

原 著

## 結核症及び非定型抗酸菌症患者の特異的抗体価の測定

山本節子・田端一彦・戸井田一郎  
和田雅子・佐藤瑞枝・水谷清二

結核予防会結核研究所

受付 昭和62年5月5日

DETERMINATION OF SPECIFIC ANTIBODY VALUE IN PATIENTS  
WITH TUBERCULOSIS AND ATYPICAL MYCOBACTERIOSIS.Setsuko YAMAMOTO \*, Kazuhiko TABATA, Ichirou TOIDA  
Masako WADA, Mizue SATOU and Seizi MIZUTANI

(Received for publication May 5, 1987)

Determination of specific antibodies to mycobacterial antigen has been in practice with relative simplicity by the introduction of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The prerequisites to ELISA are the specificity of the reaction and reproducibility and stability of the results, but, in addition to such technical problems, one of the most important problem is how to evaluate and explain the results. As for the determination of anti-mycobacteria antibodies in patients sera, many reports have already been published from various laboratories. In these reports, most authors evaluated their results depending on optical density or on the ratio of optical density of the test serum to that of the standard serum (Table 1). But such values are rather arbitrary ones under the specified assay conditions determined arbitrarily by each laboratory. By our preliminary examinations, these values varied remarkably by the minor changes in assay conditions and showed very poor reproducibility. The method of Kusano et al.<sup>12)</sup>, who calculated antibody-titer of a test serum according to the standard curve prepared from the standard serum, appeared to give more objective values than any other methods. However, in addition to a difficulty to keep the standard serum of high antibody-titer to be available any time, their method is only valid where the slope of the optical density-dilution curve of a test serum is identical with that of the standard serum, but it is not a case and the optical density-dilution curve of each serum is quite different each other. If the slope of a test serum is not identical with that of the standard serum, different dilution of the same test serum will give different values as the titer of that test serum.

Considering these problems, we proposed a new method in this paper. The principle of our method is :

- 1) Use six two-fold serial dilutions from 10 to 320 times for each test serum.
- 2) Determine  $\Delta$  OD according to the procedures summarized in Fig. 1 and obtain  $\Delta$  OD vs log (dilution) curve.

---

\* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association 3-1-24 Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

3) Compute a theoretical formula for the linear portion of the curve as  $Y=A_0+A_1(\log X)$ , where  $Y=\Delta OD$  and  $X$  = dilution, after the appropriate correction if necessary.

4) Determine the antibody-titer of the test serum as  $X$ -value at  $Y=0$ .

Antibody-titer obtained by this method was not influenced by the amount and/or potency of either the antigen or the secondary antibody as shown in Fig. 4 and Fig. 5. This method was very stable and reproducible, and gave an objective value which could be statistically manipulated and be compared with the data obtained in different laboratories under more or less different assay conditions.

By this method, we determined the anti-PPD-IgG and -IgM titers of healthy adults and compared with those of patients of tuberculosis and other mycobacteriosis. Anti-PPD-IgG and -IgM titers of healthy control showed logarithmic normal distributions, and normal mean value and normal range were calculated as 190 and 34~1050 for IgG, and 308 and 92~1032 for IgM, respectively. Anti-PPD-IgG titers of active tuberculosis patients and other mycobacteriosis patients, most of the latter have been suffering from the disease due to *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, were significantly high as shown in Fig. 6, 7 and Table 2. No difference was observed between these two patient groups. More specific antigen than PPD should be used to differentiate these diseases. There was no significant difference in IgM titers between patient groups and healthy control.

**Key words** : ELISA, Anti-PPD Antibody, Tuberculosis, Atypical Mycobacteriosis

**キーワード** : ELISA, 抗 PPD 抗体, 結核症, 非定型抗酸菌症

## 序 論

Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) の導入によって、患者血清中の結核菌菌体成分に対する抗体価の測定が、比較的容易に行えるようになり、既にいくつかの成績が報告されている<sup>11-12)</sup>。Table 1 に示すように、これらの報告の大半では、結果の判定に吸光度 (OD) そのまま、または標準血清の OD との比が用いられているが、これらの値は各研究室で設定した測定条件下での、いわば任意の値に過ぎず、抗原の力価や量、酵素結合二次抗体の力価や量、反応時間、反応温度など数々の測定条件によって大きく影響され、再現性に乏しく、統計処理に耐える性質の値ではなく、各研究室間相互の成績を比較することはできない。我々も最初 1 段階または 2 段階希釈血清を用いた OD、標準血清の OD との比などによる判定を検討したが、信頼性のある結果を得ることができなかった。

