

原 著

結核患者の血清学的診断における ELISA 法の検討

長 江 晴 男 ・ 三 浦 俊 弘

ゼリア新薬工業株式会社

劉 朝 漢

埼玉県立小原療養所

高 橋 宏

国立予防衛生研究所細胞免疫部

受付 昭和 62 年 5 月 28 日

IMPROVEMENT OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR
THE SERODIAGNOSIS OF ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS

Haruo NAGAE*, Toshihiro MIURA, Chokan LIU and Hiroshi TAKAHASHI

(Received for publication May 28, 1987)

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for detection of IgG antibodies to purified protein derivative (PPD) and specific substance of mycobacterium (SSM) in sera of patients with pulmonary tuberculosis. The antibody levels were determined by ELISA on 36 specimens from patients with pulmonary tuberculosis and 24 specimens from healthy tuberculin-positive individuals. The antibody levels were obtained by the use of serial dilution of given reference positive serum to prepare a calibration scale of general validity. The mean IgG antibody levels were significantly higher in the patients than in the control subjects. The covariation of the ELISA results with the two antigens (PPD, SSM) was highly interdependent.

SSM was used for passive hemagglutination assay to test sera from patients and from control subjects. The serologic discrimination between patients and healthy skin test-positive subjects was better in ELISA than in passive hemagglutination assay.

Key words : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Purified protein derivative (PPD), Specific substance of mycobacterium (SSM), Tuberculosis, IgG, Antibody

キーワード : 酵素免疫測定法 (ELISA), 精製ツベルクリン (PPD), 結核菌体抽出物質 (SSM), 結核, 免疫グロブリン G (IgG), 抗体

* From the Zeria Pharmaceutical Co., Ltd., 1212, Khonan-machi, Osato-gun, Saitama 360-01 Japan.

はじめに

近年、酵素抗体法 (ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay) を肺結核患者における液性抗体の検出に活用し、血清学的診断を試みた報告¹⁾⁻⁴⁾が見られるようになった。R. C. Randin^ら⁵⁾は精製ツベルクリン (PPD : purified protein derivative) を抗原として用い、ツベルクリン皮膚反応 (ツ反) 陽性及び陰性健康者並びに、活動性肺結核患者の IgG, IgA, IgM, IgE 抗体を酵素抗体法により比較検討し、IgG 抗体レベルが結核症と最も密接な関連を呈示したと報告している。また、J. M. Grange^ら⁶⁾⁷⁾は BCG 可溶性抗原を用いた同法によって肺結核症、サルコイドーシス症、Crohn's 病患者血清の IgG, IgM, IgA 抗体価を、健康者血清と対比して調べたところ、肺結核症では IgG 抗体が有意に高いことを報告している。T. M. Daniel^ら⁸⁾⁻¹⁰⁾も各種抗酸菌から種々の抗原を分離精製し、酵素抗体法における肺結核患者血清中の抗体検出抗原について、それらの抗原活性を比較検討し、人型結核菌由来の精製細胞質蛋白質である Antigen 5 の有用性を見出し報告している。しかし大多数の報告は従来の酵素抗体法をそのまま実験に導入しており、結核抗体測定における本法の実験条件については、十分な基礎的検討は行われていない。従って、その実験方法及び判定方法は各研究者により一様でないことから、それぞれの実験成績を同レベルで判断することは難しく、そのため実験条件に検討すべき余地があると思われた。

今回は上記の観点より、まず結核患者血清の IgG 抗体価測定を目的とした酵素抗体法の適切かつ一定の実験条件を設定するために、PPD 及び結核菌体抽出物質である SSM¹¹⁾を抗原として検討した。次いで、肺結核患者及びツ反陽性健康者の IgG 抗体を調べ、その臨床的有用性をいくらかでも明らかにするために、従来から結核患者血清の液性抗体価測定法として利用されてきた、Middlebrook-Dubos 赤血球凝集及び溶血反応 (MD 反応)¹²⁾の結果と比較した。その成績をここに報告する。

