

原 著

ELISA 法を用いた活動性肺結核患者の血清中の PPD と  
 $\alpha$  抗原に対する IgG 抗体測定 of 診断的有用性の検討

草 野 展 周

長崎大学熱帯医学研究所病原細菌学部門

受付 昭和61年10月28日

EVALUATION OF SERODIAGNOSIS DETECTING IgG ANTIBODIES AGAINST  
 PURIFIED PROTEIN DERIVATIVE AND ALPHA ANTIGEN IN PATIENTS  
 WITH ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS BY ENZYME-LINKED  
 IMMUNOSORBENT ASSAY

Nobuchika KUSANO \*

(Received for publication October 28, 1986)

Detection of IgG antibodies against purified protein derivative (PPD) prepared from *Mycobacterium tuberculosis* strain Aoyama B and alpha antigen, a homogeneous protein prepared from *M. tuberculosis* strain H37Rv by immunosorbent affinity chromatography, was done by a method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its diagnostic usefulness was also evaluated in this study. Sera from 80 patients with active pulmonary tuberculosis, 25 patients with inactive tuberculosis, 200 healthy adults, 117 healthy children, 84 patients with diseases other than tuberculosis and seven patients due to atypical *mycobacteria* were examined. The titer of each test serum was calculated by a computer system using the standard curve obtained by serial dilution of a standard serum. Use of phosphate buffer saline (PBS) with gelatin as blocking buffer in ELISA showed considerably useful results than the use of PBS with bovine serum albumin.

Patients with active pulmonary tuberculosis showed statistically higher amount of IgG antibodies against PPD or alpha antigen than other groups ( $p < 0.001$ ). The sensitivity was 73.8% and the specificity was 97.0% at a cut-off titer of 1 : 330 in anti-PPD antibody assay. On the other hand, the sensitivity was 77.5% and the specificity was 93.3% at a cut-off titer of 1 : 540 in anti-alpha antibody assay. However, the sensitivity of 91.3% and the specificity of 91.7% could be obtained with parallel application of both assays. Slight elevation of antibody titers was observed in the first or second month after administration of some anti-tuberculosis drugs and then these titers decreased gradually. Seven false-negative cases in active tuberculosis were observed in two patients with hypogammaglobulinemia, two casts with diabetes mellitus and three cases of fresh pulmonary tuberculosis without chemotherapy, and five of these false-negative cases were positive on smear stained by Ziehl-Neelsen's method.

\* From the Department of Bacteriology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Sakamoto-machi 12-4, Nagasaki 852 Japan.

From these results, it is concluded that judgment by combination of several antibody assays using different antigens of *M. tuberculosis* is helpful in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis when compared with any assay using single antigen. In addition to above, the measurement of antibody to *M. tuberculosis* will be also a useful marker for the judgment of the chemotherapeutic efficacy or clinical improvement.

**Key words :** Pulmonary tuberculosis, Serological diagnosis, PPD, Mycobacterial alpha antigen, IgG antibody, ELISA

**キーワード :** 肺結核, 血清学的診断, PPD, 抗酸菌 $\alpha$ 抗原, IgG抗体, ELISA

## 緒 言

本邦における結核は昭和10年から25年まで死因順位の第1位を占めてきたが、BCG接種や集団検診の実施などの予防対策、化学療法の進歩並びに衛生環境の整備、社会生活の向上などにより結核感染危険率は0.06%にまで改善し、死亡率も低下し、昭和59年には死因順位で15位にまで下がった<sup>1)</sup>。しかし、実際には毎年6万人以上の方が発症し、未だに16万人を越える患者が治療を受けており、これは欧米に比較すると明らかに高率で、呼吸器感染症において依然として重要な位置を占めている。また、一方では抗腫瘍剤やステロイド剤の使用、糖尿病や透析患者などのように細胞性免疫能が低下している患者の増加に伴い、結核の再燃、感染などが問題になってきている。結核の確定診断は結核菌を鏡検か、培養で証明することによってなされる。しかし、鏡検による検出率は低く、また培養による菌の分離には日時を要するため、菌塗抹標本で陰性の場合には胸部X線などによる推定診断に基づいて抗結核剤の投与を開始することが多い。また、胸部X線上の改善があまり著明でないものでは、治療効果の判定や治療の中止時期の決定などが困難な場合もある。

分離培養などが困難なウイルスなどでは血清学的診断が主として実施され、臨床的にも有用なものが多くなってきている。結核症では細胞性免疫が主な役割を果しているところから、ツベルクリンを用いた遅延型皮内反応による判定が参考とされてきた。しかし、結核菌に対する液性抗体も血清中に認められており、古くから旧ツベルクリンを用いたMiddlebrook-Dubos反応<sup>2)</sup>やリン脂質を用いた高橋反応<sup>3)</sup>などが考案されたが、その評価は低かった。しかし、近年、測定系に極めて感度の高いRadioimmunoassay (RIA)やEnzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)等が応用されるようになり、一方では精製ツベルクリン蛋白(Tuberculin purified protein derivative=PPD)をはじめとして、結核菌から精製された糖蛋白やリン脂質などのより精製

度の高い抗原が得られるようになり、これらを組み合わせた結核の血清学的診断が試みられ、しかも、その有用性が幾つか報告されている<sup>4)5)</sup>。今回、著者は結核菌の加熱培養濾液から精製されたPPDと、結核菌の非加熱培養濾液から精製された精製度の高い $\alpha$ 抗原<sup>6)</sup>を抗原とし、それぞれに対する特異的IgG抗体をELISA法で測定することにより、結核の血清学的診断及び結核の病態あるいは経過把握の指標として、臨床的有用性について検討を加え、価値ある知見が得られたので報告する。

## 材 料

### 1) 抗 原

ヒト型結核菌青山B株の加熱処理培養濾液から精製されたツベルクリン反応用のPPD(日本BCG社製, lot. M49-2)と、田坂ら<sup>7)</sup>によってヒト型結核菌H37Rv株の非加熱培養濾液から分離精製された $\alpha$ 抗原( $\alpha$ -T抗原)を使用した。

### 2) 酵素標識抗体と基質及び発色剤

酵素標識抗体は、抗ヒト-IgGアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗体(Cappel社, lot. 21781)を2%牛血清アルブミン(Bovine serum albumin=BSA)を含むpH7.4の0.04M磷酸緩衝食塩水(2%BSA-PBS)で適宜希釈して使用した。基質としてはフェニリン酸-4-アミノアンチピリン溶液(4.5mM phenylphosphoric acid disodium, 2.0mM 4-aminoantipyrine in 0.025 M sodium carbonate buffer; pH 10.2)、発色剤としては0.8%過沃素酸ナトリウム水溶液を使用した。ELISA用マイクロタイタープレートは96穴平底型のNunc-Immuno plate I(Nunc)を使用し、測定機器はMicroplate Reader MR-600(Dynatech社)を使用した。

### 3) 対象血清

①肺結核患者群：肺結核で入院した患者105名(24~83歳, 平均52.8歳)を結核患者群とした。その中で、排菌のみられる患者と化療によって排菌が陰性化しても炎症所見が存続し、胸部X線上、活動性と診断された患

者の計80名(24~80歳,平均52.3歳)を活動性結核患者群とし,一方,それ以外の25名(31~83歳,平均54.1歳)を非活動性結核患者群とし,その時点で得られた血清を対象とした。また,活動性群のうち10名については経時的に採血した。

②非定型抗酸菌症群:国立療養所非定型抗酸菌共同研究班の基準<sup>8)</sup>を満たし,非定型抗酸菌症と診断された7名(*M. intracellulare*; 5例,未同定; 2例,43~75歳,平均65.0歳)を対象とし,そのうち,*M. intracellulare*感染症患者については全例,経時的に採血を行い,抗体価の推移を観察した。

③非結核患者群:肺癌20名,慢性気管支炎14名,肺炎8名,細菌性胸膜炎8名,肺線維症または間質性肺炎10名,気管支喘息11名,サルコイドーシス症10名,SLE 3名の呼吸器疾患を中心とした結核以外の患者計84名(23~81歳,平均52.7歳)を非結核患者群に含めた。

④健康成人群:既往歴,胸部X線線上明らかな結核の既往がない健康な成人200名(18~56歳,平均28.1歳)