これらの理由から、測定条件の変動に左右されにくい、統計処理可能な、研究室間のデータの比較ができる、絶対的な値を求める方式を検討し、各被験血清の 2 倍希釈 6 段階系列を用い、反応終末点の血清希釈度の逆数を抗体価とするのが、最も妥当であるとの結論を得た。更に、この方式を用いて正常健康者の IgG、IgM 抗体価を測定し、正常平均値及び正常範囲を設定して、結核症

及び非定型抗酸菌症患者との比較を検討したので報告する。

## 材料及び方法

### [試 薬]

抗原 : 日本 BCG 製造株式会社製 CIP (試験管内検査用 PPD 抗原)

酵素標識 2 次抗体 : Kirkegaard & Perry 社製 Goat-anti-human IgG ( $\gamma$ ) - 及び IgM ( $\mu$ )-alkaline phosphatase 標識抗体

基質 : Research Organics 社製 p-Nitrophenyl phosphate (p-NPP)

ウシ血清アルブミン : Armour 社製 Bovine serum albumin Fraction V (BSA)

Carbonate buffer, pH 10 : NaCO<sub>3</sub> 2.332g, NaHCO<sub>3</sub> 2.352g, NaN<sub>3</sub> 0.2g/l, 4°C 保存

Tween-PBS buffer : KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 13.6g, NaCl 86.5g, NaN<sub>3</sub> 2.0g, Tween 20 5.0 ml/l, 5N-NaOH にて pH 7.0 に調整、室温保存、使用に際して 10 倍希釈

BSA-PBS buffer : KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 13.6g, NaCl 86.5g, NaN<sub>3</sub> 2.0g, BSA 10.0g/l, 5N-NaOH にて pH 7.0 に調整、室温保存、使用に際して 10 倍希釈

DEA buffer : Diethanolamine 9.6ml, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.203g/l, 5N-HCl にて pH 9.8 に調整、4°C

Table 1. Determination of Anti-Mycobacterial Antibodies

Author	Year	Dilution	Method of evaluation	Referens
Nassau et al	1976	100, 500	Optical Density	1)
Viljanen et al	1982	100	Optical Density	2)
Kalish et al	1983	16 - 1024 (CSF)	Optical Density	3)
		1000	Optical Density	
Koshino et al	1984	100	Optical Density	4)
Konishi et al	1984	40 - 5120	End point (log <sub>2</sub> N/10)	5)
Zeiss et al	1984	1000	Ratio to standard Optical Density	6)
Kiran et al	1985	100	Optical Density	7)
Daniel et al	1986	75 (Blood)	Comparison to standard serum	8)
Chawla et al	1986	100	Optical Density	9)
Gandhi et al	1986	50	Optical Density	10)
Krambovitis	1986	40	Optical Density	11)
Kusano et al	1986	One point	Titration curve using standard serum	12)

保存

[機器]

Microplate : 住友ベークライト社製 ELISA 用プレート MS-7196 F, 96 Wells

ELISA Reader : Dynatech 社製 Microplate Reader MR-600

Computer : Apple 社製 Epson TF-20, Dynatech 社製 Immunosoft System Disk

[測定方法]

測定法の概要を Fig. 1 に示した。Fig. 2 のように被験血清の各希釈段階ごとに PPD を加えないブランクをおき、1 検体の IgG 抗体または IgM 抗体の測定にそれぞれ 12 wells を用いた。

## 成績

### 1. データの分析, 補正と抗体価の計算

被験血清の各希釈段階ごとに、PPD (+) の OD から PPD (-) の OD を差し引いた  $\Delta OD$  を縦 (Y) 軸に、血清希釈度の対数を横 (X) 軸にとって、 $\Delta OD$ -希釈度 (対数) 曲線を描かせ、この曲線の直線部分の理論式  $Y = A_0 + A_1 (\log X)$  ( $Y$ :  $\Delta OD$ ,  $X$ : 希釈度) を求め、 $Y = 0$  のときの  $X$  の値より血清の抗体価を計算した。このとき直線関係を外れた測定値があれば、それを除外して補正操作を行った。我々はこのデータ処理をコ

ンピュータを用いて行ったが、実例の一つを Fig. 3 に示す。この実例では 320 倍希釈の測定値が直線関係を外れているので、これを除外することによって、実測値と理論値との間の決定係数は 0.979 から 0.997 へ、相関係数は 0.989 から 0.998 へ、標準誤差は 0.011 から 0.004 へと著しく改善された。

