+			●●●●● ●●●●● ●●●●●	●●●●● ●●●●● ●●●●●	●●●●● ●●●●● ●●●●●

図2 結核補体結合反応のプレート法と試験管法の比較

表1. 結核病型と排菌よりみた結核補体結合反応（二方法）

		肺 結 核 (病 型)								肺結核治癒型	非結核 および 健康者
		I		II		III		IV		V	
		排 菌		排 菌		排 菌		排 菌		排 菌	
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	
プレート法	-	1	0	4	0	4	0	4	0	5	15
	+	0	1	6	15	3	2	4	0	1	0
試験管法	5×および5×以下	1	0	1	0	1	0	0	0	0	13
	10×	0	0	3	0	3	0	4	0	5	2
	20×および20×以上	0	1	6	15	3	2	4	0	1	0

表2. 結核患者および健康者の結核血清反応

結核補体結合抗体	結 核 患 者		健 康 者	
	例 数	百分率	例 数	百分率
5×および5×以下	54	9.6	83	91.2
10×	89	15.9	4	4.4
20×	173	30.9	4	4.4
40×	144	25.7	0	0
80×	58	10.4	0	0
160×および160×以上	42	7.5	0	0
合 計	560	100	91	100

び疑陽性例が25.5%認められた。また、健康者でも疑陽性、陽性例が低率であるが数例認められた。

考 察

結核症の免疫については古くから多くの研究がある。細胞性免疫に関してはツベルクリン反応が代表的なものであり、現在も広く臨床的に応用されている。一方、液性免疫についても抗体の存在が研究され、これに関して最近でもなお報告^{11)~15)}がなされている。また、診断的応用としては、Middle Brook-Dubos反応以来多くの報告^{12)~15)}がある。そして、これらはツ反応のごとく既往の感染の有無を検査するのではなく、結核症の診断に応用されてきた。

近年結核症の減少とともに、またその診断の比較的容易さのため、結核血清反応の意義はうすれてきたことも事実である。しかし、肺癌やその他の非結核性疾患の増加により鑑別診断のための有用性も残っていることも考えられる。しかし、特異性の高い抗原が入手しがたいことや、術式の煩雑さ等から一般に普及しなかったとも言える。

我々は結核菌非加熱蛋白を抗原とする結核血清反応を古くから行ない、その成績を報告してきた。我々がアレルギーに行なっている方法は補体結合反応を応用したもので、確かに術式としては面倒であることは否定できなかった。

近年ウイルス性疾患の判定のための補体結合反応の簡易法として補体を吸着させたフィルム膜を用いる方法が開発され、主としてウイルス、マイコプラズマ等の疾病の診断に応用されつつある。そこで本研究では、このフィルム膜を利用して結核補体結合反応を行なって従来の試験管法と比較検討してみた。従来の試験管法に比べ、簡易性は非常にすぐれており、スクリーニングテストとして充分結核症の診断に応用しうると考えられた。試験管法による最近の検査成績も附記したが、いずれの方法によっても臨床症状とは合致しない場合があり、結核血清反応が陰性の場合でも結核を否定することはできないので、その解釈には慎重でなければならないことは言うまでもない。結核菌の検索などとともに行なわれることが望ましいと考えられる。病型よりも排菌の有無とよく相関するようであった。なお非結核患者、健康者の陽性率は10%以下であり(プレート法では全例陰性)、本反応陽性の場合には結核の疑いが濃厚となると考えてよいと思われた。

以上、補体フィルム膜を応用した結核補体結合反応は簡便であるため、結核と非結核性の疾患の鑑別診断の検査の1つとして、スクリーニング法として臨床的応用の有用性があると考えている。

ま と め

結核患者について、BCG菌の非加熱蛋白を抗原とす

る結核補体結合反応を、補体フィルム膜を用いた一元放射免疫拡散法(プレート法)として行ない、従来の試験管法と比較した。試験管法で20倍以上の陽性を示した血清では、プレート法で直径5mm以上の不溶血リング(陽性)を示し、両方法はよく相関することを認めた。

結核患者でも陰性あるいは疑陽性(試験管法)を示すものが両方法とも20~30%にみられた。一方、非結核患者および健康者の陽性率は10%以下であった。

プレート法による補体結合反応は従来の試験管法と比べて簡易に行なわれるから、結核症の血清反応として一応試みる価値があると思われた。

文 献

- 1) Middlebrook, G., and Dubos, R. J. : Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli, *J Exp Med*, 88 : 521, 1948.
- 2) Boyden, S., and Sorkin, E. : A study of antigens active in the tannic acid hemagglutination test present in filtrates of culture of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Immunol*, 75 : 15, 1955.
- 3) 長尾四郎, 友田恒典他 : 肺結核患者血中の結核菌蛋白に対する沈降抗体と補体結合抗体, *結核*, 43 : 23, 1968.
- 4) 長尾四郎, 友田恒典, 馬島治平 : 肺結核症の血清諸反応の比較, *アレルギー*, 15 : 255, 1966.
- 5) 長尾四郎他 : 結核補体結合反応の臨床応用の基礎, *北野病院紀要*, 15 : 19, 1970.
- 6) Haaheim, L. R. : Single-radial complement-fixation: a new immunodiffusion technique, 2, Assay of the antibody response to the internal antigens (MP and NP) of influenza A virus in human sera after vaccination and infection, *Dev Biol Standard*, 39 : 481, 1977.
- 7) Haaheim, L. R. : Single-radial complement fixation : a new immunodiffusion technique, Assay of the antibody response to the typespecific antigens of influenza virus in post-infection human sera, *Bull WHO*, 56 : 111, 1978.
- 8) Niwayama, S., et al. : Study on single radial complement fixation (SRC-Fix) test, *J Virol Methods*, 2 : 261, 1981.
- 9) 佐藤征也他 : 新しい抗原抗体測定法 : 補体フィルム膜を用いた Single Radial Complement Fixation (SRCF) 試験法について 1. インフルエンザウイルス抗体価の測定, *臨床とウイルス*, 9 : 479,

- 1981.
- 10) 川上良澄, 高井晶子他: 結核菌体蛋白を抗原とした補体結合反応の臨床的応用, 北野病院紀要, 10: 356, 1965.
 - 11) Grange, J. M., et al.: Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA): A study of antibodies to mycobacterium tuberculosis, in the IgG, IgA and IgM classes in tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease, Tubercle, 61: 145, 1980.
 - 12) Grange, J. M., et al.: Specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in tuberculosis, Tubercle, 61: 153, 1980.
 - 13) 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.
 - 14) 越野 健他: ELISAによる肺結核患者血清中の抗PPD-IgG抗体の検出, 結核, 59: 621, 1984.
 - 15) Takahashi, Y.: Specific serum agglutination of kaolin particles sensitized with tubercle phosphatide and its clinical evaluation as a sero diagnostic test for tuberculosis, Am Rev Respir Dis, 85: 708, 1962.