

原 著

ELISA による肺アスペルギルス症の血清学的診断

山本節子・戸井田一郎
和田雅子・細島澄子

結核予防会結核研究所

工藤祐是

日本BCG研究所

受付 昭和63年9月2日

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF PULMONARY ASPERGILLOSIS BY ELISA

Setsuko YAMAMOTO*, Ichirou TOIDA, Masako WADA
Sumiko HOSojIMA and Sukeyoshi KUDOU

(Received for publication September 2, 1988)

Pulmonary aspergillosis usually develops on the basis of systemic immunosuppression and/or local impairments of respiratory system. Diagnosis of pulmonary aspergillosis has many difficulties. Chest X-ray findings of most cases are complicated with pre-existing changes due to the underlying diseases, and the detection rate of the pathogenic fungi from clinical specimens is unsatisfactorily low. Therefore, immunological or serological diagnosis is urgently required and precipitation-in-gel method has been widely applied.

In this report, we compared clinical usefulness of the determination of anti-aspergillus antibodies by ELISA with that of precipitation-in-gel method. ELISA was carried out according to the method previously reported by us (Yamamoto S. et al. : Kekkaku 62 : 549, 1987).

About two-thirds of 45 healthy adults (control) did not show any detectable IgG anti-aspergillus antibody and mean of IgG anti-aspergillus antibody titer of the control group was 28.97.

Patients, who had shown positive culture of fungus or was clinically diagnosed or strongly suspected as pulmonary aspergillosis, showed significantly high anti-aspergillus IgG antibody titer in comparison with the control group. Further, patients who were positive in precipitation-in-gel tests showed significantly higher IgG antibody titers than those who were negative in that test.

IgG antibody titer determined by ELISA corresponded with clinical diagnosis much more exactly than the results of precipitation-in-gel test. Further, the results obtained by ELISA were objective and quantitative in comparison with the latter test.

We concluded that ELISA was much superior to precipitation-in-gel test and that ELISA IgG antibody titers 2500 or more were confirmative and those between 570 and 2500

* From the Research Institute of Tuberculosis, JATA, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

were strongly suggestive for the diagnosis of aspergillosis.

IgM anti-aspergillus antibody titers were not different among healthy control group and patient groups, and could not be used for the diagnosis.

Key words : Pulmonary aspergillosis, Anti-aspergillus antibody, Precipitation-in-gel test, ELISA

キーワード : 肺アスペルギルス症, 抗アスペルギルス抗体, ゲル内沈降反応, ELISA

序 論

肺アスペルギルス症は、*Aspergillus* 属の真菌によって引き起こされる肺-気管支系の疾患で、臨床的には気管支や肺内に菌球 (fungus-ball) を作る菌球型アスペルギルス症、組織侵襲型のアスペルギルス肺炎、アスペルギルス抗原に対するアレルギー反応の結果として起こるアレルギー性気管支-肺アスペルギルス症の三つの型に分類されている。このうちアレルギー性気管支-肺アスペルギルス症を除く他の二つの型は、*Aspergillus* 属真菌による肺の感染症にはかならないが、健康な生体の健康な肺-気管支に一次的に *Aspergillus* 属真菌感染が起こることはほとんどなく、大部分の症例では全身的な免疫機構の欠陥があるか、肺-気管支に局所的な傷害があるか、またはその両方の場合に二次感染として発生する。

Aspergillus 感染の土台となる基礎疾患としては、先天性および後天性免疫不全、白血病、悪性腫瘍末期、臓器移植後の免疫抑制剤使用時、血液透析中などの全身的な免疫能の低下を引き起こすものや、結核症や肺化膿症の遺残病変、特に空洞の残存、肺癌や肺結核症のための胸部手術後、気管支拡張症、膿胸など肺-気管支に局所的な傷害を残すものがあげられる。化学療法や外科療法などによって肺結核や肺癌なども、多かれ少なかれ局所的な傷害を残した状態で治癒にもちこむことができるようになり、このような局所的な傷害を土台にした二次的肺アスペルギルス症の例は、今後ますます増加すると考えられる。したがって、これらの基礎疾患を持つ患者に対しては、肺アスペルギルス症発生の可能性を常に考慮して早期発見に努めねばならない。