コンピュータを用いずに片対数グラフに曲線を描き、直線部分を外挿して横軸との交点から、抗体価を計算することによっても十分満足な値を求めることができる。

### 2. PPD 量の影響

一次抗原である PPD 量の影響を検討した。PPD 量を変えることにより、OD 値及び  $\Delta OD$ -希釈度 (対数) 曲線は大きく変化した。Fig. 4 にしめすように  $\Delta OD$ -希釈度 (対数) 曲線の直線部分を外挿した直線は、横軸上の同一点に集まり、我々の方式によってもとめた抗体価はほぼ一定であった。

### 3. 酵素標識二次抗体量の影響

Fig. 5 に示すように酵素標識二次抗体量を変えることにより、OD 値及び  $\Delta OD$ -希釈度 (対数) 曲線は大きく変化した。  $\Delta OD$ -希釈度 (対数) 曲線の直線部分を外挿した直線は X 軸上のほぼ同一点に集まり、データ処理で計算した値もよい一致を示した。

### 4. 正常健康者の抗 PPD-IgG 及び -IgM 抗体価

二つのグループよりなる正常健康者 (それぞれ 59 例

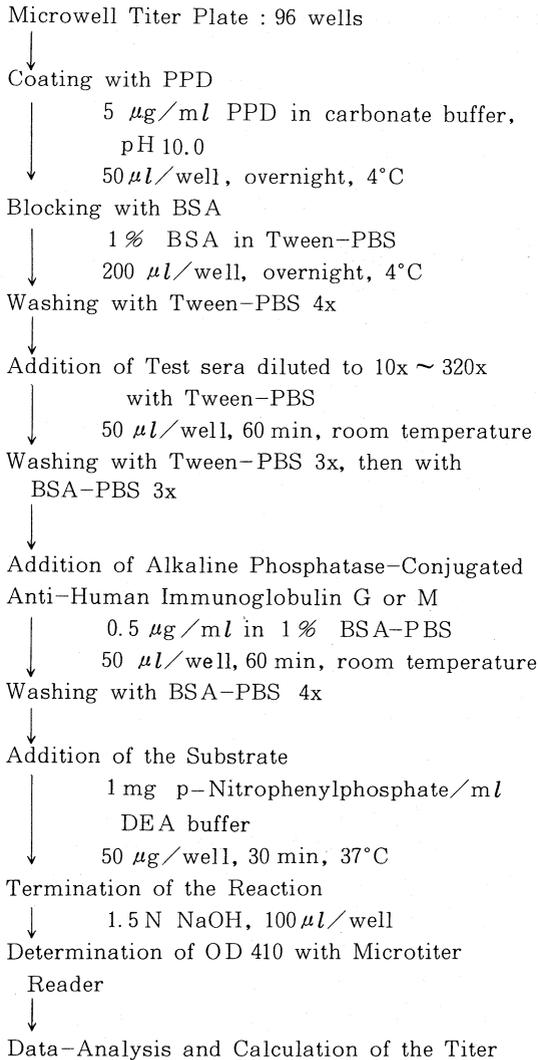


Fig. 1. Procedures for PPD-ELISA

と 200 例) について上記の方法で、抗 PPD-IgG 及び -IgM 抗体価を測定した。二つのグループの測定結果はよく一致したので、一括して扱うこととした。Fig. 6 に示すように IgG 及び IgM 抗体価はいずれも対数正規分布を示すので、得られた抗体価を対数変換し、平均値と標準偏差を求め、平均値  $\pm 2 \times$  標準偏差を計算し、それぞれ自然数に戻して正常値と正常範囲とした。正常平均値は抗 PPD-IgG で 190、-IgM で 308、正常範囲はそれぞれ 34~1050, 92~1032 であった (Table 2, Fig. 6, Fig. 7)。

5. 結核症患者及び非定型抗酸菌症患者の抗 PPD-IgG 及び -IgM 抗体価  
測定結果を Table 2, Fig. 6, Fig. 7 に示す。結核症

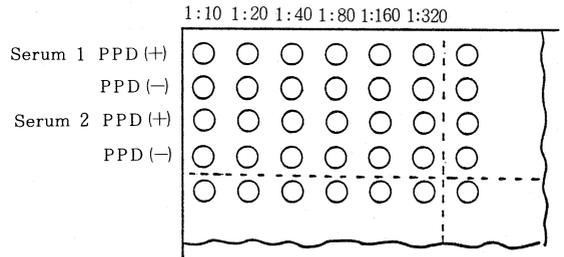


Fig. 2. Dilution of serum

患者は治療前、治療中及び治療終了1年以内のものを活動性、治療終了1年以上のものを不活動性とした。非定型抗酸菌症患者は、大部分が *Mycobacterium avium-intracellulare* complex によるもので、*M. kansasii* による例が少数含まれており、大部分が排菌中のものである。