材料及び方法

1) 被検血清

活動性肺結核患者 36 例 (埼玉県立小原療養所 20 例、他 16 例) 及び結核既往歴のないツ反陽性健康者 24 例の血清を、56℃ 30 分により非働化して用いた。

なお、活動性肺結核患者 20 例 (小原療養所) の血清を混合標準血清として用いた。

2) 抗原

PPD : 試験管内検査用抗原 CIP (日本ビーシーエー製造株式会社製)

SSM : 人型結核菌体抽出物 (ゼリア新薬工業株式

社製)

を使用した。

3) 標識抗体

アルカリフォスファターゼ標識ヒト IgG 精製ヤギ抗体 (γ -chain specific : Sigma) を PBS-Tween (0.05% Tween 20 添加リン酸緩衝液) で希釈して用いた。

4) 基質

p-nitrophenyl phosphate (Sigma 104) を 1 mg/ml (基質用緩衝液) として用いた。

5) 赤血球

市販の綿羊保存血 (日本バイオテスト研究所製 : ヒツジ血球に対して等量の Alserver 液を加えたもの)

6) 補体

市販の乾燥補体 (デンカ生研社製) を PBS で 8 倍に希釈し用いた。

7) ELISA による PPD 及び SSM に対する特異 IgG 抗体の測定

96 well マイクロタイタープレート (Nunc-Immuno Plate II) に PPD または SSM の coating buffer 溶液を 200 μ l ずつ分注し、氷室 (4℃) 内に一夜静置する。次いで、各抗原溶液を PBS-Tween にて 3 回洗浄後、PBS-Tween による被検血清の希釈液を 200 μ l 加え、室温に一定の時間放置して反応させる。更に、PBS-Tween で 3 回洗浄後、標識抗体を 200 μ l ずつ加え、室温で一定時間放置する。再び PBS-Tween で 3 回洗浄後、基質を加え 37℃ で 30 分間 incubate する。5 M-NaOH 100 μ l を添加して反応を停止し、405 nm の吸光度を測定 (東洋測器 ELISA Analyzer ETY-96) する。

8) MD 反応

詳細は三浦^ら¹³⁾の方法に従い実施した。SSM 1mg (アラビノース換算糖含量)/ml PBS 溶液の 6 ml に、洗浄した綿羊赤血球 0.1 ml を加え 37℃ 2 時間 incubate 後洗浄し、PBS にて 0.5% 感作赤血球を調製した。その後、被検血清を 10 倍から倍数希釈を行い、等量の 0.5% 感作赤血球と混合し 37℃ 2 時間 incubate を行った。次いで氷室 (4℃) にて一夜静置後、凝集の有無を肉眼で判定した。溶血の判定は、補体を加え振盪し、37℃ 1 時間 incubate して行った。抗体価は凝集あるいは溶血の確認された希釈倍数を対数変換 (抗体価 = \log_2 (希釈倍数/5)) したもので示した。

結 果

1) ELISA 法実験条件の検討

(1) 抗原濃度 (図 1)