しかし肺アスペルギルス症の診断には、多くの困難がつきまわっている¹⁾。一般的に肺感染症の診断には、胸部エックス線写真を始めとする画像診断と、喀痰・肺気管支洗浄液・生検材料などの検査材料からの病原体検出とが最も有力な手段であって、多くの病気ではこの両方法によって確定診断に到達できるが、肺アスペルギルス症の場合には、この二つの方法によって確定診断が得られる可能性はかなり少ない。肺アスペルギルス症を疑わ

せるエックス線所見としては、菌球の存在と肋膜肥厚があげられている。しかし、菌球は典型的なものは別として他の類似所見との区別は容易ではなく、肋膜肥厚は他の原因によるものとの鑑別は不可能であり、特に肺アスペルギルス症の大部分の症例は他の基礎疾患の土台の上に発生するために、胸部エックス線写真で既存の病的所見から肺アスペルギルス症による所見をよりわけるとは非常に困難である。喀痰を始めとする検査材料から真菌が検出されれば診断の有力な根拠となるが、喀痰や洗浄液のような比較的容易に採取できる検査材料からの真菌の検出率は非常に低い。また *Aspergillus* 属の真菌は比較的広く自然界に常在しているので、外界からの混入の可能性も十分考慮しなければならない。

このような理由で、免疫学-血清学的検査が重要な地位を占めることになる²⁾⁻⁴⁾。従来からもアスペルギルス症の診断にはゲル内沈降反応による抗アスペルギルス抗体の検出が広く用いられてきたが、感度の点では満足できるとしても、特異性や定量性の点で不満足な点が多かった。

われわれは、ELISA による抗アスペルギルス抗体の測定を試み、その臨床的有用性を検討したので報告する。

材料と方法

1) 検査対象：結核予防会結核研究所付属病院で、種々の肺疾患で治療中の入院または通院患者のうち、1987年5月16日から10月29日までの間に、抗アスペルギルス沈降反応検査のために提出された血清について、沈降反応と平行してELISAによる抗アスペルギルス抗体価 (IgG 301症例 計439検体, IgM 242症例 計319検体) を測定した。

抗アスペルギルス沈降反応検査は、当時当病院では新患に対し必ず全員実施する日常検査メニューに含まれていなかったため、この検査を行った対象患者は担当医が検査の必要を認めたものであり、その意味で任意集団でなく選択のかかった集団である。