活動性肺結核症群及び非定型抗酸菌症群で、高い抗体価、特に高い IgG 抗体価がみられ、それぞれ 94 例中 54 例 (57.4%)、48 例中 27 例 (56.3%) で上記で設定した正常範囲を超えていた。しかし両群の間では、PPD を抗原とした今回の測定において有意の差はみられなかった。

## 考 察

ELISA の導入によって結核菌菌体成分に対する抗体を、抗体クラス別に特異的に測定することは比較的容易となり、既に結核症患者や非定型抗酸菌症患者について抗体を測定し、この方法の臨床的有用性を論じた成績が数多く報告されている<sup>11)~12)</sup>。

これらの報告の大部分のものは、測定結果の評価において OD 値そのもの、または標準血清の OD 値との比を使っているが、既に序論でのべたように、これらの値は各研究室で任意に設定した測定条件下での相対的な値であって、測定条件の変動によって大きく変動して再現性に乏しく、本来統計的に扱える性質の数字ではなく、研究室間の成績の比較には利用できない値である。

草野ら<sup>12)</sup> の、1 段階希釈血清を用い、その OD 値を標準血清で作った検量線にあてはめて抗体価を求める方法は、確かに客観的な数値を与える方法であるが、この方法は一定の抗体価をもった標準血清を準備しておくことが難しく、更にすべての血清の  $\Delta$  OD - 希釈度曲線の直線部分が、標準血清と同一勾配をもつことを理論的前提としている。しかし Fig. 8 に示したように、実際にはこの勾配は血清ごとに大きく異なっている。

このように、血清ごとに  $\Delta$  OD - 希釈度 (対数) 曲線が、さまざまなタイプを示す理由としては、一つには

Formula : S-C

Results :

- 1 0.2720
- 2 0.2230
- 3 0.1900
- 4 0.1450
- 5 0.1090

bad data

Regression Parameters, Statistics and Results

Regression equation

$$OD(C) = +4.02806E-1 -1.34206E-1 \times \text{Log}(C)$$

Regression parameters,

Coefficient of determination = 0.997

Coefficient of correlation = 0.998

Standard error of estimate = 0.004

Comparison of the Standard Data with the Regression Prediction

		Measured	Predicted
S 1	10.000	0.272	0.269
S 2	20.000	0.223	0.228
S 3	40.000	0.190	0.188
S 4	80.000	0.145	0.147
S 5	160.000	0.109	0.107

Formula : S-C

Results:

- 1 0.2720
- 2 0.2230
- 3 0.1900
- 4 0.1450
- 5 0.1090
- 6 0.0970

Regression Parameters, Statistics and Results

Regression equation

$$OD(C) = +3.82589E-1 -1.19779E-1 \times \text{Log}(C)$$

Regression parameters

Coefficient of determination = 0.979

Coefficient of correlation = 0.989

Standard error of estimate = 0.011

Comparison of the Standard Data with the Regression Prediction

		Measured	Predicted
S 1	10.000	0.272	0.263
S 2	20.000	0.223	0.227
S 3	40.000	0.190	0.191
S 4	80.000	0.145	0.155
S 5	160.000	0.109	0.119
S 6	320.000	0.097	0.083

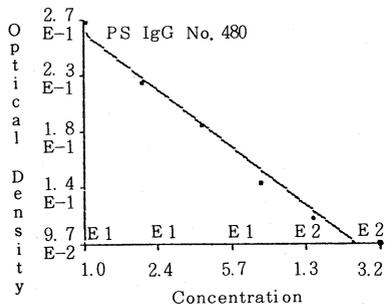
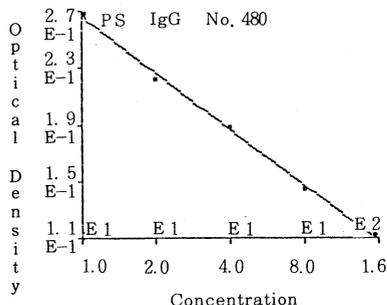