を健康成人群とした。

⑤健康小児群:0歳から16歳までの健康な小児117名(平均6.1歳)。

以上の計513名を対象とし,各群の検体は血清分離後,数本に分割,-80℃で凍結保存しておき,抗体価測定時に融解して実験に供した。

## 方 法

### 1) ELISA (Fig. 1)

①抗原の固相化:抗原をcoating buffer (0.05M炭酸緩衝液, pH9.6)で50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整し,抗原溶液とした。この溶液をマイクロプレートの半分 of ウェルに,残り半分のウェルには対照としてcoating bufferをそれぞれ200  $\mu\text{l}$ ずつ分注した。4℃で一晩以上反応させた後,0.04M 磷酸緩衝食塩水 (PBS, pH7.4)で3回洗浄した。更に非特異的IgGの吸着を防ぐため,0.1%ゼラチン加磷酸緩衝食塩水 (G-PBS, pH7.4)を各ウェルに200  $\mu\text{l}$ ずつ分注し,室温で3時間反応させた

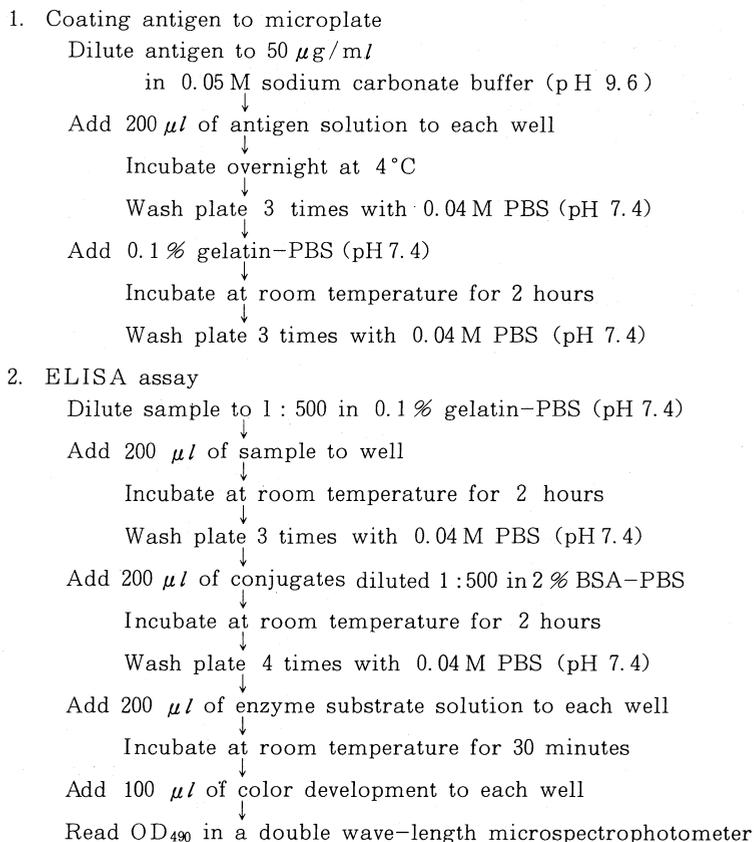


Fig. 1. Flow-chart of enzyme-linked immunosorbent assay technique for measurement of antibody.

後、PBSで3回洗浄した。

②特異的IgGの測定：G-PBSで500倍希釈した各被検血清200 $\mu$ lをウェルに入れ、室温で2時間反応させた。次にPBSで3回洗浄した後、2% BSA-PBSで500倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗体を各ウェルに200 $\mu$ lずつ分注し、室温で2時間反応させた。更にPBSで4回洗浄後、基質溶液を各ウェルに200 $\mu$ lずつ分注し、室温で30分間反応させた後、発色試薬を100 $\mu$ lずつ加え、発色させた。そして、各ウェルの490 nmにおける吸光度を測定し、非特異的IgGの吸着の影響を少なくするため、抗原を固相化したウェルと対照のウェルの吸光度の差を取り、これを特異的吸光度とした。

2) 陽性コントロール患者血清(陽性基準血清)の抗体価算出

活動性結核患者群の血清をスクリーニングし、その中から高力価の血清を選び、これを陽性基準血清とした。この血清の50倍希釈溶液をもとにその倍数希釈系列を作製し、特異的吸光度が0.3となるとき希釈倍率の逆数を抗体価とした(終末点法)(Fig. 2)。

3) 抗体価の算出方法

プレート毎に陽性基準血清で標準曲線を描き、これに基づき、一定希釈した被検血清の吸光度より抗体価を算出した<sup>9)</sup>(Fig. 3)。なお測定はすべてダブルで実施し、その平均をとった。

4) 測定の精度管理

陰性対照としての健康成人プール血清と陽性対照としての抗体価が既知の患者血清とを各プレート毎において

同時に測定し、抗体価のバラツキが10%以下であることを確認した。対照血清の抗体価の変動が10%以上あるときは再検した。

## 結 果

1) ELISA法の基礎的検討

a. 非特異的IgG吸着の除去法の検討

Blocking bufferについての検討を行い、Fig. 4にその成績の一部を示した。試験した1~10% BSA-PBSでは非特異的IgGの吸着の防止は十分ではなく、高い非特異的吸着が認められ、同様の結果はヒト、ウサギ、ヤギのアルブミン加PBSでも認められた。検討した中ではゼラチンが最も非特異的吸着が少なく、その濃度は高濃度より0.5%以下の方がよく、特に0.1~0.2%が有効であった(Fig. 5)。以上の成績をもとに以下の実験には0.1%ゼラチン加磷酸緩衝食塩水をblocking bufferとして用いた。

b. 精度管理対策：各プレート毎の陽性基準血清による標準曲線(Fig. 3)は抗PPD-IgG抗体価では100~3,200倍、抗 $\alpha$ T-IgG抗体価では200~2,400倍の間でほぼ直線となり、抗体価の算出が可能であった。高抗体価の血清は更に5倍ないし10倍希釈して再度測定した。陽性と陰性の対照血清の抗体価の変動は10%以下であり、実験日やプレート間での抗体価の差も少なく、高い再現性が得られた(Table 1)。

2) 抗PPD-IgG抗体価の各群における分布

Table 2 上半に各群の抗体価の分布を示した。健康成人群は平均抗体価188(最大:357, 最小:83)、健康小

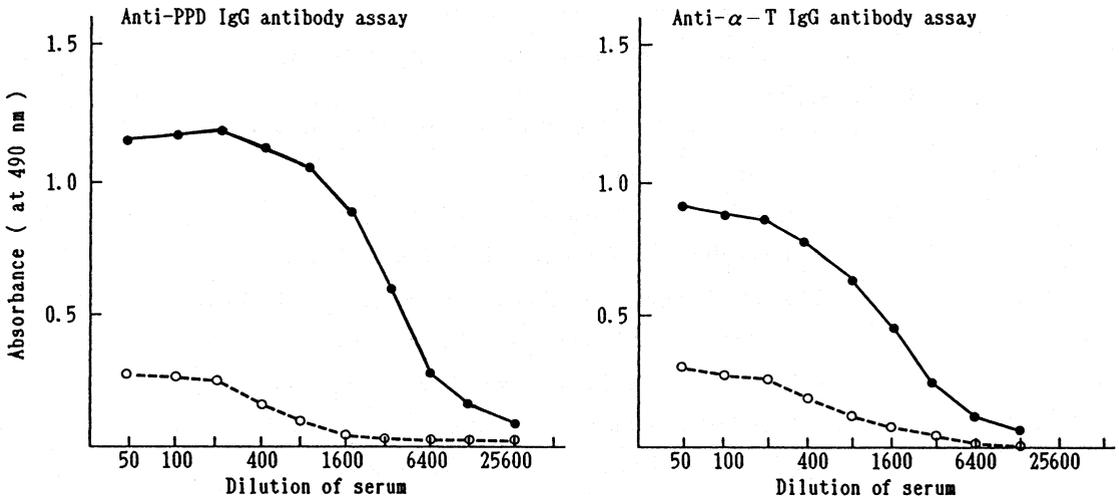


Fig. 2. Absorbance curves of positive control serum(●) (patient serum with active pulmonary tuberculosis) and negative control sera(○) (pooled sera of healthy persons) on anti-PPD IgG antibody and anti- $\alpha$ -T IgG antibody in ELISA. Each dilution was assayed in triplicate, and the data reflect the mean of the three absorbance values. The titer of positive control serum was calculated by end-point method (O. D.  $\geq$  0.3).