1,000 倍及び 64,000 倍の標準血清希釈液を用い、well に吸着させる抗原濃度を検討した。PPD または SSM

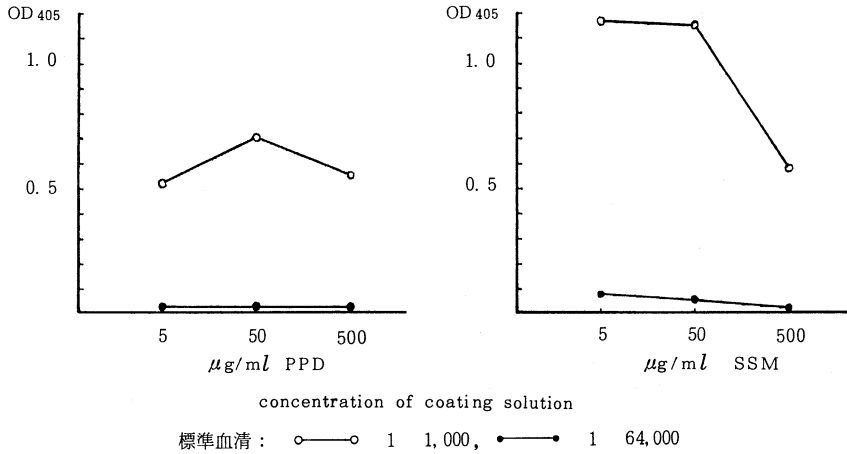


図1 抗原濃度による標準血清の吸光度

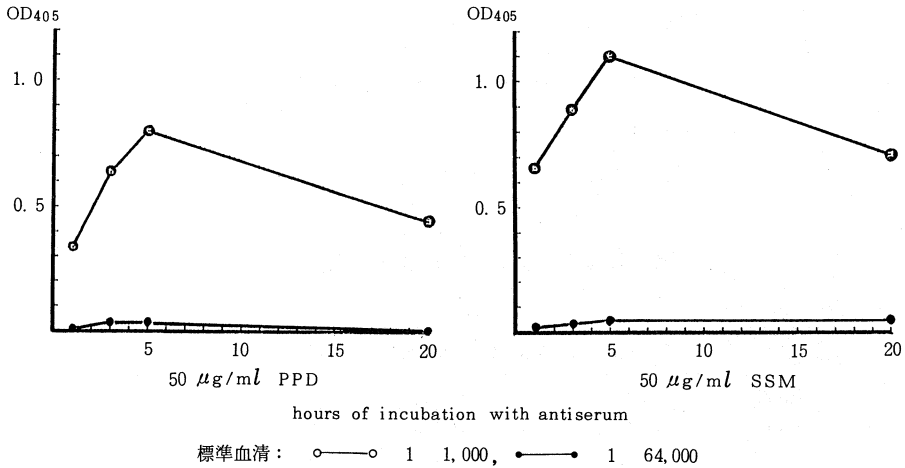


図2 標準血清の反応時間による吸光度

の5, 50及び500 µg/mlの3濃度のうち、標準血清2濃度間の吸光度差を最も大きく示した抗原濃度はPPDでは50 µg/mlであり、SSMではそれが5及び50 µg/mlの両濃度に同程度に見られた。500 µg/mlの抗原濃度ではPPDもSSMもともに、標準血清の1,000倍希釈液の吸光度が低くなることが分かった。以上のことよりその後の実験ではPPD, SSMともに50 µg/mlを用いた。

(2) 被検血清の反応時間 (図2)

50 µg/mlのPPDまたはSSMを吸着させたwellに、(1)と同様の標準血清を加え室温で1, 3, 5及び20時間作用させた。これらの中から最良の反応時間を選んだところ、血清添加後5時間の吸光度がピークを示し、それが最適であることが観察された。

(3) 標識抗体の反応量 (表)

標識抗体を200倍, 2,000倍, 20,000倍の3段階に希釈し標識抗体の反応量を比較した。標識抗体の反応は室温で3時間行った。PPD, SSMともに2,000倍のものが、(1)と同様の標準血清の2濃度間における吸光度差を最も大きく示しており、実験条件としては2,000倍希釈濃度液を選んだ。

上述の検討結果より決定したELISA法を、図3に示した。この方法により標準血清を100倍より10倍希釈を行い、100,000倍までの標準曲線を作成した結果、1,000倍希釈より高濃度においては吸光度の上昇が頭打ちとなり、検量線として使用可能な標準血清濃度は1,000倍以上の希釈を行った範囲であった。その後は、試験毎に標準血清(1,000-64,000倍)にて検量線(回帰式:

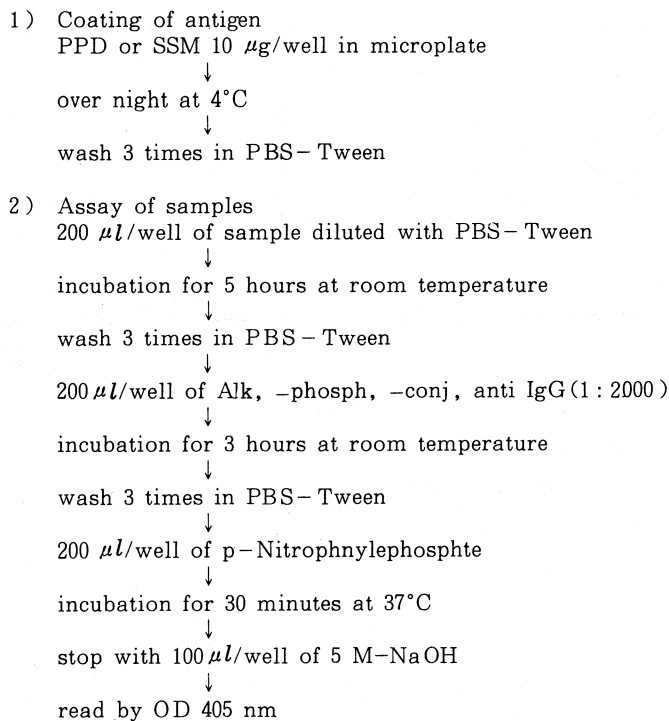


図3 ELISAによる抗結核IgG抗体測定法

表 標識抗体量による標準血清の吸光度

Coating Ag	P			S		
Conjugate	1:200	1:2000	1:20000	1:200	1:2000	1:20000
St. serum						
1:1000	0.341	0.659	0.372	0.641	1.013	0.610
1:64000	0.014	0.028	0.008	0.019	0.056	0.022
△	0.327	0.631	0.364	0.622	0.957	0.588

$\log Y = \log X + a$ を作成し、被検血清の吸光度 (OD) を抗体価 $= 10^{(\log OD - a)/b}$ × 希釈倍数 × 10 の計算式にあてはめその抗体価を算出した。操作はすべて4回の繰り返しで行い、正規分布に関する棄却検定法により測定値を検定した。

2) 一定条件下のヒト血清 IgG 抗体価の測定

(1) ヒト血清 IgG 抗体価 (図4)

液性抗体の検出に PPD を用いた場合、その抗体価は、活動性肺結核患者群では 8.2 ± 17.2 (mean ± S. D.) であり、ツ反陽性健康者群では 0.6 ± 0.5 であった。統計学的処理による有意差検定では両者間に有意の差が認められた ($p < 0.05$)。この際 SSM に対する抗体価は、患者群では 13.1 ± 19.0 であり、健康者群では 1.5 ± 1.4 であった。同様に統計処理したところ、この場合にも有

意差が認められた ($p < 0.01$)。

(2) PPD 及び SSM の抗原性比較 (図5)

ELISA 用抗原としての PPD と SSM の相関性を検討した。その結果、回帰係数と切片の区間推定より、同じ抗原であるという確かな判定はできないが、相関係数は 0.71 ($p < 0.001$) であり高度な相関が認められた。また、抗結核 IgG 抗体を測定するうえで、ELISA 用抗原としての有用性の点でも、両者の間には大きな差のないことが分かった。

3) MD 反応による凝集及び溶血抗体価の測定 (図6)

SSM 感作羊赤血球による MD 反応凝集価は、患者群では 3.1 ± 1.2 であり、健康者群では 2.2 ± 0.7 であった。その値は健康者群に比べて患者群の方が高く、統計学的

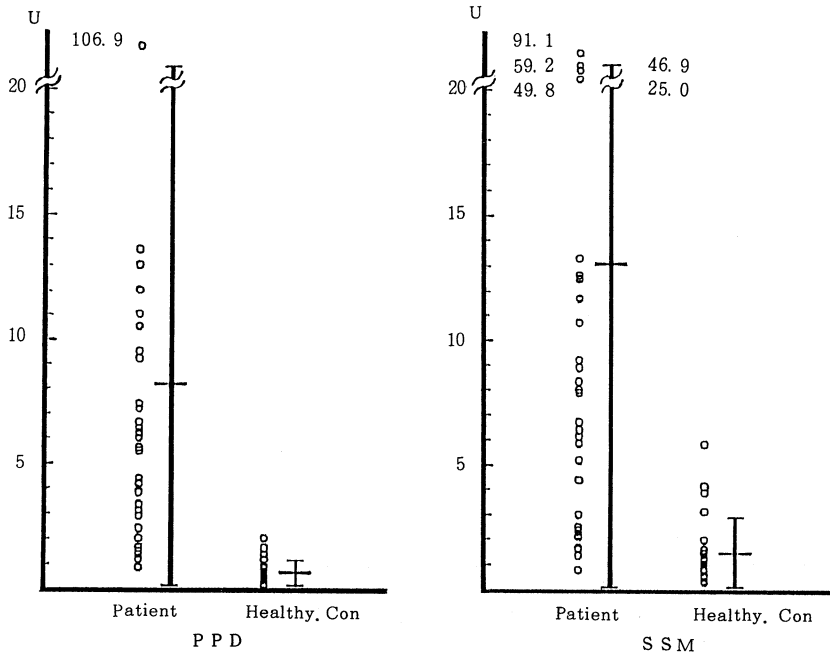


図4 肺結核患者及びツ反陽性健康者における液性抗体価

処理によって両者間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。しかし溶血価では患者群 4.2 ± 1.8 、健康者群 3.7 ± 1.4 の値を示し統計学的な有意差は認められなかった。

考 察

抗体量の測定に極めて鋭敏な検出方法として、ELISA法の有用性を提唱した E. Engvall ら¹⁴⁾ は、同法の実施に先だって実験条件の設定が重要であることを強調している。今回の著者らの実験においても、その点に留意して抗原量、抗血清の反応時間、標識抗体量の設定に、2濃度 (1 : 1,000, 1 : 64,000) の標準血清を用いてELISA法を検討した。その結果、それぞれの実験条件により測定値にかなりの相違を生ずることから、液性抗体量の検出感度を高めるためには、まず実験条件の設定が重要であることが分かった。

実験を始めるに際しては、数社のプレートを使用し予備実験を行ったが、プレートによっては全く反応の認められないものもあり、使用する抗原により、そのプレートとの適合性に違いのあるものと思われた。また、使用可能と判断したプレートでも、プレート内のwell毎にプレートに起因すると思われるバラツキが認められたため、1つの抗体価の測定に4つのwellを使用し、正規分布に関する棄却検定を行い異常と思われる値を除外した。

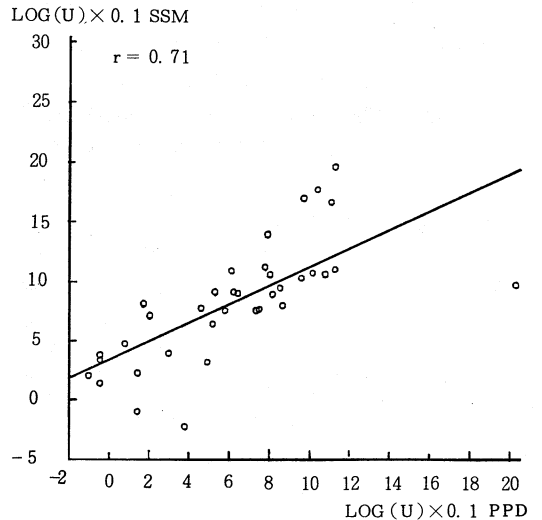


図5 PPD及びSSMを抗原としたELISA抗体価における相関性

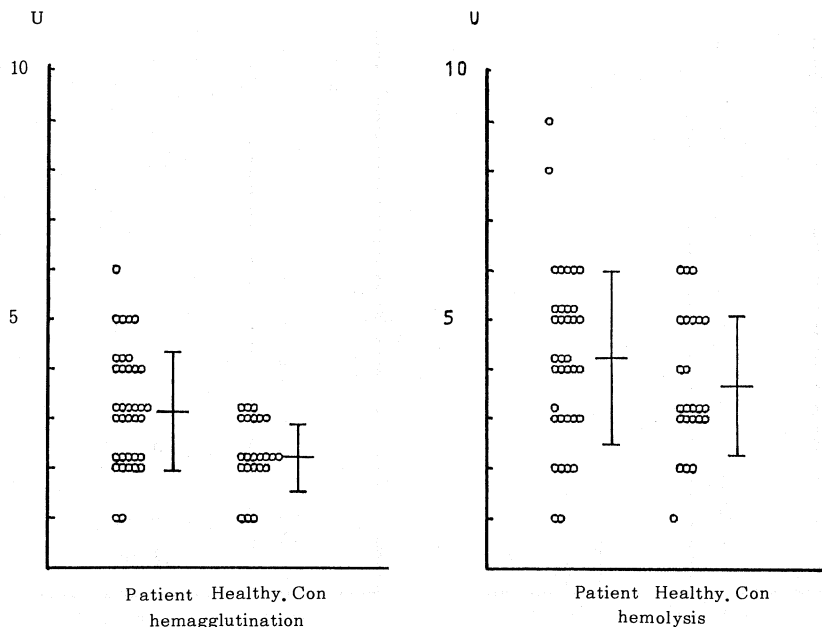


図6 肺結核患者及びツ反陽性健康者のMD反応における力価

被検血清中の抗体価測定は、標準血清を希釈し作成した検量線を用い、相対的な抗対価として算出した。検量線を作成するに際し、標準血清の各希釈液における実測値で、濃度と分散の相関性を検討したところ、対数変換することで相関性が否定されたため、本実験では対数変換の値を用いることとした。検量線を用いる方法は、antitoxoplasma IgGを用いたELISA法においてR. Malvanoら¹⁵⁾が指摘しているように、実験間の値を同レベルで比較することができるなど、本法の普遍性を増すうえにも重要なことと考える。

今回測定した活動性肺結核患者の血中抗体価は、PPD、SSMいずれの抗原を用いた場合でも健康者群に比べ明らかに高い値を示した。なお、これらの成績を対照健康者群のmean+2SDの値を患者としての識別点と考える¹⁶⁾ならば、抗原がPPDの場合75% (36例中27例)、SSMの場合72% (36例中26例)の確率でツ反陽性健康者と肺結核患者を識別することができた。その時にfalse positiveを示した対照健康者は、PPDの場合は24例中2例(8%)であり、SSMの場合には24例中1例(4%)であった。また患者群における抗体価の分散が対照健康者群に比べて大きいことは、個々の患者の結核感染に対する罹患度の相違、化学療法による治癒状況など生体側の応答条件が異なっていることを示唆していると思われる。

抗酸菌関連分野において、ELISA法による血中抗体価が診断上の確立した検査法として報告¹⁷⁾¹⁸⁾されているものに、牛のヨーネ病(*M. paratuberculosis*に起因)がある。この場合にELISA法が重視された背景の一つには、MD反応よりも優れた感度、特異性を示し、陽性反応を示した後は陰性化しないことである。この安定した血中抗体の検出は、腸管壁の菌が定着し消失することなく存在することに起因すると考えられる。しかし、結核では化学療法その他で治癒がみられる場合には血中抗体は低いことが多く、血中抗体価がこれらの変化の診断に役立つものかについて検討した報告¹⁹⁾も出されており、患者群の抗体価の分散が大きいことと結核菌の消長との関連性を調べることも、今後の臨床における研究課題と考える。

ヨーネ病抗体を測定するELISA用抗原として、横溝は¹⁸⁾ PPD、多糖、脂質、全菌体のいずれでも抗体の検出が可能であると述べているが、本実験には人型結核菌由来の2種の抗原を用い検討した。細胞性免疫反応用抗原として種々の実験に使用されているPPDは、ELISA用抗原として抗結核抗体の検出にも利用されており、その主成分は蛋白であることが知られている。SSMは人型結核菌由来の、多糖を主成分とする物質¹¹⁾であり、MD反応抗原として使用すると、旧ツベルクリン液を抗原とした場合と類似した反応性を示すことが、モルモッ

ト及び家兎の結核菌体感作血清を用いた実験で既に認められている²⁰⁾。そこで今回、SSMを抗結核抗体を検出するELISA用抗原として利用したところ、PPDとほぼ同程度の能力を持つことが認められ、ELISA法の抗原としても使用できることが分かった。

更に、SSMを用いELISA法とMD反応における結核患者の液性抗体価検出能を比較したが、感度の鋭敏性ではELISA法の方が優れた方法であることは確かであると言えよう。

結 論

1. 結核患者の液性抗体価をELISA法で測定する場合には、その検出感度を高める上で抗原濃度、反応時間等の実験手技を確立することが重要である。

2. ツ反陽性健康者を対照として肺結核患者の液性抗体価をELISA法で測定したところ、抗PPD抗体価では75%、抗SSM抗体価では72%の確率で患者を識別することができた。

3. 人型結核菌体抽出物質であるSSMは、ELISA用の抗原としてPPDとほぼ同程度の抗結核抗体を検出する能力のあることが分かった。

本論文の要旨は、第111回日本結核病学会関東支部学会において発表した。

文 献

- 1) 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。
- 2) 小西一樹他：肺結核症における抗PPD抗体の測定とその意義，呼吸，3：700，1984。
- 3) Nassau, E. et al. : The Detection of Antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by Microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Tubercle, 57 : 67, 1976.
- 4) Kalish, S. B. et al. : Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique in the differential Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis in Humans, J Infect Dis, 147 : 523, 1983.
- 5) Randin, R. C. et al. : Antibodies to purified Protein Derivative in Different Immunoglobulin Classes in the Diagnosis of Tuberculosis in Man, Int Archs Allergy appl Immun, 70 : 25, 1983.
- 6) Grange, J. M. et al. : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : A Study of Antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in the IgG, IgA and IgM Classes in Tuberculo-

sis, Sarcoidosis and Crohn's Disease, Tubercle, 61 : 145, 1980.

- 7) Kardjito, T. et al. : Diagonosis of Active Tuberculosis by Immunological Methods 1. The Effect of Tuberculin Reactivity and Previous BCG Vaccination on the Antibody Levels Determined by ELISA, Tubercle, 63 : 269, 1982.
- 8) Daniel, T. M. et al. : The Immune Spectrum in Patients with Pulmonary Tuberculosis, Am Rev Respir Dis, 123 : 556, 1981.
- 9) Benjamin, R. G. et al. : Serodiagnosis of Tuberculosis using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of Antibody to *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5, Am Rev Respir Dis, 126 : 1013, 1982.
- 10) Daniel, T. M. et al. : Evaluation of Mycobacterium Antigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Serodiagnosis of Tuberculosis, J Med Microbiol, 18 : 309, 1984.
- 11) 小島 寛他：人型結核菌体熱水抽出物質に関する研究（第1報）多糖成分の化学構造，薬学雑誌，101：713，1981。
- 12) Middlebrook, G. et al. : Specific Serum Agglutination of Erythrocytes Sensitized with Extracts of Tubercle Bacilli, J Exp Med, 88 : 521, 1948.
- 13) 三浦 馨他：結核感作モルモットにおける免疫反応の細胞移入について，アレルギー，15：780，1966。
- 14) Engvall, E. et al. : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA III., J Immunol, 109 : 129, 1972.
- 15) Malvano, R. et al. : ELISA for Antibody Measurement : Aspects Related to Data Expression, J Immunol Methods, 48 : 51, 1982.
- 16) Tandon, A. et al. : Diagnostic Potentialities of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Tuberculosis using Purified Tuberculin Antigen, Tubercle, 61 : 87, 1980.
- 17) Yokomizo, Y. et al. : A Method for Avoiding False-Positive Reactions in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis, Jpn J Vet Sci, 47 : 111, 1985.
- 18) Yokomizo, Y. : Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Using Mycobacterium phlei-Absorbed Serum for the Diagnosis of Bovin Paratuberculosis in a Field Study, JARQ, 20 : 60, 1986.

19) 草野展周 : ELISA 法を用いた活動性肺結核患者の血

清中の PPD と α 抗原に対する IgG 抗体測定の診断的有用性の検討, 結核, 62 : 211, 1986.

20) 長江晴男他 : 未発表.