Fig. 3. Correction of Data

抗原として用いた PPD が単一分子ではなく、heterogeneous であることにもよるであろうが、仮に単一分子標品を抗原に用いたとしても、同一分子上に複数の抗原決定基が存在することがむしろ一般的であり、また単一の抗原決定基に対しても affinity や avidity を異にする複数の種類の抗体が産生され、個体ごとにこれらの割合が同じではないことがより根本的な理由であろう。

また小西ら<sup>5)</sup>の数段階の血清希釈系列を作り、終末点として定めた OD に達した最大希釈度を抗体価とする方法は、我々の方式に近いものであるが、高希釈度域での OD 値の下がりかたは血清ごとに異なり、かなりの幅で裾を引いて低下していく例も多く、反応終末点の判定に明確さを欠くおそれがある。

これらの理由によって、我々は、測定条件の変化に影響されない、統計処理に耐える性格をもち、各研究室間の比較が可能な、絶対的な値を求める方法を検討した。

その結果、血清の 10 倍から 320 倍までの 2 倍希釈 6 段階系列を用い、各希釈度ごとに抗原(-)のブランクをおき、抗原(+ )の OD から抗原(-)のブランク OD を差し引いた  $\Delta OD$  と血清希釈度(対数)の間で  $\Delta OD$ -希釈度(対数)曲線を描き、その直線部分の関係式  $Y = A_0 + A_1(\log X)$  を求め、 $Y = 0$  のときの  $X$  を抗体価とする方法は、6 段階希釈の点で簡便さに難点は残るが、最も妥当な方法であると結論できた。