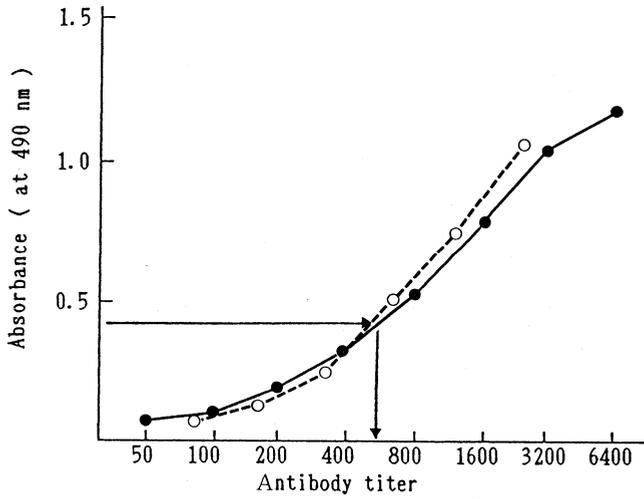


Fig. 3. Standard curve of positive control serum (anti-PPD antibody titer(●) : × 6400, anti- $\alpha$ -T antibody titer (○) : × 2400) in ELISA. Antibody titer of each test serum diluted 1 : 500 was calculated from absorbance value by using standard curve.

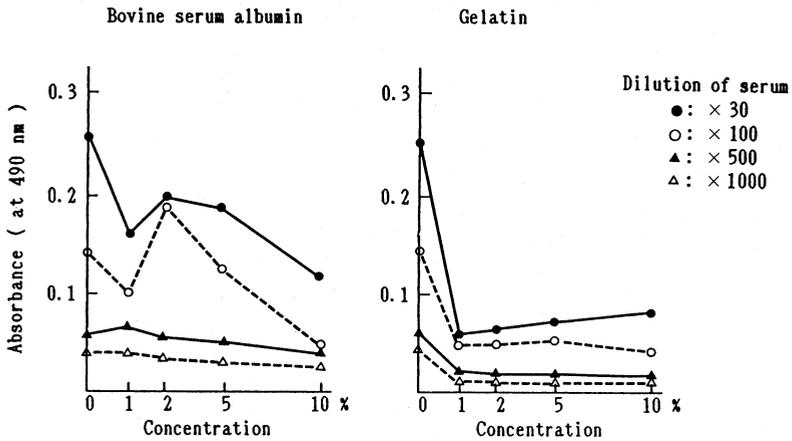


Fig. 4. Effects of bovine serum albumin and gelatin in PBS on blocking of non-specific reactions.

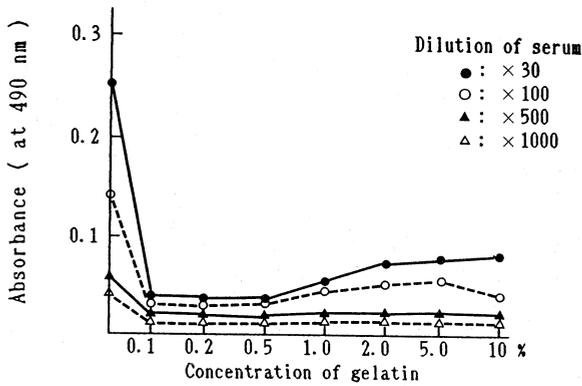


Fig. 5. Effect of gelatin in PBS on blocking of non-specific reactions.

Table 1. Day-to-day Variation in Antibody Titers of Pooled Sera from Healthy Persons (Negative control) and Patients with Active Pulmonary Tuberculosis (Positive control)

Day	Anti-PPD antibody titer		Anti- $\alpha$ -T antibody titer	
	Negative	Positive	Negative	Positive
1	154	496	236	1,095
2	123	416	257	1,334
3	155	463	236	1,225
4	154	467	234	1,035
5	135	496	200	1,007
6	150	473	268	1,111
7	124	416	261	1,285
8	134	450	228	1,111
9	139	457	247	1,255
10	150	475	263	1,400
11	112	465	250	1,301
12	134	501	242	1,282
13	123	465	260	1,298
14	130	431	238	1,224
15	139	415	229	1,231
Mean	137.07	459.07	243.27	1,212.93
S. D.	13.38	28.80	17.67	115.18
C. V.(%)	9.76	6.27	7.26	9.50

S. D. : Standard deviation.

C. V. : Coefficient of variation.

**Table 2.** Distributions of Antibody Titers Against PPD and  $\alpha$ -T Antigen in Patients with Pulmonary Tuberculosis and Other Groups

Anti-PPD antibody assay						
Titer	Active TB (n = 80)	Inactive TB (n = 25)	Healthy adult (n = 200)	Healthy children (n = 117)	Patient control (n = 84)	Atypical Mycobact. (n = 7)
~ 100			2.0	17.9	2.4	
100 ~ 199	8.8	44.0	60.0	52.2	42.8	14.3
200 ~ 299	13.8	44.0	34.0	26.5	40.5	42.9
300 ~ 399	16.3	12.0	4.0	3.4	14.3	
400 ~ 499	18.8					
500 ~ 599	10.0					14.3
600 ~ 799	8.8					28.6
800 ~ 999	6.3					
1,000 ~	17.5					
Mean titer	931	221	188	166	219	240
Anti- $\alpha$ -T antibody assay						
	Active TB (n = 80)	Inactive TB (n = 25)	Healthy adult (n = 200)	Healthy children (n = 117)	Patient control (n = 84)	Atypical Mycobact. (n = 7)
~ 200	1.3		21.0	34.5	37.0	
200 ~ 399	8.8	20.0	61.0	45.8	39.4	
400 ~ 499	11.3	35.0	14.0	8.4	9.6	14.3
500 ~ 599	10.1	25.0	4.0	6.5	8.4	14.3
600 ~ 699	6.3	5.0		2.8	3.6	
700 ~ 799	6.3			1.9	2.4	28.6
800 ~ 999	10.0	5.0				
1,000 ~	46.3	10.0				42.9
Mean titer	972	553	299	299	293	800

Note: Distributions are expressed as percentages of the total number of each group.

児群は平均抗体価166（最大：338，最小：66），非結核患者群は平均抗体価219（最大：388，最小：95）であり，非定型抗酸菌症群は平均抗体価240（最大：659，最小：134）であった。結核患者群は平均抗体価762（最大：6,400，最小：114）であり，活動性群では平均抗体価931（最大：6,400，最小：114），非活動性群では221（最大：380，最小：132）であった。活動性結核患者群で一部低い例があったものの他の群に比し，t 検定で有意に高い抗体価を示した（ $p < 0.001$ ）（Table 3 上半）。

### 3) 抗 $\alpha$ T-IgG 抗体価の各群における分布

Table 2 下半に示したように，健康成人群は平均抗体価299（最大：540，最小：144），健康小児群は平均抗体価299（最大：751，最小：89），非結核患者群は平均抗体価293（最大：734，最小：75）であり，非定型抗酸菌症群は平均抗体価800（最大：1,888，最小：453）であった。結核患者群は平均抗体価884（最大：2,520，最小：136）であり，活動性群では972（最大：2,520，最小：136），非活動性群では553（最大：1,351，最小：264）

であった。活動性結核患者群は非定型抗酸菌症群以外の群に比し，t 検定で有意に高い抗体価を示したものの（ $p < 0.001$ ），非定型抗酸菌症群との間では有意差を認めなかった（Table 3 下半）。

### 4) 両抗体の陽性率

健康成人群抗体価の分布は対数正規分布に近い分布型であるため，抗体価を自然対数に変換して，抗体価（Titer）の対数値の平均値（Mean）と標準偏差（SD）を求め，Mean+2SDを再び指数変換したものを cut off titer とした。即ちこの値以下を健康成人の抗体価の正常範囲とし，これ以上を陽性とした。抗 PPD 抗体の cut off titer は330倍，抗 $\alpha$ T 抗体は540倍であった。各群における抗体の陽性率をみると（Table 4），抗 PPD 抗体は，健康成人群，健康小児群，非結核患者群では4%以下で，非活動性結核患者群では8.0%であり，非定型抗酸菌症群では42.9%とやや高値を示したものの，活動性結核患者群では73.8%と高い陽性率を示した。これらより活動性結核における抗 PPD 抗体の陽性率に基

**Table 3.** Antibody Titers Against PPD and  $\alpha$ -T Antigen in Patients with Pulmonary Tuberculosis and Other Groups

Anti-PPD antibody titer

Group	Number	Mean with SD in log	p value* compared with	
			Active tuberculosis	Healthy adult
Tuberculosis				
Active tuberculosis	80	2.739 $\pm$ 0.397	—	
Inactive tuberculosis	25	2.322 $\pm$ 0.142	< 0.001	< 0.001
Healthy adult	200	2.252 $\pm$ 0.136	< 0.001	—
Healthy children	117	2.183 $\pm$ 0.182	< 0.001	< 0.001
Patient control	84	2.317 $\pm$ 0.144	< 0.001	< 0.01
Atypical mycobacteriosis	7	2.325 $\pm$ 0.201	< 0.001	N. S.