別に正常対照群として、埼玉県西南部某事業所 (医療および醸造関係の職種ではない) の正常勤務者の定期検診時の血清45検体についても測定した。

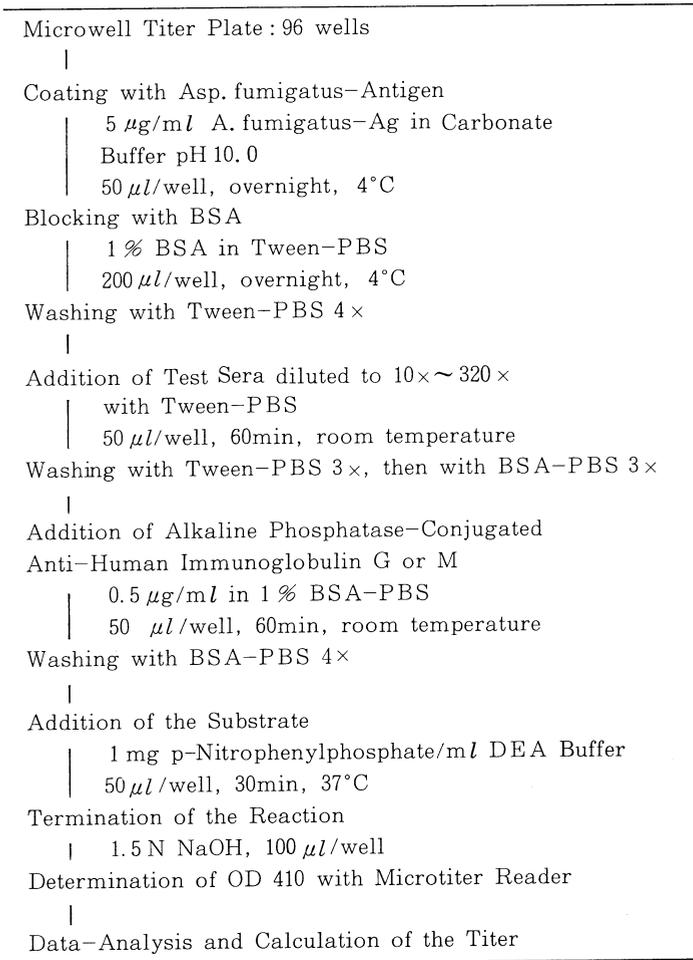


図1 Procedures for ELISA

2) ELISAによる測定法：先に報告した抗 PPD 抗体の測定法⁵⁾によった。すなわち 10 倍から 320 倍までの 6 段階 2 倍希釈血清を用い、12 wells を 1 検体用とし、6 wells に抗原として鳥居薬品株式会社製アレルギーンスクラッチエキス・トリイアスベルギルスの 2,000 倍希釈液を 0.25 µg/well 加え、6 wells には抗原を加えないブランクを各被験希釈血清ごとに置いた。二次抗体としては Kirkegaard & Perry 社製 Goat-anti-human IgG (γ)-あるいは IgM (μ)-alkaline phosphatase 標識抗体を 0.025 µg/well 用い、酵素の基質には p-nitrophenylphosphate を用いた。図 1 に示した手順によって OD410 を ELISA Reader (Dynatech 社製 MR-600) で測定した後コンピュータにて、被験血清の各希釈段階ごとの抗原 (+) の OD から抗原 (-) の OD を差し引いた ΔOD 値を縦 (Y) 軸に、血清希釈度の対数を横 (X) 軸にとり、ΔOD-希釈度 (対数) 曲

線を描かせ、その曲線の直線部分をはずれた測定値を除外する補正を行った後、この曲線の直線部分の理論式 $Y = A_0 + A_1 (\log X)$ ($Y : \Delta OD$, $X : \text{希釈度}$) を求め、 $Y=0$ のときの X の値より被験血清の ELISA による IgG および IgM 抗体価を計算した。

今回の正常対照群は例数が少ないので実際の検討はできなかったが、PPD 抗体測定の実験から正常対照群の抗体価の分布は対数正規分布と考えられるので、平均値および標準偏差は、抗体価をいったん対数変換して計算し常数にもどして求めた。計算の便宜上 10 倍希釈血清での $\Delta OD < 0.1$ の場合には抗体価を 10 とした。

3) 沈降反応の方法⁴⁾：抗アスベルギルス沈降反応は、Zapeck Dox 培地にアスベルギルス症患者からの分離株の胞子を表面培養し、6 カ月後濾紙濾過した濾液を約 1/200 に限外濾過濃縮して調製した自家製抗原数種および ELISA の測定に用いたものと同じ市販の抗原を用い、

表1 ELISAによるIgG抗体価

		例数	Mean	Mean + 1 SD	Mean + 2 SD
臨床判定	卅	83	2525.22	4.6259×10^4	8.4742×10^5
	+	88	2906.03	7.4285×10^4	1.8989×10^6
	±	41	1286.77	4237.41	1.3954×10^4
	-	227	96.09	461.32	2214.62
健康対照		45	28.97	128.12	566.50
沈降反応	卅	25	34450.86	5.3820×10^5	8.4178×10^6
	卅	32	7030.72	4.3883×10^4	2.7390×10^6
	+	72	821.49	2.8714×10^4	1.0037×10^6
	±	7	69.92	493.51	3483.37
	-	303	213.06	1706.87	1.3674×10^4

スライドガラス上の寒天薄層による Ouchterlony⁶⁾ のマイクロ法によって行った。

判定は沈降線の無いものを(-), 沈降線が有るか無いか確定し難いものを(±), 薄い1本の沈降線を示すものを(+), 薄い2本または濃い1本の沈降線のもの(+), 沈降線が3本以上のものを(卅)とした。

4) 臨床的判定: 患者群については病歴簿および胸部エックス線写真を調査し, 担当医の診断に従って以下の4群に分けた。

- (卅): 喀痰, 手術材料などの臨床検査検体から *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* などの *Aspergillus* 属真菌が検出されたもの。
- (+): 真菌は検出されていないが, 主として胸部エックス線写真での菌球, 肋膜肥厚などの所見に基づき, 沈降反応の結果を参考にして, 担当医が肺アスペルギルス症と診断しているもの。
- (±): 担当医が一応の疑いをおいて沈降反応や喀痰真菌検査を行っているが, それほど積極的に肺アスペルギルス症を疑っていないもの。
- (-): 念のため沈降反応を調べているが, 担当医は他の疾患と診断しているもの。

成 績

1) 正常対照群のELISAによる抗アスペルギルスIgG抗体価

今回の定期検診で胸部エックス線検査, 血清生化学検査, 血液学的検査, 検尿, 血圧測定で異常を示さず, 正常勤務に従事している成人男女の血清45例のうち, 10倍希釈検体でもELISAにおける ΔOD が0.1未満で抗アスペルギルス抗体陰性と認められた例は29例(64.4%)であった。計算の便宜上これらの検体のELISA抗体価を10としたとき, 正常対照群のIgG抗体価の平均

値28.97, 平均値+2×標準偏差は566.5, 平均値+3×標準偏差は2504.96であった(表1, 図2)。

2) 患者群のELISAによる抗アスペルギルスIgG抗体価と臨床判定との関連

臨床材料からの真菌の検出と担当医の診断を基準として患者を4群に分け, 各群のELISAによる抗アスペルギルスIgG抗体価を比較した。結果を表1および図2に示した。

臨床判定(-)群では正常対照群と有意の差はなく, 臨床判定(±), (+), (卅)群はいずれも正常対照群に対して有意に高いIgG抗体価を示した。

臨床判定(卅)群すなわち検査材料で *Aspergillus* 属真菌が検出されたにもかかわらず, 抗アスペルギルスIgG抗体価10の例が4検体(3症例)あった。これらはそれぞれ71歳, 50歳, および70歳のいずれも男性で, このうち2例は担当医が肺結核症として治療中数回の喀痰真菌検査を行い, 両例ともそれぞれ1回 *A. fumigatus* 1コロニー, *A. niger* 2コロニーの培養陽性をみたもので, 胸部エックス線所見でも肺アスペルギルス症を積極的に疑わせる所見はなく, 検査材料へのコンタミネーションまたは単なるcolonizationである可能性のほうが強い。残りの1例は咯血と中葉症候群を示して入院した時点で *A. fumigatus* 3コロニーの培養陽性が1回あり, アンチコルによる抗真菌治療が行われた症例で, 検査時点では真菌感染が治癒または安定化しているための陰性と考えられる。なお, 3例はともにアスペルギルス沈降反応も陰性であった。

他に臨床判定(卅)であって今回のELISAによる抗体価が正常対照群の平均値+2×標準偏差にあたる570以下の例が16検体(7症例)あったが, これらのうち5例は *Aspergillus* 属の検出後肺切除手術, 1例はアンチコル治療を行っており, いずれも1~4年を経て経

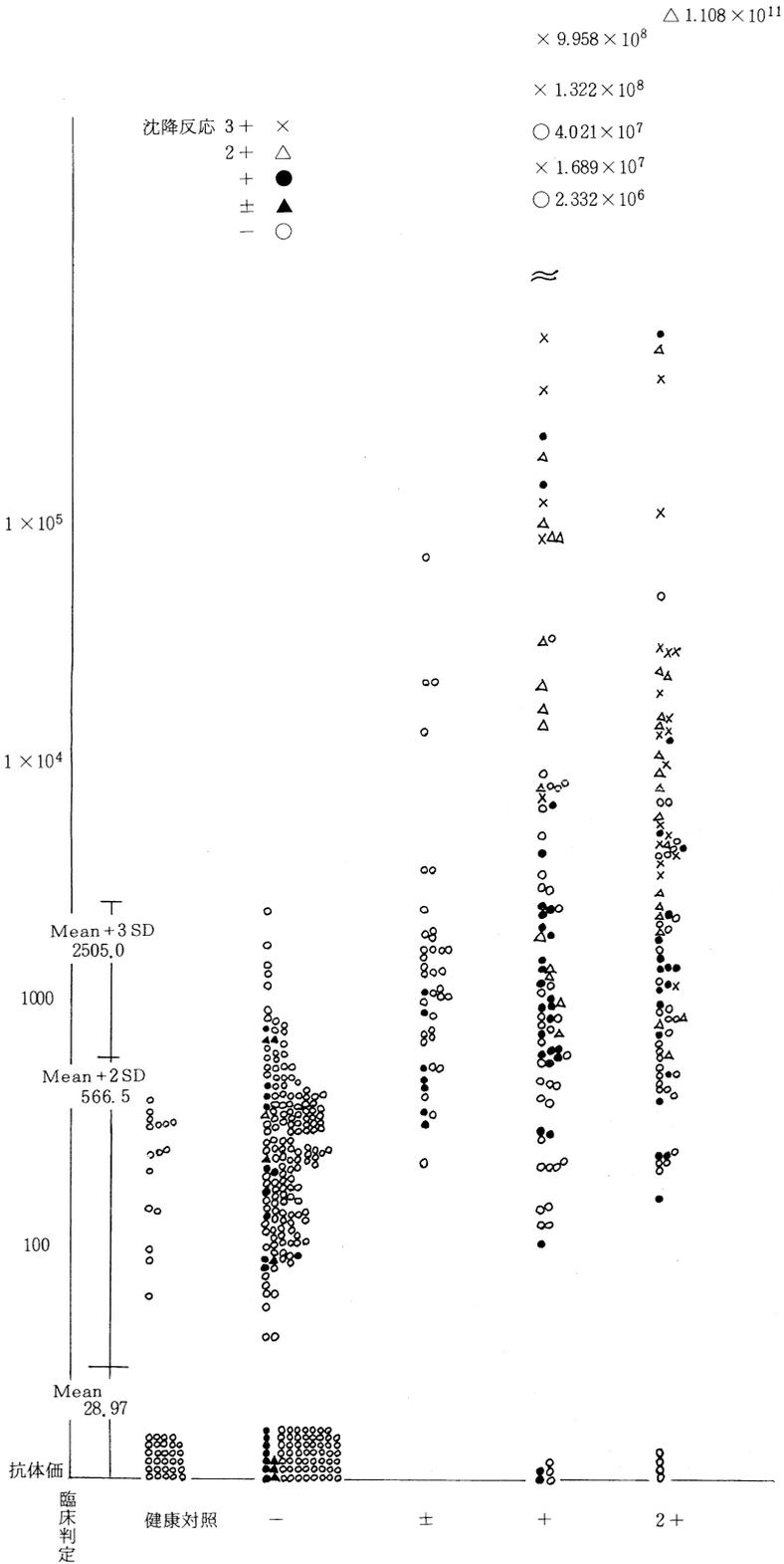


図2 ELISAによるIgG抗体価と臨床判定・沈降反応との関連(全検体)

過順調なもので、真菌症治癒による抗体価の低下と考えられる。残り1例についてはコンタミネーション (*A. fumigatus*) の疑いがかなり強かった。

臨床判定(+)のうちには抗体価570以下のものが24検体(10症例)あり、このうち繰り返しの検査でも常に570以下であったのは12検体(4症例)であるが、2例は抗真菌治療を行い病状が安定している例であり、2例は主として胸部エックス線所見にもとづく担当医の診断で、今回のエックス線写真の見直しでは診断に疑問の余地の残る例であった。

3) 患者群の ELISA による抗アスペルギルス IgG 抗体価と沈降反応との関連

沈降反応の成績によって患者を(-), (±), (+), (H), (HH)の5群にわけ、各群の ELISA による抗アスペルギルス IgG 抗体価を比較した結果を表1および図3に示した。

沈降反応が(H)および(HH)の群は、正常対照群と比較して明らかな有意差をもって高い ELISA 抗体価を示し、また正常対照群の平均値+2×標準偏差にあたる570以下の例は1例もなかった。なお、これら両群では臨床判定はすべて(H)および(+)であった。沈降反応(+)の群も正常対照群に比して有意に高い ELISA 抗体価を示した。沈降反応(+)の群で ELISA による抗体価10の例が9検体(8症例)にみられたが、このうち7例は臨床判定(-)であり、残りの1例は臨床判定(+)で抗真菌剤治療を行っており、病状が安定ないし治癒したと考えられる例であった。ELISA 抗体価570以下のものが24検体(18症例)あり、そのうち臨床判定(H)のものは5検体(1症例)で、この症例は真菌検出後手術を行って2年以上順調に経過した症例であった。また臨床判定(+)のものは4検体(3症例)で、1例は抗真菌剤治療を終了して経過順調なもの、1例は診断に疑問の余地のあるもの、1例は二度目の測定で高い ELISA 抗体価を示した。残りは臨床判定(±)のものが5検体(5症例)、臨床判定(-)のものが10検体(9症例)であった。

4) 各症例における ELISA による IgG 抗体価と沈降反応、臨床判定の関連

図4に各症例についての ELISA による IgG 抗体価と沈降反応、臨床判定の関連を総合的に示した。繰り返し測定を行った症例では、最も高い測定値をその症例の抗体価とした。

この結果から沈降反応(-)または(±)の群にも臨床判定(H)または(+)の例が無視できぬ数存在しており、逆に沈降反応(+)の群にも臨床判定(-)または(±)の例がかなりの数で存在している。一方、ELISA による抗体価では正常対照群の平均値+3×標準偏差にあたる2,500以上のものは、48例中42例は臨床判定(H)

または(+)で残り6例が(±)であり、平均値+2×標準偏差にあたる570以上2,500以下のものについては、沈降反応(+)以上のものは17例中15例が臨床判定(H)または(+)であり、沈降反応(±), (-)のものでは臨床判定(±)のものが多く(H), (+), (-)のものも混在していた。

5) 正常対照群および患者群の ELISA による抗アスペルギルス IgM 抗体価と臨床診断との関連

正常対照群の ELISA による IgM 抗体価の平均値は395.55、患者群では臨床判定別の各群で316.01~494.79、沈降反応判定別の各群で206.78~406.16であって、いずれの群でも正常対照群と差がなかった(表2, 図5)。

考 察

ELISA の導入によって適切な抗原が調製または入手できる場合には、血清中の特異抗体の測定は比較的簡便に行えるようになった。しかし、測定技術そのものにかかわる問題は別としても、測定結果の判定にはいろいろの問題が残されている。感染症の診断のための血清抗体価の測定に ELISA を応用した多くの報告では、吸光度そのまま、または検体の吸光度と標準血清の吸光度との比を結果の判定に用いているが、これらの値はある特定の測定条件下でのみあてはまるいわば任意に設定した値であり、測定条件の変動に影響されやすく、再現性に乏しく、他の施設の成績と比較することができない。このような欠点を克服し、測定条件の変動に影響されず、客観的で、統計処理を行うことができ、他の施設の成績と比較できるような絶対的な値として、先に山本ら⁵⁾は6段階希釈血清系列を用い、吸光度-希釈度曲線の直線部分を外挿し、コンピュータ処理して血清の抗体価を求める方法を発表している。

今回この方法を応用して、肺アスペルギルス症を疑わせる胸部疾患患者の血清中の抗アスペルギルス抗体の測定を行った。

序論で述べたように肺アスペルギルス症は全身的な免疫低下または局所的な欠陥をもつ個体に二次的におこることが多く、胸部エックス線写真、臨床検体からの真菌検出および臨床症状から確定的な診断を下すことは非常に困難である。このため従来から沈降反応などの血清学的な方法による検査が重視されてきた。しかし、沈降反応は定量性がなく、判定に多少とも主観がはいる、また偽陽性の率も高いために、必ずしも十分に信頼されていなかった。

今回 ELISA による抗体価を担当医の臨床判定および沈降反応の結果と比較検討した結果、ELISA による抗アスペルギルス IgG 抗体価は、肺アスペルギルス症の診断に非常に有用であることが明らかになった。あらかじめ ELISA 用マイクロタイタープレートに抗原を固着

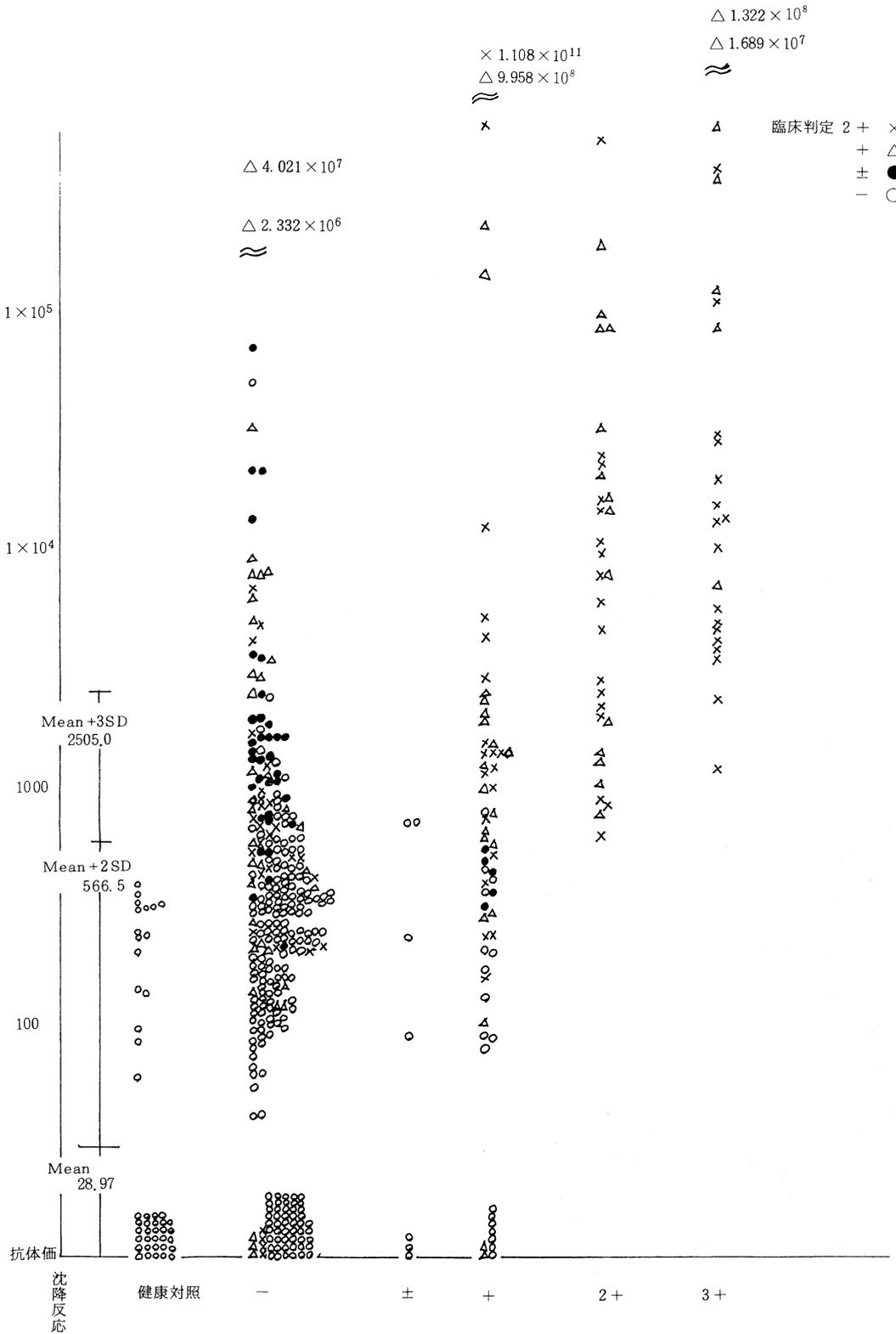


図3 ELISAによるIgG抗体価と沈降反応・臨床判定との関連(全検体)

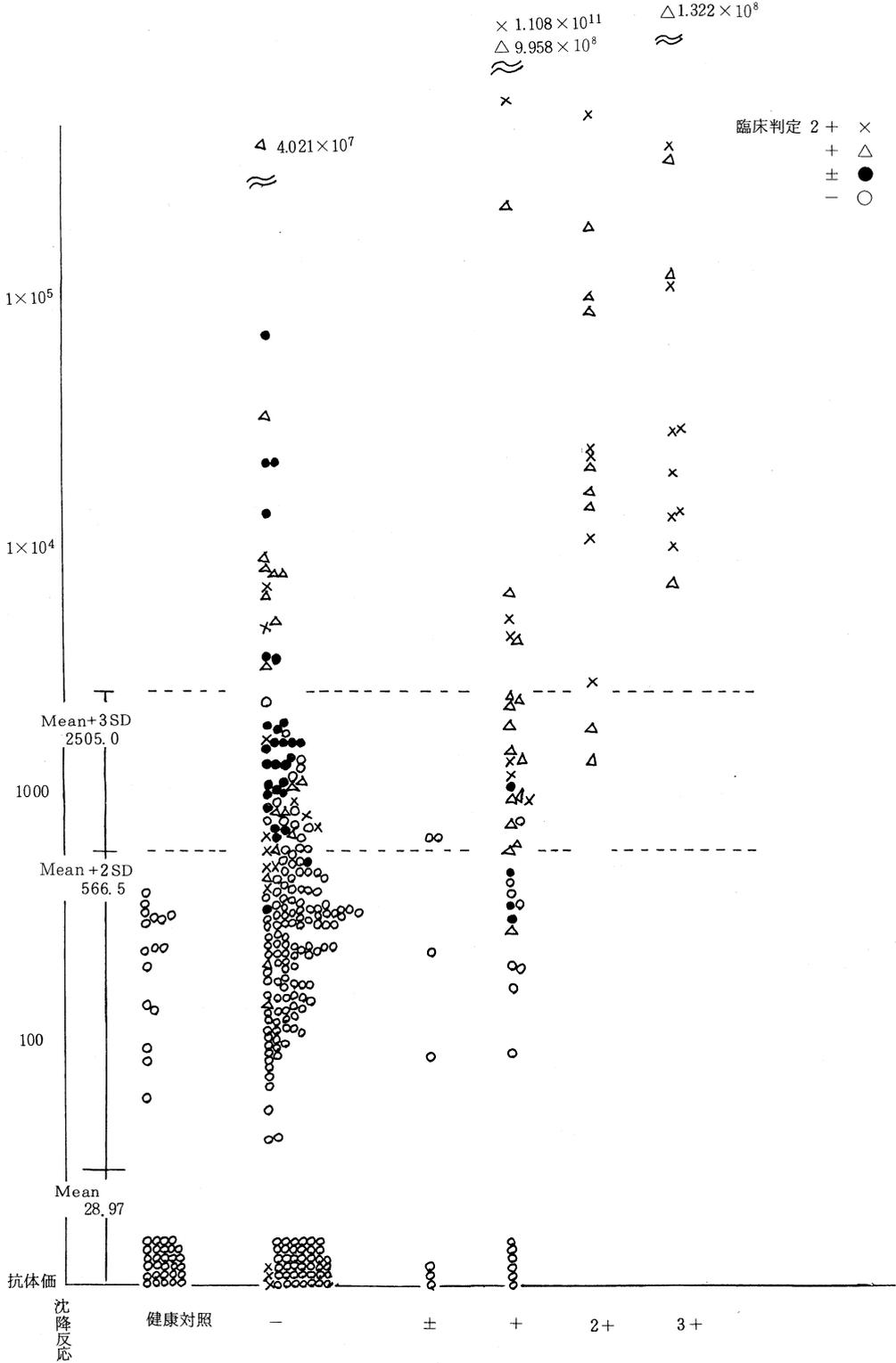


図4 各症例におけるELISAによるIgG抗体価と沈降反応・臨床判定との関連

表2 ELISAによるIgM抗体価

		例数	Mean	Mean+1 SD	Mean+2 SD
臨床判定	++	63	494.79	2120.80	9071.94
	+	63	407.29	2055.42	1.0373×10^4
	±	31	432.71	2016.97	9401.56
	-	162	316.01	1765.22	9860.52
健康対照		45	395.55	1826.00	8429.46
沈降反応	+++	18	406.16	1966.07	9517.00
	++	22	341.98	1044.96	3193.01
	+	57	338.45	1948.95	1.1223×10^4
	±	6	206.78	1232.82	7350.21
	-	216	393.19	2060.63	1.0799×10^4