ELISA の測定手技には、測定に影響を及ぼす多くの因子があるが、そのうち最も重要でありながらロットご

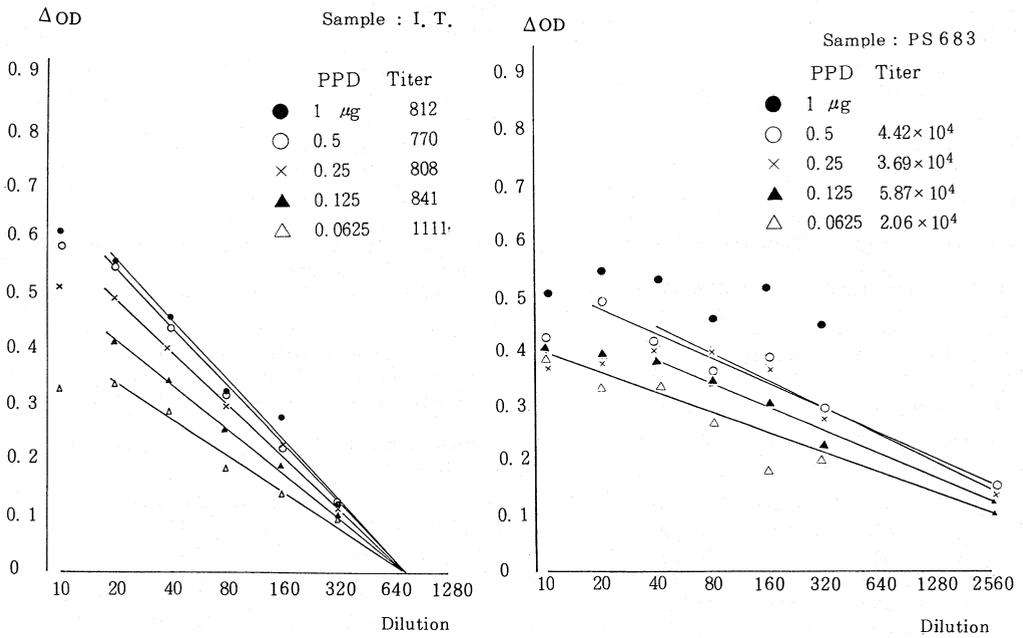


Fig. 4. Effects of PPD Concentration

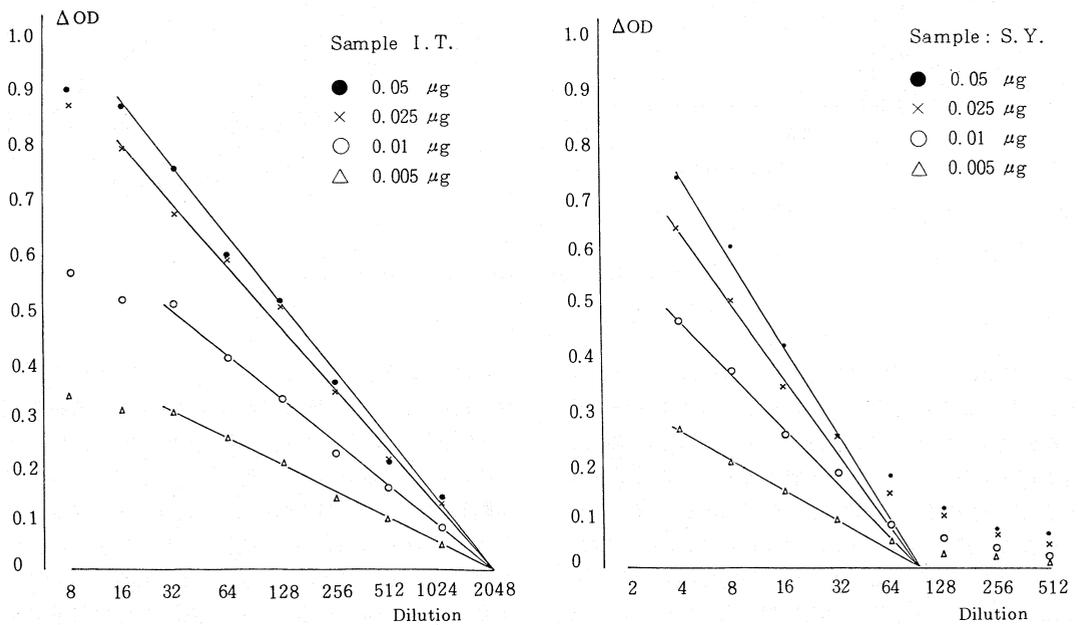


Fig. 5. Effects of the Amount of the Secondary Antibody

Table 2. Anti-PPD Titer in Mycobdeteriosis

	Tuberculosis		A M	Others	Normal
	Active	Inactive			
IgG	3342 ( $13.7 \times 10^5 \sim 8$ )	395 (3285 ~ 47)	3273 ( $13.5 \times 10^5 \sim 8$ )	294 (3469 ~ 25)	190 (1050 ~ 34)
IgM	464 (3764 ~ 57)	331 (1673 ~ 65)	378 (4869 ~ 29)	247 (2638 ~ 23)	308 (1032 ~ 92)