Anti- $\alpha$ -T antibody titer

Group	Number	Mean with SD in log	p value* compared with	
			Active tuberculosis	Healthy adult
Tuberculosis				
Active tuberculosis	80	2.914 $\pm$ 0.260	—	
Inactive tuberculosis	25	2.705 $\pm$ 0.175	< 0.001	< 0.001
Healthy adult	200	2.453 $\pm$ 0.141	< 0.001	—
Healthy children	117	2.408 $\pm$ 0.249	< 0.001	N. S.
Patient control	84	2.399 $\pm$ 0.244	< 0.001	N. S.
Atypical mycobacteriosis	7	2.849 $\pm$ 0.215	N. S.	< 0.001

\* : Using student's t test, N. S. : Not significant.

**Table 4.** Positive Percentages of Antibody Against PPD and  $\alpha$ -T Antigen in Patients with Pulmonary Tuberculosis and Other Groups

Group	No.	PPD Positive* (%)	$\alpha$ -T Positive* (%)	PPD or $\alpha$ -T Positive* (%)
Active tuberculosis	80	59 (73.8)	62 (77.5)	71 (91.3)
Inactive tuberculosis	25	2 (8.0)	6 (24.0)	7 (28.0)
Healthy adult	200	3 (1.5)	1 (0.5)	4 (2.0)
Healthy children	117	2 (1.7)	9 (7.9)	10 (8.5)
Patient control	84	3 (3.6)	8 (9.5)	10 (11.9)
Atypical mycobacteriosis	7	3 (42.9)	5 (71.4)	5 (71.4)

\* Cut-off titer of anti-PPD antibody ; 1 : 330

Cut-off titer of anti- $\alpha$ -T antibody ; 1 : 540

Note: Cut-off titer was calculated from logarithmic mean titer and double standard deviation in healthy adult group.

づく感度は73.8%, 活動性結核以外の群における陰性率に基づく特異度は97.0%であった。一方, 抗 $\alpha$ T抗体の陽性率は, 健康成人群では1%以下, 非結核患者群, 健康小児群では7.9%と9.5%であり, 非活動性結核患者群では24%, 活動性結核患者群では77.5%と高い陽性率を示した。しかし, 非定型抗酸菌症群においても71.4%と高い陽性率を示した。健康小児群において抗 $\alpha$ T抗体陽性になった8例中6例は, BCG接種後1年以内であった。抗 $\alpha$ T抗体測定感度は77.5%, 特異度は93.3%であった。両抗体

のどちらかが陽性になる頻度でみると, 活動性結核患者群の陽性率は91.3%と高くなり, 他の群の陽性率は数パーセント高くなったのみであった。両者を併用することにより感度は91.3%, 特異度は91.7%となった。

## 5) 排菌陰性化後の抗体価の推移 (Table 5)

活動性結核患者群における排菌陰性化後の抗体価の変動は, 抗PPD抗体では排菌時にやや低く, 排菌陰性化後1カ月以上2カ月未満において抗体価の上昇を認めたが ( $p < 0.05$ ), 抗 $\alpha$ T抗体は排菌時より高い抗体価を

**Table 5.** Relationship between Antibody Titers in Patients with Pulmonary Tuberculosis and Duration After Acid-Fast Bacilli Culture Turned to Negative

Duration (months)	No.	Anti-PPD antibody titer		Anti- $\alpha$ -T antibody titer	
		Mean with SD in log	p value*	Mean with SD in log	p value*
0	14	2.510 $\pm$ 0.221	—	2.840 $\pm$ 0.280	—
~ 1	13	2.653 $\pm$ 0.434	N. S.	2.889 $\pm$ 0.206	N. S.
1 ~ 2	17	2.752 $\pm$ 0.419	< 0.05	2.952 $\pm$ 0.239	N. S.
2 ~ 3	21	2.588 $\pm$ 0.408	N. S.	2.882 $\pm$ 0.283	N. S.
3 ~ 4	13	2.472 $\pm$ 0.396	N. S.	2.812 $\pm$ 0.326	N. S.
4 ~ 6	9	2.828 $\pm$ 0.464	< 0.10	2.899 $\pm$ 0.145	N. S.
6 ~ 12	13	2.728 $\pm$ 0.429	N. S.	2.847 $\pm$ 0.187	N. S.
12 ~	20	2.320 $\pm$ 0.144	N. S.	2.715 $\pm$ 0.195	N. S.

\* : Using student's t test, N. S. : Not significant.

**Table 6.** Relationship between Duration of Chemotherapy and Antibody Titers in Patients with Pulmonary Tuberculosis

Duration (months)	No.	Anti-PPD antibody titer		Anti- $\alpha$ -T antibody Titers	
		Mean with SD in log	p value*	Mean with SD in log	p value*
0	10	2.438 $\pm$ 0.215	—	2.769 $\pm$ 0.244	—
~ 1	13	2.665 $\pm$ 0.433	N. S.	2.904 $\pm$ 0.225	N. S.
1 ~ 2	17	2.688 $\pm$ 0.343	< 0.05	2.962 $\pm$ 0.212	< 0.05
2 ~ 3	18	2.638 $\pm$ 0.496	N. S.	2.905 $\pm$ 0.293	N. S.
3 ~ 4	16	2.526 $\pm$ 0.373	N. S.	2.836 $\pm$ 0.316	N. S.
4 ~ 6	11	2.768 $\pm$ 0.461	< 0.10	2.830 $\pm$ 0.189	N. S.
6 ~ 12	15	2.716 $\pm$ 0.404	< 0.10	2.867 $\pm$ 0.205	N. S.

\* : Using student's t test, N. S. : Not significant.

示し、各時期において有意の差を認めなかった。

6) 化学療法の期間と抗体価の推移 (Table 6)

抗 PPD 抗体、抗  $\alpha$ T 抗体ともに化学療法開始後 1 カ月以上 2 カ月未満において有意な抗体価の上昇 ( $p < 0.05$ ) を認めたが、その後はやや低下傾向であった。しかし、抗 PPD 抗体では 4 カ月以上の群で抗体価が高くなっていた。

7) 偽陰性例と高抗体価例の患者背景

Table 7 に示すように、活動性肺結核患者群において抗 PPD 抗体と抗  $\alpha$ T 抗体ともに偽陰性であった 7 例中、2 例ずつは低  $\gamma$  グロブリン血症と糖尿病の基礎疾患があり、残り 3 例は基礎疾患はなかったものの、化療開始前の新鮮例で Gaffky 3 号以上の排菌を認めた。この 7 例中 5 例は喀痰の抗酸菌染色が陽性であった。また、抗 PPD 抗体または抗  $\alpha$ T 抗体のどちらかで高い抗体価を示した 14 例の場合 (Table 8)、9 例は結核性胸膜炎であり、1 例は粟粒結核、残り 4 例は耐性菌の持続排菌例であった。

8) 経時的な抗体価の変動

経過を追って血清を採取できた活動性結核患者 10 名と

非定型抗酸菌症 5 名のうち、活動性結核患者 4 名と非定型抗酸菌症 2 名について抗体価の経時的な推移を観察した。

症例 1 (Fig. 6) : 33 歳、男性、肺結核。入院時 Gaffky 5 号で強化療法開始。排菌時より両抗体ともに陽性で化療開始後 1 カ月で排菌は停止したが、一旦、抗体価の上昇を認め、その後両抗体とも下降し、抗  $\alpha$ T 抗体は 3 カ月で抗 PPD 抗体は 6 カ月で陰性化した。

症例 2 (Fig. 7) : 61 歳、男性、肺結核。基礎疾患に糖尿病あり。入院時 Gaffky 4 号で強化療法開始。排菌時には両抗体とも陰性であったが、化療開始後 1 カ月で抗  $\alpha$ T 抗体のみ上昇し、3 カ月で陰性化した。抗 PPD 抗体は全経過中陰性であった。

症例 3 (Fig. 8) : 58 歳、男性、肺結核、結核性胸膜炎。肝硬変の既往あり。入院時喀痰より Gaffky 3 号、胸水より Gaffky 2 号で強化療法を開始。排菌時より両抗体ともに高値を示した。化療開始後 1 カ月で排菌は停止したものの抗体価は高値で、全身状態は悪く、胸水、腹水の減少は認められなかったが、5 カ月後より抗体価は減少し、6 カ月後から胸水、腹水の減少、炎症所見の

**Table 7.** Background of False-negative Cases with Active Pulmonary Tuberculosis

Underlying disease	Number of cases
Hypo- $\gamma$ -globulinemia	2 (1)
Diabetes mellitus	2 (1)
None	3 (3)
<b>Total</b>	<b>7 (5)</b>

( ) : Number of smear-positive cases.

**Table 8.** Background of Patients with Very High Antibody Titers\* Against PPD or  $\alpha$ -T Antigen

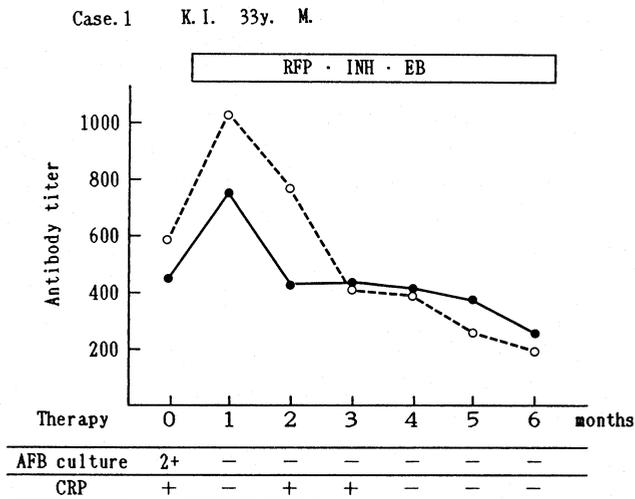
Cases	Number of cases
Tuberculous pleuritis	9 (4)
Milliary tuberculosis	1 (1)
Chronic (Resistant)	4 (4)
<b>Total</b>	<b>14 (9)</b>

\* : Anti-PPD antibody titer ; >1 : 1,000 or Anti- $\alpha$ -T antibody titer ; >1 : 2,000 ( ) : Number of culture-positive cases.

改善を認め、7カ月で胸水、腹水ともに消失し、全身状態も改善した。しかし、抗体価の低下は認められたものの、9カ月の時点でも依然としてその値は cut off 値以上であった。

症例4 (Fig. 9) : 65歳, 男性, 肺結核。結核の既往あり。慢性気管支炎で治療中, 1983年6月20日提出の喀痰より8週培養で結核菌陽性。1984年1月9日より強化療法を開始した。抗体価は両者とも1983年5月23日の時点で陽性となっていたが, その時期に Ofloxacin (OFLX) が1週間投与されており, 6月6日の血清では抗体価が更に上昇した。その後やや低下をしたものの, 抗結核薬の投与開始後2~3週で再度, 抗体価が上昇し, 最終的には抗 $\alpha$ T抗体は約3カ月後に, 抗PPD抗体は約8カ月後に陰性化した。

症例5 (Fig. 10) : 43歳, 男性, *M. intracellulare* 感染症。塵肺の既往あり。入院時 Gaffky 2号であったことから, 結核症を疑い, 強化療法を開始した。しかし, その後数回にわたって抗酸菌が分離されたが, 全株ナイアシンテスト (-) で同定の結果 *M. intracellulare* であることが判明し, 最終的には非定型抗酸菌症と診断された。治療開始前は両抗体価ともに陰性であったが, 治療開始



**Fig. 6.** Transition of antibody titers against PPD (●) and  $\alpha$ -T antigen (○) in serum from a patient with active pulmonary tuberculosis (case1). Abbreviation : AFB, Acid-fast bacilli.

Case. 2 S. S. 61y. M.

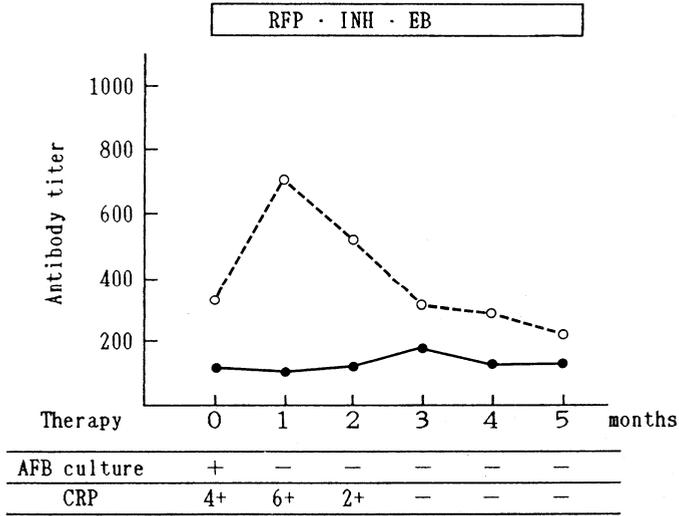


Fig. 7. Transition of antibody titers against PPD (●) and  $\alpha$ -T antigen (○) in serum from a patient with active pulmonary tuberculosis (case 2). Abbreviation: AFB, Acid-fast bacilli.

Case. 3 T. K. 58y. M.

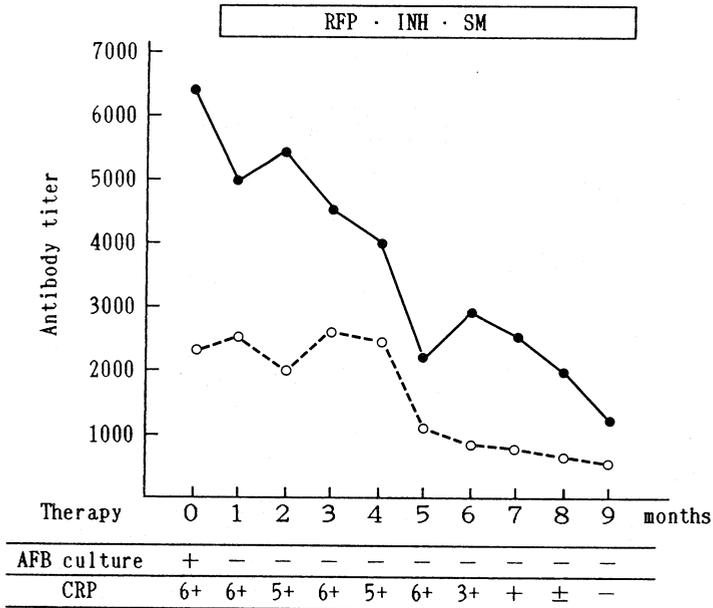


Fig. 8. Transition of antibody titers against PPD (●) and  $\alpha$ -T antigen (○) in serum from a patient with active pulmonary tuberculosis (case 3). Abbreviation: AFB, Acid-fast bacilli.

Case. 4 T.M. 65y. M.

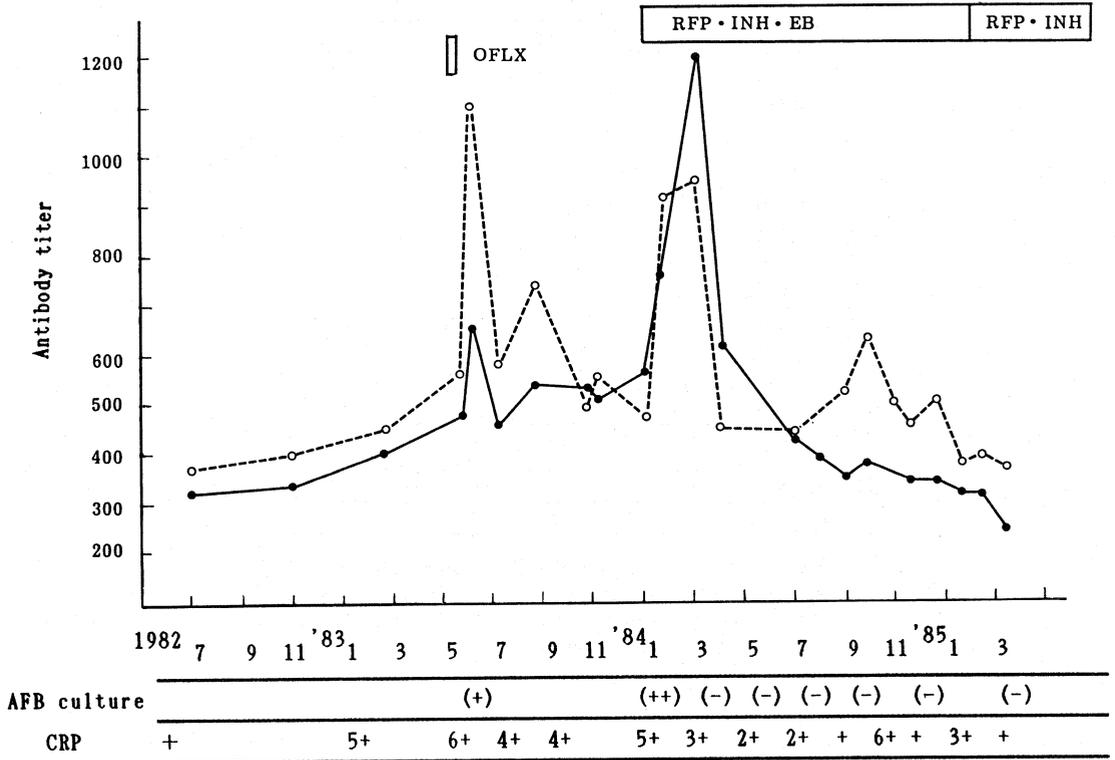


Fig. 9. Transition of antibody titers against PPD(●) and  $\alpha$ -T antigen (○) in serum from a patient with active pulmonary tuberculosis (case 4). Abbreviation : AFB, Acid-fast bacilli.

Case. 5 H. I. 43y. M.

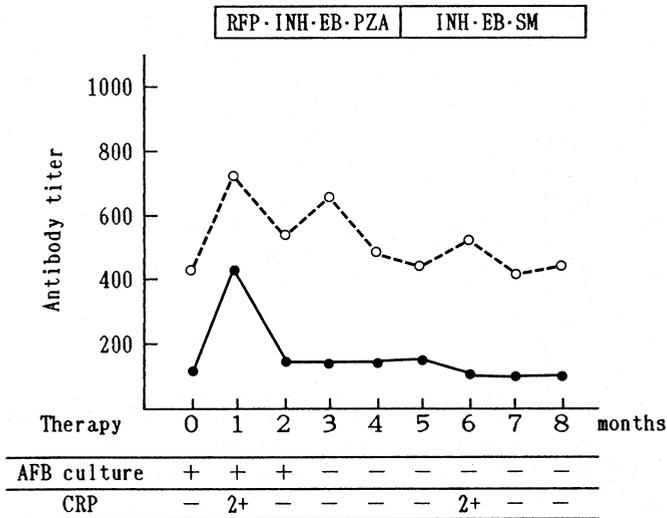


Fig. 10. Transition of antibody titers against PPD (●) and  $\alpha$ -T antigen (○) in serum from a patient infected with *M. intracellulare* (case 5). Abbreviation : AFB, Acid-fast bacilli.

後1カ月でともに陽性となった。抗 PPD 抗体はこのときのみ陽性でその後は陰性化した。抗  $\alpha$ T 抗体は排菌停止後2カ月で陰性化した。

症例6 (Fig. 11): 75歳, 女性, *M. intracellulare* 感染症。胸膜炎の既往あり。入院時気管内採痰により Gaffky 1号で強化療法を開始。その後, 本菌は *M. intracellulare* と同定された。抗  $\alpha$ T 抗体のみ化療前より陽性で化療開始後徐々に低下し, 4カ月で陰性化した。抗 PPD 抗体は全経過中陰性であった。

考 察

感染症における確定診断は病巣または検体から病原体を検出することによってなされるが, 培養や分離が困難なもの, またはこれらに日時を要するものについては, 血清学的検査が試みられている。結核においても同様に染色と培養が中心であるが, 抗酸菌染色陽性であっても抗酸菌の存在の可能性を示唆するに過ぎないし, 結核菌の培養検査は3週以上を要し, 同定を含めると数カ月を要することもある。そのため特に結核性胸膜炎などでは経気管支的肺生検<sup>10)</sup>などによる病理学的診断や Adenosine deaminase 活性<sup>11)12)</sup>をはじめとした生化学的検査の応用などが試みられているが, 依然として実際には喀痰や胃液などの抗酸菌染色と培養検査が中心であり, 次いで X 線の読影によって診断がなされている。その他, 免疫学的手段としてはツベルクリン反応が汎用されてきたが, BCG 接種の一般化, 皮内反応既陽性発病の増加,

活動性結核での陰性化<sup>13)~15)</sup>などのため, その診断的意義は低いものであった。このような状況を背景として, 近年, 特異性の高い血中抗体価の測定による診断法が注目されるようになった。

結核における血清学的診断は古くから, 旧ツベルクリンを抗原とした感作赤血球凝集試験である Middlebrook-Dubos 反応<sup>2)</sup>やリン脂質を抗原としたカオリン凝集反応<sup>3)</sup>が試みられ, その後, ツベルクリン活性物質, 糖脂質, リン脂質, 可溶性蛋白などを抗原として, 補体結合反応<sup>16)</sup>, 沈降反応<sup>17)18)</sup>, 赤血球凝集反応<sup>19)~21)</sup>, Latex 凝集反応<sup>22)23)</sup>などによる診断が試みられてきた。しかし, 抗原の精製や測定系の感度に問題があり, その臨床的評価は低かった。近年, 蛍光抗体法<sup>24)~26)</sup>, RIA<sup>27)28)</sup>, ELISA<sup>4)5)29)~32)</sup>などの応用によって測定感度が上昇し, また一方では結核菌由来のより精製度の高い抗原を用いた抗体の測定が試みられるようになり, その有用性が報告されている<sup>4)5)</sup>。

今回は2種の抗原を用い, ELISA 法によりヒトの血中抗体価を測定し, 本法の診断的意義並びに病態や治療効果などの指標としての有用性について検討を加えた。近年, ELISA を用いた測定法についての報告がいくつかにみられるが<sup>4)5)29)~32)</sup>, 本法は結核患者において有意に高い抗体価を検出し得るものの再現性に未だ難点がみられ, 患者と健康人とのオーバーラップも大きいことから鑑別には不適當であるという報告<sup>33)</sup>もある。測定の日差変動対策としては基準血清の吸光度をもとに OD

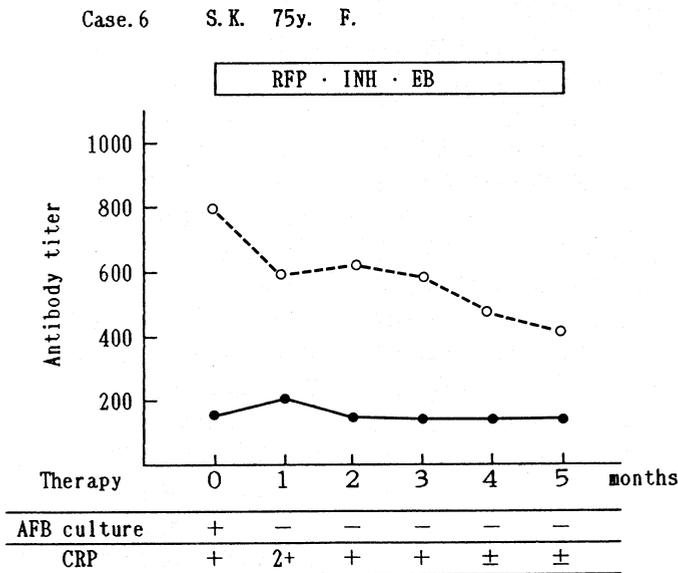


Fig. 11. Transition of antibody titers against PPD (●) and  $\alpha$ -T antigen (○) in serum from a patient infected with *M. intracellulare* (case 6). Abbreviation: AFB, Acid-fast bacilli.

index を算出する方法もあるが、著者は本実験で用いた基準血清で得た標準曲線に基づき、抗体価を算出、補正することによって極めて高い再現性を得ることができた。また、本法では患者と健康人における抗体価のオーバーラップが問題となるが、これを防ぐ方法として、第一に非特異的免疫グロブリンの吸着を防ぎ、その影響を最小に抑えること、第二には特異性の高い抗原を使用することが考えられる。第一の非特異的吸着防止のために、まず従来より一般的に用いられている牛血清アルブミンを用いてみたが、非特異反応が強く認められ、吸光度差が算出できないばかりか、再現性も悪かった。そこで非特異的吸着を防止するためゼラチンや他種のアルブミンなどを検討した結果、ゼラチンで十分な防止効果を認め、以降はこれを採用して非特異反応を最小に抑えることができた。一方、抗原の面では、Benjamin ら<sup>34)</sup>は5種の抗原をELISA法で比較し、最も特異性が高く化学的に単一抗原物質である antigen 5 において良好な成績が得られたと報告している。本研究では今までよく利用され、入手の容易な PPD と精製度の高い単一蛋白である  $\alpha$  抗原を使用し、両者に対する血中抗体価の測定を施行した。 $\alpha$  抗原は福井と米田によって *M. tuberculosis* H37Rv 株の非加熱培養濾液より分離され<sup>6)</sup>、田坂らによって精製された分子量約30,000の蛋白で、それには遅育抗酸菌間で交差反応を示す共通抗原決定因子と、ヒト型結核菌と牛型結核菌に対する特異的抗原決定因子が証明されている<sup>7)</sup>。

活動性結核患者においては、抗 PPD 抗体価、抗  $\alpha$  T 抗体価ともに健康人群や結核以外の疾患群と比較して有意に高い成績が得られた。また、健康成人群の抗体価の対数正規分布における平均値 + 2SD を cut off 値とし、活動性結核患者群における抗体陽性率をみると抗 PPD 抗体は73.8%、抗  $\alpha$  抗体は77.5%とやや低い成績であった。これは BCG 接種の一般化、陳旧性結核患者群の存在、結核感染による免疫能の抑制など種々の因子の存在または菌株間の抗原性の相違などの関与によるものと考えられる。しかし、両者のいずれかが陽性になる頻度でみると91.3%となり、2種の抗原を併用することに意義を認め、結核の診断として高い有用性が示唆された。Reggiardo ら<sup>35)</sup>も、3種の抗原を組み合わせ併用することによって、患者群における陽性率を上げ、健康成人群の偽陽性率を抑えることができると述べている。また、Jagannath ら<sup>36)</sup>は活動性の判定には多種の抗原を用い、種々の方法で判定することが必要であるとも述べている。一方、抗原そのものは精製度が高く、特異性の高いものほど診断の精度は高まるとの報告もある<sup>34)37)38)</sup>。しかし、本実験で用いた抗原のうち  $\alpha$  抗原は遅育抗酸菌に広く認められ、species または complex specific で極めて高い抗原性を有する反面、遅育抗酸菌における共通

抗原基も有することから結核菌に対する特異的抗原性のみならず、結核菌以外の遅育抗酸菌に対しても交差反応が認められている<sup>7)39)</sup>。本研究でも非定型抗酸菌症の症例においては、PPD よりも高い陽性率を認め、BCG 接種後1年以内の小児においても高い抗体価を示し、その判定には注意を要した。今回はヒト型結核菌から分離した  $\alpha$  T 抗原のみの成績を示したが、*M. kansasii* や *M. intracellulare* の  $\alpha$  抗原と比較した実験においてある程度の吸光度の差が認められたことから（未発表）、菌種の鑑別が可能であり、抗酸菌感染症としての診断には有意義であると考えている。

経過を追っての抗体価測定の結果、結核の疑いが強く抗結核薬の投与を開始した症例においては投与後数週間ないしは1カ月頃より抗体価が上昇する傾向が認められた。特に症例4においては慢性気管支炎として治療中、結核菌にも有効な OFLX を使用したことにより、その1~2週間後に著名な抗体価の上昇を認めている。その後、結核の鎮静化、つまり排菌が停止し、炎症所見が改善するとともに抗体価は次第に低下して正常域値にまで復するようであった。但し、抗 PPD 抗体において治療開始後4カ月以上の群において平均抗体価が上昇したような値を示したが、これは高抗体価を示した耐性菌持続排菌例を含めたためであった。これらより抗体価の変動には排菌停止後の期間も関与するが、化学療法開始後の期間がより強く関与している傾向にあり、同様のことを Kaplan & Chase<sup>40)</sup>も指摘している。この現象は PPD や  $\alpha$  抗原が主として結核菌の細胞質に由来する蛋白であるため、薬剤により菌体が破壊されることによって多量の抗原が放出され、それによって宿主が感作されやすくなると考えられるが、一方では結核菌による抗体産生機構の抑制が解除されたという可能性もあり得る。

高い抗体価を示した症例は、胸膜炎の例と化学療法無効の持続排菌例であった。Jagannath ら<sup>36)</sup>は初回治療例より既治療例や再治療例の方が抗体価が高いと報告しており、遅延型皮膚反応の既陽性発病例や再燃例においても本法は有用であると思われる。一方、偽陰性例は低  $\gamma$  グロブリン血症や糖尿病の症例に認められたが、抗体の産生は生体側の反応に依存しているもので、このように液性免疫能の低下している症例においては血清学的な方法のみで診断を下すことにはやや問題が残された。更に未治療例で多量の排菌を認めた症例においても偽陰性であったが、この理由としては活動性結核では結核菌の菌体由来のリン脂質がサプレッサー T 細胞を活性化すること<sup>41)~43)</sup>や活動性結核の初期における circulating immune complex (CIC) の上昇による遊離抗体の減少<sup>44)</sup>なども考えられる。このように排菌陽性にもかかわらず、両抗体価とも低値の症例が数例認められたが、これらは抗酸菌染色の併用によって診断が可能となるこ

ともあった。Zeissら<sup>45)</sup>はELISAによる抗体価測定と喀痰の蛍光染色を併用することにより偽陰性率は低くなると報告している。一般に感染症の血清学的診断における抗体の測定はIgG抗体の検出よりIgM抗体の方が診断的意義が高いものの、結核においてはIgG抗体に比べ、IgM抗体の上昇は著明ではなく、活動性の鑑別には不適當であるという報告がある<sup>30)</sup>。著者もIgM抗体とIgA抗体の測定を試みたが、結核患者と健康人の間で有意の差を認めなかった。これは本邦では若年者の初感染発病例が極めて少なく、高齢者を中心とした既陽性発病例が大多数を占めたためと考えられる。また、遅延型皮膚反応であるツベルクリン反応による細胞性免疫能と液性免疫である血中抗体価との関連性は、いくつかの報告<sup>32)46)</sup>と同じく本実験においても何ら関連性を認めなかった。

以上述べてきた如く、結核における血中抗体価測定は、特異的抗原の選択とともに測定系の感度を高めることによって、診断的価値が高められ、結核の活動性や化学療法の効果判定する上での重要な指標となり得ることを実証した。しかし、抗体価の測定は生体側の反応を反映するものであることから、免疫異常または免疫力の低下した例においては診断的意義が低くなることが予想され、このような患者群における診断法は今後の問題として残された。これに対しては、検体中に存在する結核菌の特異的抗原の検出を試みることによって、宿主側の反応に関係なく診断が可能となろう。事実、結核性髄膜炎の診断においていくつかの試みがなされており<sup>47)48)</sup>、今後は検体中における抗原の検出を併用することによって、免疫学的診断法の意義は益々高くなるものと考えている。

## 結 語

1. ELISA法におけるヒト血清中の抗体価測定時のblocking bufferとして、牛血清アルブミン溶液に代わってゼラチン溶液を用いることにより、非特異的吸着が明らかに低くなった。

2. 抗体価の算出を、陽性基準血清の標準曲線に基づいて補正することによって、高い再現性が得られた。

3. 抗PPD抗体、抗 $\alpha$ 抗体ともに、健康成人群に比し、活動性結核患者において有意に高い抗体価を示した。また、抗PPD抗体の感度は73.8%、特異度は97.0%であり、抗 $\alpha$ 抗体の感度は77.5%、特異度は93.3%であったが、両者を併用することにより感度は91.3%、特異度は91.7%となり、診断的価値がより一層高いものとなった。

4. 治療開始前の排菌早期には両抗体価ともに低値を示す傾向にあったものの、治療開始とともに抗体価の上昇が認められ、抗結核薬が有効な場合には菌の陰性化、炎症所見の消失とともに抗体価の低下が認められた。両

者の抗体価は結核の病態をよく反映しており、治療効果を判定する上での重要な指標となりうる可能性が示唆された。

5. IgG抗体であるため、免疫不全状態や低 $\gamma$ グロブリン血症では低値を示す傾向にあり、免疫異常を来した患者においてはその判定に注意を要した。

## 謝 辞

稿を終るに当たり、ご指導、ご校閲を賜った長崎大学熱帯医学研究所病原細菌学部門、内藤達郎教授、並びに、有益な御教示を賜った長崎大学医学部臨床検査医学教室・臼井敏明教授、長崎大学医学部内科学第二教室・原耕平教授と同齊藤厚助教授に深謝致します。また、 $\alpha$ 抗原を分与頂いた広島大学医学部細菌学教室・田坂博信助教授及び測定系について貴重な助言を頂いた水製薬㈱中央研究所・堀米一己博士に深謝致し、患者血清の収集や多大なご協力を頂いた長崎大学医学部第二内科感染症班の諸先生方及び長崎大学医学部付属病院検査部の皆様に対して謝意を表します。

## 文 献

- 1) 厚生統計協会(編): 国民衛生の動向。厚生指針, 東京, p.151, 1986.
- 2) Middlebrook, G. and Dubos, R. J.: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli, J Exp Med, 88: 521, 1948.
- 3) Takahashi, Y.: Specific serum agglutination of kaolin particles sensitized with tubercle phosphatide and its clinical evaluation as a serodiagnostic test for tuberculosis, Am Rev Respir Dis, 85: 708, 1962.
- 4) Benjamin, R. G. and Daniel, T. M.: Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5, Am Rev Respir Dis, 126: 1013, 1982.
- 5) 重岡秀信: 結核症の補助診断法としての糖脂質抗体価測定, 感染症誌, 59: 984, 1985.
- 6) Fukui, Y. and Yoneda, M.: Extracellular proteins of tubercle bacilli. III. Column chromatographical purification of the proteins of a virulent strains (H37Rv) of *Mycobacterium tuberculosis*, Biken J, 4: 187, 1961.
- 7) Tasaka, H. et al.: Purification and antigenic specificity of alpha protein (Yoneda and

- Fukui) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*, Hiroshima J Med Sci, 32 : 1, 1983.
- 8) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班：非定型抗酸菌症（肺感染症）の診断基準，結核，60 : 51, 1985.
  - 9) Morita, K. et al. : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on Japanese encephalitis virus. IV. A computer system to calculate ELISA endpoint titer from ELISA-OD at a single dilution of test sera, Trop Med, 24 : 131, 1982.
  - 10) 和房代他：肺結核の診断における気管支鏡検査の有用性について，結核，57 : 595, 1982.
  - 11) 林隆司郎他：胸水中 Adenosine deaminase (ADA) 活性値の測定——癌性胸膜炎と結核性胸膜炎を中心として——，日胸痰会誌，19 : 35, 1981.
  - 12) 中村雅博他：胸水の免疫生化学的検査——結核性胸膜炎と癌性胸膜炎の鑑別——，医療，39 : 30, 1985.
  - 13) Mascher, W. : Tuberculin-negative tuberculosis, Am Rev Tuberc, 63 : 501, 1951.
  - 14) Kent, D. C. and Schwarz, R. : Active pulmonary tuberculosis with negative tuberculin skin reactions, Am Rev Respir Dis, 95 : 411, 1967.
  - 15) Howar, W. L. et al. : The loss of tuberculin sensitivity in certain patients with active pulmonary tuberculosis, Chest, 57 : 530, 1970.
  - 16) Boyden, S. V. : The immunological response to antigens of tubercle bacillus. Some experimental aspects, Progress in Allergy, 5 : 149, 1958.
  - 17) Parlett, R. C. et al. : The detection of antibodies in serum of tuberculosis patients by an agar double-diffusion precipitation technique, Am Rev Tuberc, 77 : 462, 1958.
  - 18) Froman, G. et al. : Gel double-diffusion testing for tuberculosis, Am J Clin Pathol, 42 : 340, 1964.
  - 19) Takahashi, Y. and Ono, K. : Hemagglutination reaction by the phosphatide of the tubercle bacillus, Science, 127 : 1053, 1958.
  - 20) Turcotte, R. et al. : A new hemagglutination procedure for the diagnosis of active tuberculosis, Am Rev Respir Dis, 88 : 725, 1963.
  - 21) Reggiardo, Z. and Middlebrook, G. : Serologically active glycolipid families from *Mycobacterium bovis* BCG.—II. Serologic studies on human sera, Am J Epidemiol, 100 : 477, 1974.
  - 22) Duboczy, B. and White, O. F. C. : Latex agglutination test for tuberculosis, Am Rev Respir Dis, 94 : 914, 1966.
  - 23) Cole, R. V. et al. : Development and evaluation of a simple latex agglutination test for diagnosis of tuberculosis, Applied Microbiology, 24 : 525, 1972.
  - 24) Toussaint, A. J. et al. : A soluble antigen fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection, Am J Clin Pathol, 52 : 708, 1969.
  - 25) Mahfouz, M. O. et al. : An immunofluorescence test for detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, Tubercle, 61 : 1, 1980.
  - 26) Shriniwas, K. U. : Soluble antigen fluorescent antibody test in serodiagnosis of pulmonary tuberculosis, Eur J Respir Dis, 67 : 204, 1985.
  - 27) Storey, D. D. et al. : Clinical applications of the radioimmunoassay of secretory tuberculo-protein, Proc Natl Acad Sci USA, 78 : 3214, 1981.
  - 28) Winters, W. D. and Cox, R. A. : Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay, Am Rev Respir Dis, 124 : 582, 1981.
  - 29) Nassau, E. et al. : The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Tubercle, 57 : 67, 1976.
  - 30) 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 tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease, Tubercle, 61 : 145, 1980.
  - 31) Tandon, A. et al. : Diagnostic potentialities of enzyme-linked immunosorbent assay in tuberculosis using purified tuberculin antigen, Tubercle, 61 : 87, 1980.
  - 32) Reggiardo, Z. and Middlebrook, G. : ELISA test for antibodies against mycobacterial glycolipids, J Immunol Methods, 34 : 55, 1980.
  - 33) Narayanan, P. R. et al. : Evaluation of ELISA as a diagnostic test in pulmonary tuberculosis, Ind J Tub, 30 : 29, 1982.

- 34) Benjamin, R. G. et al. : Evaluation of mycobacterial antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis, *J Med Microbiol*, 18 : 308, 1984.
- 35) Reggiardo, Z. et al. : Hemagglutination tests for tuberculosis with mycobacterial glycolipid antigens. - Results in patients with active pulmonary tuberculosis before and during chemotherapy and in healthy tuberculosis contacts, *Am Rev Respir Dis*, 124 : 21, 1981.
- 36) Jagannath, C. et al. : Serology of tuberculosis. II. Measurement of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by a passive haemagglutination test in human tuberculosis, *Tubercle*, 64 : 193, 1983.
- 37) Daniel, T. M. et al. : Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis, *Chest*, 88 : 388, 1985.
- 38) Shrinivas, U. K. et al. : Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis, *Eur J Respir Dis*, 66 : 187, 1985.
- 39) 田坂博信他 : 抗 $\alpha$ 抗体による遅育抗酸菌の血清学的同定に関する研究. *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex および *Mycobacterium kansasii* における抗原の特異性, *結核*, 58 : 631, 1983.
- 40) Kaplan, M. H. and Chase, M. W. : Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. I. Development of antibodies before and after antimicrobial therapy, *J Infect Dis*, 142 : 825, 1980.
- 41) Kazt, P. et al. : Immunoregulation in infection caused by *Mycobacterium tuberculosis* : the presence of suppressor monocytes and the alteration of subpopulations of T lymphocytes, *J Infect Dis*, 140 : 12, 1979.
- 42) Wadee, A. A. and Rabson, A. R. : Binding of phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol to OKT8<sup>+</sup> lymphocytes activates suppressor cell activity, *J Immunol*, 130 : 2271, 1983.
- 43) Wadee, A. A. et al. : Characterization of a suppressor cell-activating factor (SCAF) released by adherent cells treated with *M. tuberculosis*, *J Immunol*, 130 : 2266, 1983.
- 44) Carr, R. I. et al. : Immune complexes and antibodies to BCG in sera from patients with mycobacterial infections, *Clin Exp Immunol*, 39 : 562, 1980.
- 45) 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.
- 46) Radin, R. C. et al. : Antibodies to purified protein derivative in different immunoglobulin classed in the diagnosis of tuberculosis in man, *Int Archs Allergy Appl Immunol*, 70 : 25, 1983.
- 47) Sada, E. et al. : Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay, *Lancet*, Sept. 17 : 651, 1983.
- 48) Chandramuki, A. et al. : Detection of mycobacterial antigens and antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis, *J Med Microbiol*, 20 : 239, 1985.