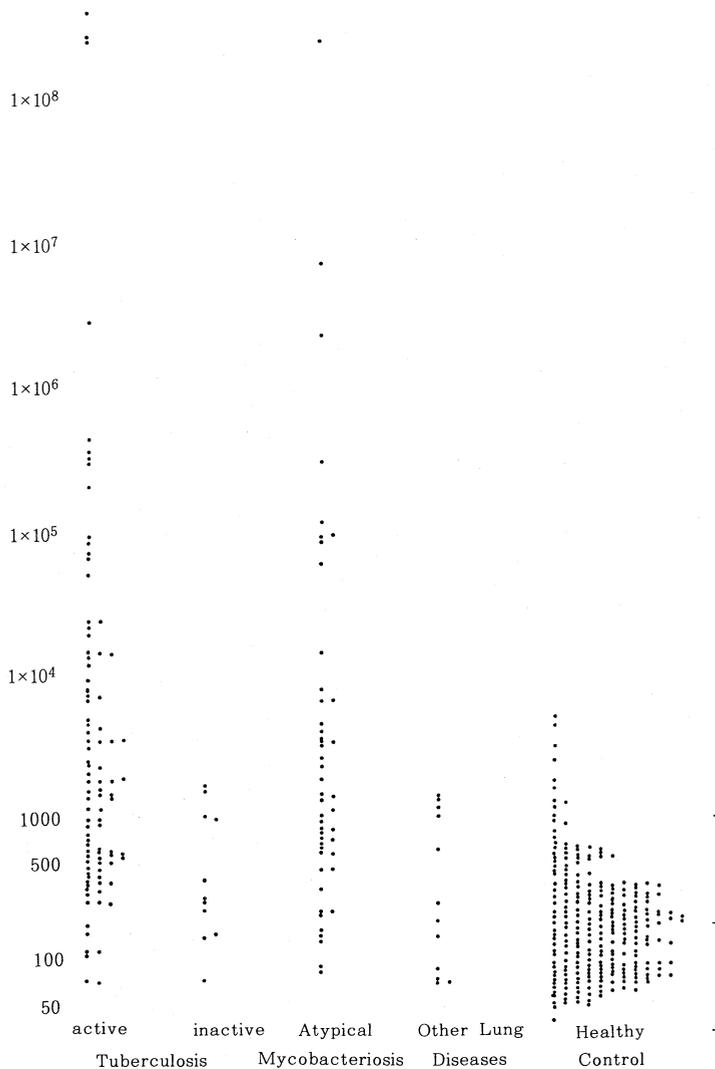


Fig. 6. Anti PPD-IgG Titer

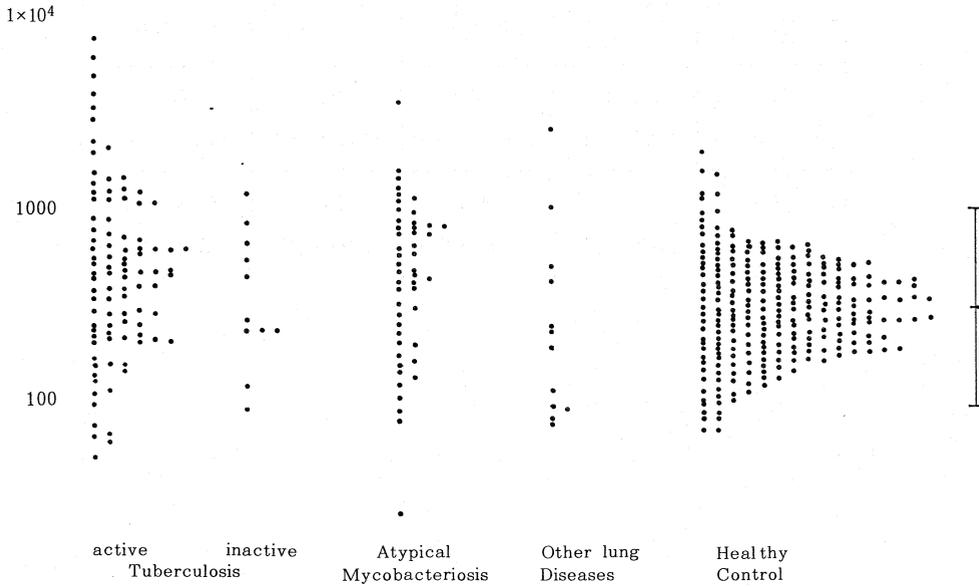


Fig. 7. Anti PPD-IgM Titer

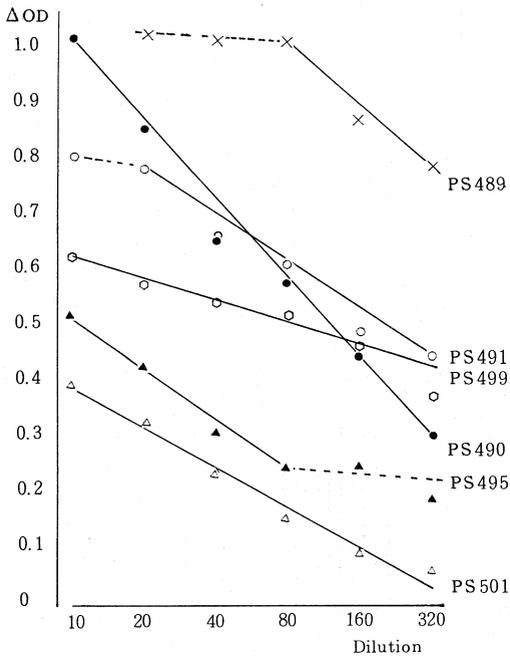


Fig. 8. Various Patterns of OD-Dilution Curve

との力価の変動などのために、最もコントロールしにくい因子は、抗原量（力価）と酵素標識二次抗体量（力価）とである。「成績」の項で示したようにこの二つの因子の変動は、OD 値そのものや  $\Delta OD$ -希釈度（対数）曲線には大きく影響するにもかかわらず、我々の方式で求めた抗体価には殆ど影響せず、実験誤差範囲内でよく一致した結果が得られた。これら二つの major な因子以外の反応温度、反応時間などの minor な変動因子も殆ど影響を与えなかった。例外的に高い抗体価の血清では 10 倍～320 倍の範囲では直線関係が成立せず、その場合にはより高い希釈度で測定をやり直す必要があるが、このような例はごく少数であった。我々の方法によって測定した正常健康者の抗 PPD-IgG 及び-IgM は、いずれも対数正規分布を示し、正常平均値と正常範囲は IgG で 190 (34～1050), IgM で 308 (92～1032) であった。これらの正常健康者は、埼玉県西部及び東京都三多摩地区の勤労者（医療機関勤務者ではない）男女であって、BCG 接種歴やツベルクリン皮内反応を確かめることはできなかったが、日本の現状から考えて、大部分は BCG 接種歴をもち、ツベルクリン皮内反応は陽性であろうと推定される。従って、ミコバクテリア抗原と未だかつて接触したことがない真の意味での正常健康者ではない。しかし、結核症における血清学的検査の目標は、治療を要する活動性結核患者を既感染健康者あるいは胸部レン

トゲン写真有所見者のなかから選び出すことにあるので、“真”の正常者である未感染者との比較よりも、既感染健康者との比較のほうがより実際的であると思われる。

この報告では、抗原として市販のPPDを用いた。今回の研究の主要な目的が方法論的な考察にあるために、入手しやすく、力価検定がなされている抗原としてPPDを選んだが、結核症における抗体価測定のための抗原としてPPDが適切なものであるかどうかは、別に検討しなければならない問題である。しかし、どの抗原が良いかを比較するような実験では、OD値や標準血清OD値との比などのような任意的な値に頼ることはできず、このような目的のためにも、我々の方法が優れていると考える。

また結核症患者及び非定型抗酸菌症患者についても測定を行ったが、活動性結核症患者及び非定型抗酸菌症患者で高い抗体価、特に高いIgG抗体価を示す者がみられた。これらの病気の診断、治療要否の判断、治療終了時期の判断などにおける抗体価測定の臨床的有用性については別に報告する。また活動性結核症患者と非定型抗酸菌症患者との間では、PPDを抗原として用いた限りでは差はみられなかったが、より特異性の高い標品を抗原として用いれば、この両者を鑑別できる可能性は残されており、今後の課題として検討を続けたい。

## 結 論

1. 血清中の結核菌菌体成分に対する抗体価 (IgG, IgM) のELISAによる測定法を検討した。10倍から320倍までの2倍希釈による6段階希釈血清を用い、縦軸にELISAでの吸光度、横軸に希釈度倍数をとって作った吸光度-希釈度曲線の図形から、その直線部分を外挿して求めた反応終末点の希釈度の逆数を、その血清の抗体価とした。

この我々の方法は、6段階希釈血清を準備する点で簡便性に問題があるが、安定性、再現性及び測定結果の判定の客観性において、最も妥当な方法であると考えられる。

2. この方法で測定した正常健康者の抗PPD抗体価の正常平均値はIgGで190、IgMで308、正常範囲はそれぞれ34~1050と92~1032であった。

3. 結核症患者及び非定型抗酸菌症患者の抗体価についても検討した。活動性結核症患者と非定型抗酸菌症患者は有意に高いIgG抗体価を示したが、両者の間に有意の差はみられなかった。両者の鑑別のためには、より特異性の高い抗原の選択が必要と思われる。

## 文 献

- 1) Nassau, E. et al. : The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Tubercle*, 57 : 67, 1976.
- 2) Viljanen, M. K. et al. : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to purified protein derivative of tuberculin (PPD). IgM-, IgA- and IgG-anti-PPD antibodies in active pulmonary tuberculosis. *Eur. Respir. Dis.*, 63 : 257, 1982.
- 3) Kalish, S. B. et al. : The enzyme-linked immunosorbent assay method for IgG antibody to purified protein derivative in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. *Ann. Intern. Med.*, 99 : 630, 1983.
- 4) 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.
- 5) 小西一樹他 : 肺結核における抗PPD抗体の測定とその意義, *呼吸*, 3 : 700, 1984.
- 6) Zeiss, C. R. et al. : IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, 130 : 845, 1984.
- 7) Kiran, U. et al. : Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur J Respir Dis*, 66 : 187, 1985.
- 8) Daniel, T. M. et al. : Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, 134 : 662, 1986.
- 9) Chawla, T. C. et al. : Serodiagnosis of intestinal tuberculosis by enzyme immunoassay and soluble antigen fluorescent antibody tests using a saline extracted antigen. *Tubercle*, 67 : 55, 1986.
- 10) Gandhi, B. M. et al. : Enzyme linked protein-A : An ELISA for detection of IgG Antibodies against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle*, 67 : 219, 1986.
- 11) Krambovitis, E. : Detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane antigen by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Microbiol*, 21 : 257, 1986.
- 12) 草野展周他 : ELISA法を用いた肺結核患者の血清中IgG抗体価測定の診断的有用性の検討(抄録)*結核*, 61 : 140, 1986.

1) Nassau, E. et al. : The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay.