

説 説

結核症早期診断のための抗結核菌抗体の検出・測定、
特に ELISA について

戸井田 一 郎 ・ 山 本 節 子

結核予防会結核研究所
受付 平成2年1月24日DETERMINATION OF ANTI-MYCOBACTERIA ANTIBODY TITERS BY ELISA
FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

Ichiro TOIDA* and Setsuko YAMAMOTO

(Received for publication January 24, 1990)

Determination of anti-mycobacteria antibody titers by ELISA for the early diagnosis of tuberculosis was critically reviewed from methodological point of view.

Especially, the method of data-handling to calculate the antibody titers from optical density values obtained by ELISA and also the method to evaluate the clinical usefulness of this test were reassessed.

Determination of anti-mycobacteria antibody titer by ELISA is highly sensitive and satisfactorily specific, and far more useful than, or at least as useful as, various on-going methods for the early diagnosis of pulmonary as well as extra-pulmonary tuberculosis.

This test should be included in a routine examination system for the diagnosis of tuberculosis in the clinical laboratories.

Key words : Tuberculosis, Early Diagnosis, Antibody Titer, ELISA

キーワード : 結核症, 早期診断, 抗体価, 酵素免疫測定法

1. はじめに

結核症においては、感染防御免疫や遅延型過敏性反応のような主要な免疫現象は、Tリンパ球とマクロファージを中心とする細胞性免疫によることが明らかにされている。しかし、このことは結核症においてBリンパ球系列による抗体産生が行われないことを意味するのではなく、結核菌の感染を受けた生体では、結核菌の種々の菌体成分に対する種々の抗体が産生される。このような

抗体の検出・測定を結核症の早期診断に利用しようという試みは早くから行われており、結核症の血清診断の歴史・いろいろな方法の紹介と比較については、Grange¹⁾、LindとRidell²⁾、LeelarasameeとBovornkitti³⁾の総説に詳しい。

最近、ELISAの導入・普及によって各クラスごとの特異的な抗体の測定が容易に実施できるようになり、結核症の診断に応用した報告も表に示すように数多く発表されており^{4)~63)}、DanielとDebanne⁶⁴⁾はこれらの

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose 204 Japan.

表 ELISAによる抗体測定の結果への応用

年次	著者	文献	抗体クラス	抗原	試料	希釈	酵素	プロッキング	抗体価の判定	地域	感度 (患者群の陽性率)	特異性 (対照群の陰性率)
76	Nassau ら	4	globulins	tuberculosis 抽出液	血清	100 500	AP	/	OD	イングランド	84 肺外結核 67 62	92 98
80	Reggiardo ら	5	G	BCG 糖脂質 A1 B1 C	血清	20 320 640	PO	BSA	OD	ボルチモア	91 レブラ 80 74 70 57 60	ツ(+) 100 ツ(-) 98 100 96 98
	Tandon ら	6	G	PPD	血清	100	AP	/	OD	ルクノウ(インド)	菌(+) 79.4 菌(-)	56.2 96
	Grange ら	7	G A M	BCG ソニケート	血清	500	PO	/	OD	東ジャワ	75.2 31.4 11.8	クローン病 82.5 55 72.5
	Grange ら	8	G	BCG ソニケート kansasi ソニケート smegmatis ソニケート	血清	500	PO	/	OD	東ジャワ	81 78 78	
81	Daniel ら	9	G M	tuberculosis 培養濾液 arabinogalactan Antigen 5 Antigen 6	血清	20→1280	AP	BSA	(d)の(1)	ポリビア		
	Reggiardo ら	10	G	BCG 糖脂質 A1 B1 C	血清	20 320 640	PO	BSA	OD	ボルチモア	85.1 MOTT 75.7 52.7 47.0 47.3 48.5	97.9 100 97.9
82	Benjamin ら	11	G	Antigen 5	血清	20→1280	AP	/	(d)の(1)	ポリビア クリーブランド	20倍希釈で 98.0 92.0 60.9 40倍希釈で 94.0 84.0 52.2	ツ(+) 58.3 ツ(-) 66.7 79.9 95.8
	Viljanen ら	12	G A M	PPD	血清	100	AP	正常ヒツジ血清	OD (標準血清で補正)	フィンランド	Grade I II II 13 43 80 13 36 80 20 43 60 33 64 100(どれかにプラス)	
	Zeiss ら	13	G	PPD	血清	1000	AP	BSA	OD	シカゴ	100	100
	Stroebel ら	14	G	Antigen 6	血清	16→2048	AP	BSA	(d)の(2)	ホンコン	骨・関節結核 94	100
	Kardjito ら	15	G A M	BCG ソニケート	血清	500	PO	/	OD	ジャバ	ツ(-)を対照 ツ(+)を対照 77 62 40 16	97.5 97.5 97.5

83	Benjamin ら	16	G	PPD Antigen 5 Antigen 6 PPD-kansasii	血清				(d)の(2)	クリーブブランド	
	Kalish ら	17	G	PPD	CSF	16→1024	AP	BSA	OD	シカゴ	97
	Gupta ら	18	globulins	PPD	血清	100	AP	/	OD	ルクノウ(インド)	菌(+) 79.1 菌(-) 65.2
	Narayanan ら	19	G	PPD	血清	80	PO	/	OD	インド(マドラス)	日間変動と対照とのオーバーラップのためあまり価値なし
	Radin ら	20	G	PPD	血清	1000	AP	BSA	OD	シカゴ	100
			M		血清	10					95.5
			A		血清	10					100
			分泌 A		血清	10					(検出されず)
			E		血清	1					
	Kalish ら	21	G	PPD	血清	1000	AP	BSA	OD比	シカゴ	77.8 MOTT 33.3
84	Zeiss ら	22	G	PPD	血清	1000	AP	BSA	OD比	シカゴ	菌(+) 67 菌(-) 79 MOTT 62
	Balestrino ら	23	G	Antigen 5 PPD	血清	20→1280	AP	/	(d)の(1) log	アルゼンチン	40倍希釈で81.4 80倍希釈で64.0 82.6 72.1
	Hernández ら	24	G + M	凍結乾燥 BCG	CSF	5	AP	BSA	OD	メキシコ	100
	Benjamin ら	25	G	tuberculosis 培養濾液 Antigen 5 Antigen 6 PPD-tuberculosis PPD-kansasii	血清	20→1280	AP	/	(d)の(2)	クリーブブランド	40倍希釈で 85 80倍希釈で 79 40倍 87 80倍 92
	越野 ら	26	G	PPD	血清	100	AP	BSA	OD	金沢	93.3 不活動性 25
	小西 ら	27	G	PPD	血清	40→5120	AP	/	(d)の(2)	岩手	100 休止性 63.6 不活動性 36
85	Daniel ら	28	G	PPD Antigen 5	血清	20→1280	AP	BSA	(d)の(1)	クリーブブランド	80倍希釈で31.7 40倍希釈で56.1 48.8 63.4
	Kiran ら	29	G	PPD H37 Ra ソニケート H37 Ra 粗抽出液	血清	100	PO	BSA	OD	ニューデリー	塗抹(+) 93.9 塗抹(-) 52.9 96.9 88.2 93.9 94.1
	Daniel ら	30	G	P P D Antigen 5	血清	20→1280	AP	BSA	(d)の(1)	各地	ボリビア クリーブブランド アルゼンチン 中国 クリーブブランド アルゼンチン 中国 クリーブブランド / / 72.1 / 31.7 / 83.5 93.2 40倍 83.1 84 68 64 89 48.8 / 93.6 100 100 98.3

(つづく)

86	Daniel ら	31	G	Antigen 5	血清	75	AP	／	(d)の(1)	ポリヒア	69±6	88±3
	Ma ら	32	G	Antigen 5	血清	20→1280	AP	／	(d)の(1), (log転換)	北京	III型 80 IV型 100	100 他疾患 90.4
	Affronti ら	33	G	Tuberculo-protein A Tuberculo-protein C	血清	400	PO	BSA	OD	ワシントンDC	100 レブラ 100 Aより劣る	69.2
	Krambovitis ら	34	G	Plasma Membrane Antigen	血清	40	PO	／	OD比	イングラント	75 肺外 90	97 肺外 84
	Thongkrajati ら	35	G + A + M	PPD	血清	128	PO	BSA	肉眼比色	コン・ケン(タイ)	活動性 75 不活動性 78.6	83.1
	Krambovitis ら	36	G	Plasma Membrane Antigen	血清	40	PO	／	OD比	アトリア(南ア)	新発生 92.5 再燃 100	85
	Chawla ら	37	G	H37Ra 粗抽出液	血清	100	PO	BSA	OD	ニューデリー	腸結核 91.8	87.5
	Gandhi ら	38	G*	H37Ra 粗抽出液	血清	50	PO*	セラチン	OD	ニューデリー	腸結核 100	インド正常 86.4 /ルウェー正常 97.0
87	Kato ら	39	G A M	H37Rv リン脂質	血清	10000 100 10	PO	BSA	OD	札幌	73.6	89.6
	Mohan ら	40	G	BCC 粗抽出液	血清	2倍希釈系列	AP	BSA	(d)の(2), (log転換)	スリナガール(インド)	100 髄膜炎 100 リンパ節結核 100	93.3
	Narayanan ら	41	G	種々のニコバクテリアのソニケート PPD	血清	40→2560	PO	／	OD	マドラス(インド)		
	Thole ら	42	G	組換え 64kDa タンパク	血清	200	PO	／	OD	アムステルダム	菌(+) 80 suspected 70 MOTT 80	接触者30 BCC感染者 30-35 10歳以下 70
	草野	43	G	P P D α-抗原	血清	500	AP	セラチン	(c) (log転換)	長崎	73.8 (併用 91.3) 77.5	97.0 (併用 91.7) 93.3
	長江 ら	44	G	PPD SSM	血清	2000	AP	／	(c)	埼玉	75	91.7
	山本 ら	45	G M	PPD	血清	10→320	AP	BSA	(e) (log転換)	東京	57.4 MOTT 56.3	95.8 96.1
	Wadee ら	46	G	tuberculosis ソニケート (ヒト IgGで吸収)	血清	40	PO	BSA	OD	ヨハネスブルグ (南ア)	100	100
	Chau ら	47	G	PPD	血清	100	AP	BSA	OD比	ホンコン	75.8 泌尿器 71.4 リンパ節 38	100

88	Torgal Garcia ら	G	tuberculosis	血清	250	β G	/	OD	リスボン	不満足	86.1
		M	phenol 糖脂質							97.5	
	Levy ら	G	tuberculosis ソニケート (ヒト IgGで吸収)	血清	40	PO	BSA	OD	ヨハネスブルグ (南ア)	70.0	86.4
	Raja ら	G	H37Ra 培養濾液	BAL	1	AP	BSA	OD	クリーブランド	72.2	82.2
		A	Antigen 5							} はっきりしたカット・オフ点なし	
	Levy ら	G	tuberculosis ソニケート (ヒト IgGで吸収)	血清	40	PO	BSA	OD	ヨハネスブルグ (南ア)	100	100
	Raheman ら	G	tuberculosis 粗抽出液	血清	1000	PO	/	OD比	ナグアール(インド)	86.7	97.9
	Agarwal ら	G	H37Rv 照射全菌体 H37Rv ソニケート PPD	血清	300	PO	BSA	OD	デリー(インド)	よくない	よくない
										80.7	100
	Raheman ら	G	tuberculosis 加熱死菌体 細胞壁 粗抽出液	血清	1000	PO	/	OD比	ナグアール(インド)	94.7	100
										82.3	81.9
										84.0	92.6
	Turner ら	G	BCC-P32 タンパク	血清	200	PO	ゼラチン	OD比	アルツセル	86.7	97.9
		A			20					55	95
		M			80					40	95
	van Vooren ら	G	BCC 粗抽出液	血清	2倍連続系列	PO	/	(d)の(1)	アルツセル	差なし	/
										90.3	39.5
	Watt ら	G+M	BCC-抗原	CSF	64	PO	BSA	OD	マニラ	髄膜炎 24	98
	Huygen ら	G	PPD	血清	200	PO	ゼラチン	OD比	アルツセル	95	100
			BCC-P32 タンパク							77	100
	Mauch ら	G	tuberculosis 粗抽出液	血清	64→128	PO	/	(c)	ベルリン	73	93.5
89	Alde ら	G	Antigen 5	血清	20→1280	AP	/	(d)の(1)	アエノスアイレス	85.7 (1~4歳)	100
	Makonkawkeyom ら	G+M+A	H37Rv 糖脂質	血清	100	PO	BSA	OD	チェンマイ(タイ)	菌(+) 55.9 菌(-) 19.0	83
	Espitia ら	G*	tuberculosis 38kD 抗原	血清	1000	PO*	BSA	OD	メキシコ	68.9	96
	Thongkrajai ら	G	tuberculosis 精製抗原 培養濾液	血清	40→5120	PO	ミルク・ パウダー	(d)の(2)	コン・ケン(タイ)	90.7 不活動型 54	90.7
			PPD							90.6	54.1
										75	83

* 酵素標識タンパク A 使用

報告を総括し ELISA の有用性について考察している。しかし、これらの報告や総説にはいくつかの問題点があり、この総説では、われわれ自身の経験をふまえて、理論的な見地から結核症診断への ELISA の応用に関連した諸問題について検討する。

2. 原理と手技

ELISA の原理および基本的な手技については Engvall と Perlmann⁶⁵⁾ の最初の報告以来多数の報告があり、石川ら⁶⁶⁾、Tijssen⁶⁷⁾ による単行本や Voller ら⁶⁸⁾ の総説が有益である。抗体の測定は、普通、最も簡単な間接法で行われる。その原理を模式的に Fig. 1 に示した。すなわち、固相 (マイクロタイター・プレートが最も便利であり、最も広く使用されている) を抗原でコートし、抗体の非特異的な吸着を防止するためのブロッキングを行い、テストしたい試料 (例えば、血清、浸出液、脳脊髄液など) を加えて試料中の抗体を固相に固着している抗原に結合させ、次いで酵素で標識した二次抗体 (例えば、ヒトの IgG 抗体を測定したいときは酵素標識抗ヒト IgG 抗体) を加えて固相の抗原に結合している抗体にさらに結合させ、最後に酵素の基質を加えて酵素活性を測定する。酵素活性の測定のためには、マイクロタイター・プレート用の光電光度計や蛍光光度計が市販

されている。テストの各段階ごとに十分に洗浄を行う。このような原理に基づいたテストが結核菌に対する抗体の測定にどのように応用されているかを表にまとめた。

1) 抗原: 抗結核菌抗体の測定にあたっては、結核菌の音波破砕やプレスによる粗抽出液、PPD のような部分精製抗原, antigen 5, アルファ抗原, 38 kD タンパクのような精製タンパク抗原, 糖脂質抗原などが使われている。精製抗原を用いた研究者は、一般的に、精製抗原の利点を強調しているが、どの抗原が最も適切であるかは目的によって異なる。臨床診断が目的の場合には、必ずしも精製抗原が粗標品よりも優れているとはいえず、むしろ、種々の抗原を含み種々の抗体をできるだけ広く検出する粗標品のほうが感度の点では当然優れている。逆に、感度を多少犠牲にしても特異性を高めたい場合、例えば結核症と非定型抗酸菌症との鑑別が要求される場合などでは、特異性の高い精製抗原を用いる必要がある。現実には、感度と特異性の両方をすべての場合に満足させるような抗原はなく、目的に応じた抗原を、入手の便宜さをも考慮して、選ばざるをえない。

2) ブロッキング: 最も広く使われているのはウシ血清アルブミン (BSA) である。草野⁴³⁾ はゼラチンの使用を推奨しており、ほかに脱脂ミルクや胎児ウシ血清も比較的良好に使われているが、最近、Mohammad と Esen⁶⁹⁾ は、希釈や洗浄に Tween 20-PBS を用いればブロッキングを行う必要がないと主張している。

3) 酵素標識二次抗体: それぞれのクラス of ヒト免疫グロブリンに対する抗体を酵素で標識したものが市販されていて、容易に入手できる。標識に用いられる酵素としてはアルカリ・フォスファターゼ (AP) またはペルオキシダーゼ (PO) が一般的に用いられている。どちらを選ぶかはほとんど好みの問題であるが、価格的には PO のほうがかなり安価である。ベータ・ガラクトシダーゼ標識二次抗体と蛍光基質を用いれば、酵素反応の感度 (検査の感度ではない) を数倍以上にあげることができるが、結核症での ELISA ではあまり使われていない。酵素反応の基質としては、AP には専ら p-nitrophenyl phosphate が、PO には o-phenylenediamine または 2, 2'-azino-di-(3-ethyl)-benzoline-6-sulfonic acid と過酸化水素との組み合わせがよく用いられている。IgG 測定のためには、酵素標識抗ヒト IgG 抗体のかわりに酵素標識タンパク A を用いてもよい^{38) 62)}。

4) 抗原・テスト試料・二次抗体などの量的関係: ELISA は固相に固着させた抗原が抗原-抗体反応やその他の操作によって固相から遊離しないということを大前提にして成立している。この前提の上で、抗原および二次抗体は、テスト試料中に存在すると考えられる抗体と比較して過剰でなければならない。酵素の基質もまた、基質阻害の起こらぬ範囲で過剰でなければならない。テ

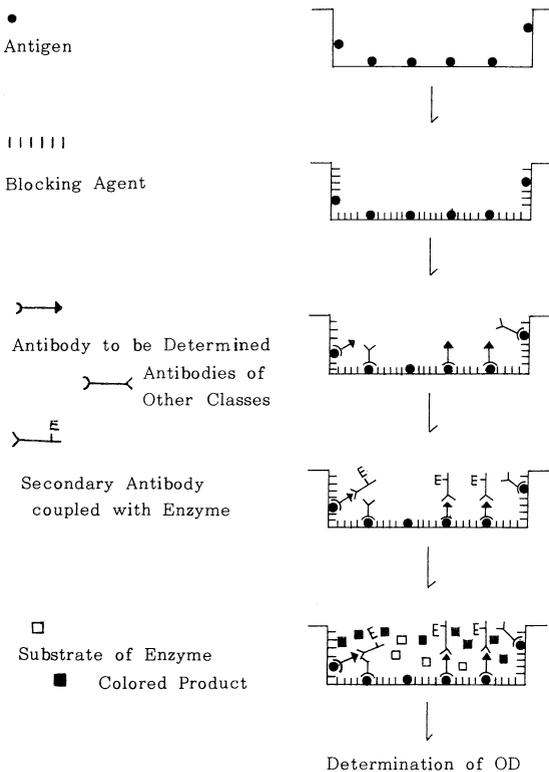


Fig. 1. Determination of Antibody by ELISA

スト試料の希釈の問題については、次の項で述べる。

3. 測定値から抗体価を求める方式

ELISA による測定の結果は、直接的には吸光度 (OD) として得られる。直接の測定値である OD, より正確には実験系列の OD からブランク系列の OD を差引いた値 (ΔOD) から試料中の抗体価を算定するのであるが、それにはいくつかの方式がある⁷⁰⁾、すなわち、(a) 特定希釈度の試料の ΔOD 値をそのまま抗体価として扱う。(b) 特定希釈度のテスト試料の ΔOD と同じ希釈度の標準試料の ΔOD との比を用いる。(c) 抗体価の高い標準試料の希釈系列を常に準備しておき、これで ΔOD —抗体価標準線を作り、特定希釈度のテスト試料の ΔOD をこの標準線にあてはめてテスト試料の抗体価を求める。(d) テスト試料の希釈系列を作り、予め定めておいた ΔOD 値に達した最小希釈度の逆数をテスト試料の抗体価とする。(e) テスト試料の希釈系列を用いてテスト試料の ΔOD — \log (希釈度) 曲線を作り、その直線勾配部分の理論式 $Y = b - a \cdot \log(X)$, ($Y = \Delta OD$, $X =$ 希釈度の逆数) を求め、この式から $Y = 0$ のときの X の値をテスト試料の抗体価とする。

ELISA では、同一試料で同一の操作で測定を繰返したときの測定値 (OD) のバラツキは通常の酵素反応の場合よりもかなり大きく、10%程度の変動は避けがたい。マイクロタイター・プレートでは反応条件の精密な制御が困難なこと、抗原や二次抗体のロットの違いや保

存条件による力価の変動などがその理由の一部と考えられる。さらに、血清を試料にして ΔOD —希釈度曲線を作ってみると、Fig. 2 に示すように、どの試料も逆 S 字型の曲線を描くが、その形や両軸に対する位置関係、例えば、直線勾配部分の傾斜・最初の水平部分に直線部分に移行する部位・直線部分が終わりの水平部分に移行する部位などは試料ごとに大きく違っている。

Fig. 3 は、多数の血清について同一血清の2つの違った希釈度での ΔOD をプロットしたものであるが、理論分布線から高い希釈度側への偏りが認められ、この偏りは抗体価の高い試料ほど著しい。どの希釈度の組み合わせでも同様の傾向がみられる。これらのことは、特定の一点希釈度の試料の ΔOD によってその試料の抗体価を代表させる方式 (a) は理論的に正当でないことを示している。もちろん、この方法は非常に簡便で、1つの検査室単位で陽性・陰性の判定をするには十分有用であって、後に簡便法として改めてふれる。

方式 (b) と (c) では、標準試料との比較によって測定変動の問題はある程度補正できるが、標準試料とテスト試料とで ΔOD —希釈度曲線の形や相対位置が違っていることから由来する問題点の解決にはならない。さらに、抗体価の高い標準試料を力価の変化が起こらない条件で常に準備しておかねばならないという困難さもある。

方式 (d) には、さらに2つのタイプがあり、方式 (d-1) は、抗体価の高い標準試料の特定希釈での ΔOD と同じ ΔOD を示すテスト試料の最大希釈度の逆数をそのテスト試料の抗体価とするものであり、方式 (d-2) は予め比較的低いレベルで設定したカット・オフ値に達した最大希釈度の逆数をテスト試料の抗体価とするものである。方式 (d-1) については、方式 (c) と同様の問題点があり、また、この方式で得られた値は、選ばれた標準試料に左右される相対的なもので、テスト試料に固有の値ではない。方式 (d-2) は基本的な考え方は方式 (e) と同じであるが、反応の終点 (カット・オフ値に達した試料の希釈度) が明確でなく、主観的になる恐れがある。 ΔOD —希釈度曲線の高い希釈度部分で直線部分から水平部分へなだらかに移行するような試料の場合には特にこのような困難が起こる。また、カット・オフ値をどこにおくかの理論的根拠が明確でない。

われわれは、方式 (e) が理論的には最も優れた方式であると考え。この方式の原理はどこまで試料を希釈したときに反応ゼロ (=抗体ゼロ) になるかという希釈度を求めるものであって、血清学的検査で伝統的に常用されてきた力価の求め方と同じ考えに基づくものである。さらに、この方式によれば、われわれがすでに PPD と結核患者の血清について報告したように⁴⁵⁾、抗体の量、二次抗体の量、基質の量、反応時間などを変えた場合の影響を全く受けず、テストにかかわる変数に影響されな

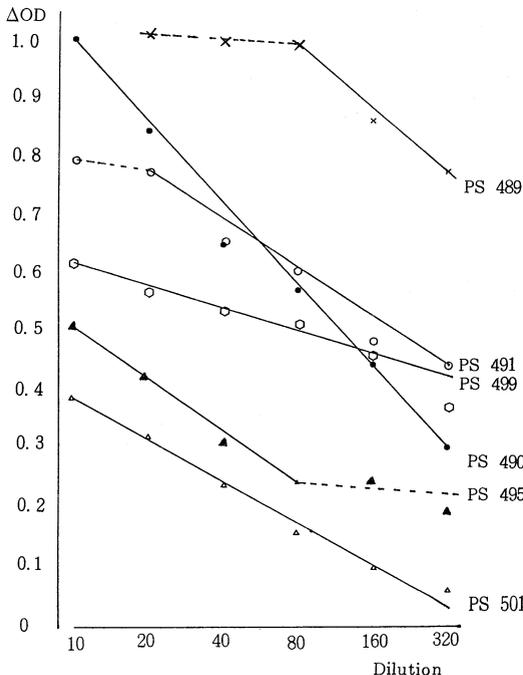


Fig. 2. Various Patterns of OD-Dilution Curve

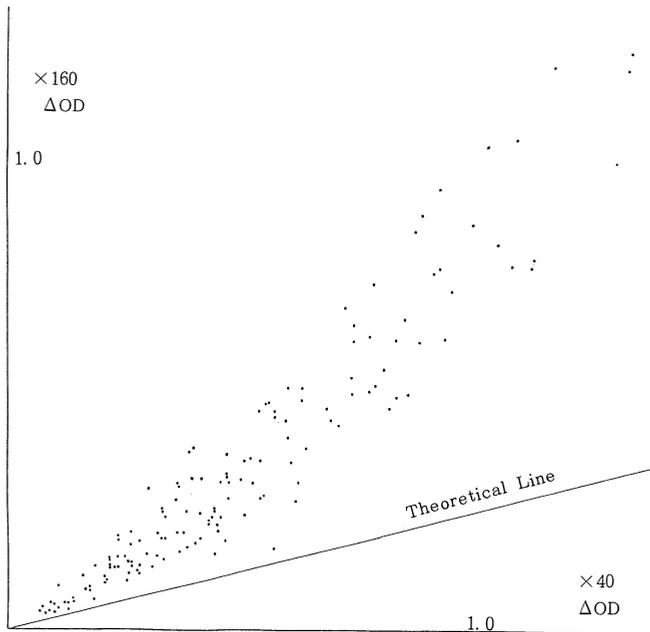


Fig. 3. Relation of ΔODs Obtained at Different Dilutions

い試料の固有の値として求めることができる。したがって、この方式で求めた値はある程度違ったテスト条件で行った別の検査室間のデータの比較にも、経過を追っての経時的なデータの比較にも、さらにはいろいろな抗原の適否の検討などにも応用することができる。また、標準血清を常時準備しておく必要もない。統計処理にも耐える値である。一方、この方式の欠点は操作性と経済性の点で、試料の希釈系列をつくらねばならないことと、それぞれの希釈についてブランクを置くためにマイクロタイター・プレートやそれぞれの試薬の消費量が大きくなることである。

われわれは6段階2倍希釈系列を作り、したがって1試料あたり12ウェルを使っている。われわれは上述した理論式を求め、直線関係からずれた測定値を除去して理論式を補正し、式から $Y = 0$ のときの X を計算するのに、コンピュータを利用しているが、これらの操作は片対数グラフ用紙に $\Delta OD - \log(\text{希釈度})$ 曲線を描き、その直線部分を外挿して X 軸と交わる点を求めることで、手的にも容易に実施できる。

試料ごとの $\Delta OD - \text{希釈度}$ 曲線が、両軸に対する相対位置のみでなく形まで違っているのは、抗原として単一分子でない標品を用いたためではなく、分子として均一な精製抗原を用いたとしてもその分子上に複数のエピトープが存在し、また、単一エピトープに対しても同一クラスではあるが avidity や affinity の異なる複数種類の抗体が形成されるため、単一エピトープの抗原を用いたとしてもこのような現象は避けられないであろう。

4. 抗体価測定診断的有用性

上述のようにして ELISA の測定値から抗体価を求めたとして、抗体価の測定が結核症の診断に臨床的に有用であるかどうかの判断をするためには、まず結核症患者群の抗体価と適切に選ばれた対照群の抗体価とのあいだに有意の差がみられるかどうかを検討し、次いで、患者群と対照群との抗体価の分布を比較し両群の間に適切な境界線が引けるかどうか、このような境界値を設定した場合の患者群での陽性率(感度)と対照群での陰性率(特異性)を計算することが必要である。いままでに発表された報告においても当然このような考察が行われているが、ここにもいくつかの問題点を指摘することができる。

少数の例外²³⁾⁴⁰⁾⁴³⁾⁴⁵⁾を除いて、患者群と対照群との間の有意差検定にあたってそれぞれの群の抗体価の算術平均とそれにもとづく標準偏差(SD)が用いられているが、Fig. 4 に示すように、ELISA で得られた対照群の ΔOD 値は正規分布ではなく対数正規分布を示す。方式(e)で求めた抗体価も同様に対数正規分布を示す。したがって、 ΔOD 値にしる抗体価にしるそのままの値ではなく、いったん対数変換をしてから平均値やSDを計算すべきである。これによって、患者群と対照群との間の境界値を対照群の平均値+SDまたは+2SDなどとする場合の値はかなり大きく変わってくる。当然、感度や特異性の数字も変わってくる。

さらに、対照群としてどのような集団を選ぶかの問題

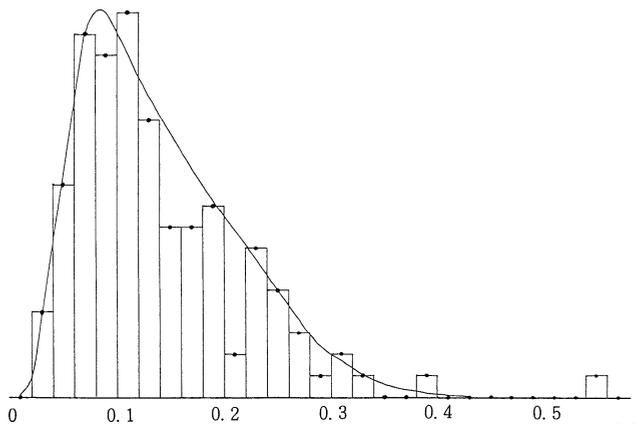


Fig. 4. Distribution of ΔOD in Control Group

がある。理論的には、ミコプラズマの抗原とまったく接触のなかったヒト、すなわちいままでもヒト型結核菌およびその他の抗酸菌の感染をうけたことがなくBCGの接種も受けたことのないヒト、ということになるであろうが、今の日本ではこのような対象は初回BCG接種前の乳幼児に限られ、入手しにくさは別としても、年齢差などの問題が新たに生じてくる。臍帯血では、われわれの経験では(山本節子:未発表データ)、母親からの移行と考えられるIgG抗体がかなりの例で検出された。肺結核症の診断を目標にしたほとんどの報告で健康成人集団を対照群として選んでいるのは妥当であると考えられるが、その場合、結核の蔓延度、いわゆる非定型抗酸菌感染の頻度、BCG普及率などの違いによって、健康成人集団といっても国・地域・調査時点などによって質的に違いがあることを考慮するべきである。対照群の性格は、当然、検査の感度や特異性の値に影響するので、検査の有用性をこれらの数字の比較によって論ずるにあたっては慎重さが要求されよう。

今の日本の臨床の場では胸部X線写真が一次スクリーニングとしての役割をになっていて、これで疑いが持たれた対象についてかくたん検査、血清学的検査などの確定診断的検査が行われるのが一般的であり、胸部X線検査で疑いが持たれたが結核症ではなかったような症例を対照群にとるのが臨床的には実際的といえるだろう。このような対象を対照群に選べば検査の感度や特異性の値が違ってくるのは当然である。逆に、結核患者群としては結核菌陽性を基準にせざるをえないが、通常の検査で菌がつかまらない結核症例は多数あり、これらが菌陰性の理由で対照群にはいりこめば特異性を低める原因になる。

5. ELISAによる抗体測定の有効性

上述したいろいろな問題点はあるにしても、今までに

発表された多くの報告から、ELISAによる抗結核菌抗体測定の結核症診断における有用性について一定の結論をだすことができる。

大多数の報告は血清を試料にしタンパク抗原を用いての肺結核症についてのものであるが、ほぼすべての報告がIgG抗体で患者群と対照群とのあいだに明らかな有意差を認めている。IgM抗体では両群の間に差がない。糖タンパクを抗原にしたときは、逆に、IgM抗体で差を認め、IgGで差を認めないとの報告もある⁴⁶⁾。抗タンパク-IgG抗体については、表に示したように、報告によってかなりの幅はあるにしてもいずれも高い感度と特異性を認めている。肺外結核については、腸結核症、骨関節結核症、リンパ節結核症などについて、血清を試料とした抗タンパク-IgG抗体によって優れた結果が報告されている^{4) 14) 34) 37) 38) 40) 47)}。

血清以外の試料では、結核性髄膜炎の診断のためにcerebrospinal fluid (CSF)を用いて抗タンパク-IgG抗体測定で良い結果が報告されている^{17) 24) 57)}。結核性胸膜炎の胸膜浸出液では、われわれの経験では(未発表データ) IgG, IgMともがん性浸出液との間に有意の差が認められなかった。

Hernándezら²⁴⁾は、CSF中の抗体は血清から移行したのではなく局所で産生されるのであろうと考えている。

結核症における抗体測定の臨床的有用性を考える場合、他の診断法との優劣が問題となる。いうまでもなく、結核症の確定診断には臨床材料からの結核菌の検出が最も確定的な証拠になるが、塗抹標本の染色鏡検法の感度は非常に低く、たかだか30%程度とされており、また、結核菌以外の抗酸菌との鑑別は不可能である。培養による菌の検出は、特異性の点では申し分ないにしても、何週かの時間を必要として早期診断の役にはたさず、また、臨床所見、胸部X線所見、抗結核薬剤の効果などから

結核症としか考えられない症例で臨床材料から結核菌が検出できない例はしばしばみられ、感度の点では十分とはいえない。胸部 X 線写真を始めとする画像診断は、感度の点では良いとしても、それ自体には特異性は全くなく読影者の熟練に頼ってのみある程度の特異性が保証されている。ツベルクリン皮膚反応は、結核菌やその他のミコバクテリアの感染頻度が低く BCG 接種が一般に行われていない地域では診断的意義があるが、わが国の現状では陽性結果には余り大きい意味を持たすことができず、陰性結果に一定の意味があるにすぎない。

このように、現行の結核症の診断法はいずれも不満足な点が多いだけに、表に示した ELISA による抗体測定感度と特異性の数字は、上述したようにそのまま受け取るには問題があるにしても、現行の診断法のいずれよりも優れていることはあっても劣ることはない。画像診断や塗抹鏡検菌検査のように、医師や検査技師の高度の経験に頼るところが大きく、ある程度の主観的判断が避けがたい診断法と比べて、それほど高度の訓練を必要とせず客観的な一定の結果がえられることも ELISA による抗体測定の特長である。特に、粟粒結核や結核性髄膜炎では画像診断があまり頼りにならず、剖検と対比したときの臨床診断の正診率は 21% 程度にすぎない (1984 年度) との報告⁷¹⁾⁷²⁾ もあり、これらの診断には緊急性が要求されることをも考えあわせると、抗体測定を結核診断のために必ず実施すべきルーチンの手順のなかに組み込むべきではないかと考える。

6. 臨床的簡便法

ELISA の直接の測定値である OD から試料の抗体価を求める方式としては、われわれは上述した方式 (e) が最も優れており、多少とも理論的、研究的な関心が持たれる場合にはこの方式が採用されるべきであると考えられるが、この方式の欠点は、試料の希釈に手間がかかり、1 検体あたりの試料やマイクロタイター・プレートの消費量が多くなるということにある。この点を配慮し、また、ELISA 用の光度計やコンピュータがなくても実施できる方法として、次のような簡便法が考えられる。一点希釈の試料 (血清ならば 100 倍) で、抗原なしのブランクも置かず、Tween 20 を含有する希釈液・洗浄液を用いることによってブロッキング操作も省略し、陽性・陰性の判定は予め設定しておいた OD を示す標準色度液と比較して肉眼的に行う。標準色度液は、AP を用いたときは p-nitrophenol のアルカリ性溶液で容易に作ることができる。標準色度液は、その施設の予備実験でえられた対照群の平均 OD と SD から、例えば平均 OD + 2SD にあたる OD のものを調製すればよく、標準色度液を 2 ないし 3 段階おけば強陽性・陽性・疑陽性などいくつかの段階の区別も可能となる。

ELISA リーダでえられる OD の値は、少数点以下 3 桁で得られて非常に精密な値と錯覚しがちであるが、それ自体は本来半定量的なもの扱ったほうがよい性質のものであり、簡便性や経済性を犠牲にしても厳密な操作を行って定量的な値に変換するか (方式 e)、簡便性・経済性を最優先にしてこのような簡便法を採用するか、の両極端がかえって妥当な取扱いと思われる。なお、フィールド試験への応用として、新鮮全血³¹⁾ やろ紙にしみこませた血液⁷³⁾ を利用した試みもあり、別の角度からの簡便法として今後の検討に値するであろう。

7. まとめと展望

ELISA による抗体測定の方法はすでに確立されたものであって、これを結核症の早期診断に応用するにあっても技術的な困難はない。ただ、今までに発表された報告にはデータの処理と解釈にいくつかの問題点があり、これらの点について批判的に総括した。

ELISA による抗体測定は結核症の早期診断に非常に有用であり、菌検査、画像診断、ツベルクリン検査などと比較して優るとも劣らぬ診断的価値を持つと結論できよう。

今後に残された最も大きい課題は、使用する抗原の問題である。ミコバクテリア感染を全般的に検出するためならば、入手しやすい PPD で十分役にたつが、結核菌感染と BCG 接種との区別、*Mycobacterium tuberculosis* とその他のミコバクテリアとの感染の鑑別などのためには菌種特異的な抗原の調製が先決問題となる。この問題は最近のバイオテクノロジーの進歩によって間もなく解決され、ELISA の応用範囲もますます広くなると期待できるだろう。ELISA による抗体測定が結核症の早期診断のための臨床検査として広く一般化されることが望まれる。

文 献

- 1) Grange, J. M. : The humoral immune response in tuberculosis : Its nature, biological role and diagnostic usefulness, *Adv Tuberc Res*, 21 : 1-78, 1984.
- 2) Lind, A. and Ridell, M. : Immunologically based diagnostic tests. Humoral antibody methods, *The Mycobacteria. A Sourcebook, Part A* (Ed. Kubica, G. P. and Wayne, L. G.), 221-248, 1984, Marcel Dekker, Inc. (New York, Basel).
- 3) Leelarasamee, A. and Bovornkitti, S. : Immunodiagnosis of tuberculosis : A review, *Asian Pacific J Allergy Immunol*, 7 : 57-61, 1989.

- 4) Nassau, E., Parson, E. R. and Johnson, G. D. : The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Tubercle*, 57 : 67-70, 1976.
- 5) Reggiardo, Z., Vazquez, E. and Schnaper, L. : ELISA tests for antibodies against mycobacterial glycolipids, *J Immunol Methods*, 34 : 55-60, 1980.
- 6) Tandon, A., Saxena, R. P., Saxena, K. C. et al. : Diagnostic potentialities of enzyme-linked immunosorbent assay in tuberculosis using purified tuberculin antigen, *Tubercle*, 61 : 87-89, 1980.
- 7) Grange, J. M., Gibson, J. and Nassau, E. : 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 : 145-152, 1980.
- 8) Grange, J. M., Gibson, J. and Batty, A. : The specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in tuberculosis, *Tubercle*, 61 : 153-156, 1980.
- 9) Daniel, T. M., Oxtoby, M. J., Pinto, E. M. et al. : The immune spectrum in patients with pulmonary tuberculosis, *Am Rev Respir Dis*, 123 : 556-559, 1981.
- 10) Reggiardo, Z. and Vazquez, E. : Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination test using mycobacterial glycolipids, *J Clin Microbiol*, 13 : 1007-1009, 1981.
- 11) Benjamin, R. G. and Daniel, T. M. : Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5, *Am Rev Respir Dis*, 126 : 1013-1016, 1982.
- 12) Viljanen, M. K., Eskola, J. and Tala, E. : 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 J Respir Dis*, 63 : 257-262, 1982.
- 13) Zeiss, C. R., Radin, R. C., Williams, J. E. et al. : Detection of immunoglobulin G antibody to purified protein derivative in patients with tuberculosis by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay, *J Clin Microbiol*, 15 : 93-96, 1982.
- 14) Stroebel, A. B., Daniel, T. M., Lau J. H. K. et al. : Serologic diagnosis of bone and joint tuberculosis by an enzyme-linked immunosorbent assay, *J Infect Dis*, 146 : 280-283, 1982.
- 15) Kardjito, T., Handoyo, I. and Grange, J. M. : Diagnosis 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 : 269-274, 1982.
- 16) Benjamin, R. G., Debanne, S. M., Ma, Y. et al. : Evaluation of mycobacterial antigens for use in enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis, *Am Rev Respir Dis*, 127 : A197, 1983.
- 17) Kalish, S. B., Radin, R. C., Levitz, D. 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 : 630-633, 1983.
- 18) Gupta, A. K., Jamil, Z., Srivastava, V. K. et al. : Antibodies to purified tuberculin (PPD) in pulmonary tuberculosis and their correlation with PPD skin sensitivity, *Indian J Med Res*, 78 : 484-488, 1983.
- 19) Narayanan, P. R., Acharyulu, G. S., Krishnamurthy, P. V. et al. : Evaluation of ELISA as a diagnostic test in pulmonary tuberculosis, *Indian J Tuberc*, 30 : 29-32, 1983.
- 20) Radin, R. C., Zeiss, C. R. and Phair, J. P. : Antibodies to purified protein derivative in different immunoglobulin classes in the diagnosis to tuberculosis in man, *Intern Arch Allergy Appl Immunol*, 70 : 25-29, 1983.
- 21) Kalish, S. B., Radin, R. C., Phair, J. P. et al. : Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans, *J Infect Dis*, 147 : 523-530, 1983.
- 22) Zeiss, C. R., Kalish, S. B., Erlich, K. S. et

- al. : IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis, *Am Rev Respir Dis*, 130 : 845-848, 1984.
- 23) Balestrino, E. A., Daniel, T. M., De Latini, M. D. S. et al. : Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and tuberculin purified protein derivative, *Bull WHO*, 62 : 755-761, 1984.
- 24) Hernández, R., Muñoz, O. and Guiscafere, H. : Sensitive enzyme immunoassay for early diagnosis of tuberculous meningitis, *J Clin Microbiol*, 20 : 533-535, 1984.
- 25) Benjamin, R. G., Debanne, S. M. and Daniel, T. M. : Evaluation of mycobacterial antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis, *J Med Microbiol*, 18 : 309-318, 1984.
- 26) 越野 健, 西岡真二, 藤村政樹他 : ELISAによる肺結核患者血清中の抗 PPD-IgG 抗体の検出, *結核*, 59 : 621-624, 1984.
- 27) 小西一樹, 国部久義, 村上静一他 : 肺結核症における抗 PPD 抗体の測定とその意義, *呼吸*, 3 : 700-705, 1984.
- 28) Daniel, T. M., Debanne, S. M. and van der Kuyp, F. : Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis, *Chest*, 88 : 388-392, 1985.
- 29) Kiran, U., Shriniwas, Kumar, R. et al. : Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis, *Eur J Respir Dis*, 66 : 187-195, 1985.
- 30) Daniel, T. M., Benjamin, R. G., Debanne, S. M. et al. : ELISA of IgG antibody to *M. tuberculosis* antigen 5 for serodiagnosis of tuberculosis, *Indian J Pediat*, 52 : 349-355, 1985.
- 31) Daniel, T. M., De Murillo, G. L., Sawyer, J. A. et al. : Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis, *Am Rev Respir Dis*, 134 : 662-665, 1986.
- 32) Ma, Y., Wang, Y.-M. and Daniel, T. M. : Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China, *Am Rev Respir Dis*, 134 : 1273-1275, 1986.
- 33) Affronti, L. F., Taylor, R. and Hassan, E. M. : Comparison between tuberculoproteins A and C in the serodiagnosis of tuberculosis by enzyme-linked immunosorbent assay, *Intern Arch Allergy Appl Immunol*, 80 : 81-84, 1986.
- 34) Krambovitis, E., Harris, M. and Hughes, D. T. D. : Improved serodiagnosis of tuberculosis using two assay tests, *J Clin Pathol*, 39 : 779-785, 1986.
- 35) Thongkrajai, P. and Chamnanvanakit, C. : An assessment of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of pulmonary tuberculosis, *J Med Ass Thailand*, 69 : 324-329, 1986.
- 36) Krambovitis, E. : Detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane antigen by enzyme-linked immunosorbent assay, *J Med Microbiol*, 21 : 257-264, 1986.
- 37) Chawla, T. C., Sharma, A., Kiran, U. et al. : Serodiagnosis of intestinal tuberculosis by enzyme immunoassay and soluble antigen fluorescent antibody tests using a saline extracted antigen, *Tubercle*, 67 : 55-60, 1986.
- 38) Gandhi, B. M., Bhargava, D. K., Irshad, M. et al. : Enzyme-linked protein-A : An ELISA for detection of IgG antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* in intestinal tuberculosis, *Tubercle*, 67 : 219-224, 1986.
- 39) Kato, K., Yamamoto, K., Shibata, M. et al. : IgG antibody level to mycobacterial glycoprotein in pulmonary tuberculosis by ELISA, *Eur J Respir Dis*, 71 : 37-41, 1987.
- 40) Mohan, C., Kumar, A. and Agarwal, S. C. : Serodiagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunosorbent assay of IgG antibodies using BCG "pressate" antigen, *Indian J Med Res*, 85 : 367-373, 1987.
- 41) Narayanan, S., Paramasivan, C. N., Ravooof, A. et al. : Sensitisation pattern of healthy volunteers and tuberculosis patients to various mycobacterial antigens by ELISA,

- Indian J Tuberc, 34 : 132-135, 1987.
- 42) Thole, J. R., Keulen, W. J., Kolk, A. H. et al. : Characterization, sequence determination, and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli* K-12, Infect Immun, 55 : 1466-1475, 1987.
- 43) 草野展周 : ELISA法を用いた活動性肺結核患者の血清中の PPD とアルファ抗原に対する IgG 抗体測定のための有用性の検討, 結核, 62 : 211-227, 1987.
- 44) 長江晴男, 三浦俊弘, 劉朝漢他 : 結核患者の血清学的診断における ELISA 法の検討, 結核, 62 : 503-510, 1987.
- 45) 山本節子, 田端一彦, 戸井田一郎他 : 結核症および非定型抗酸菌症患者の特異的抗体価の測定, 結核, 62 : 549-557, 1987.
- 46) Wadee, A. A., Cohen, J. and Rabson, A. R. : An enzyme-linked immunosorbent assay using adsorbed mycobacterial sonicates for the serodiagnosis of tuberculosis, South African Med J, 71 : 154-156, 1987.
- 47) Chau, P. Y., Wan, K. C., Ng, W. S. et al. : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibodies to purified protein derivative (PPD) in the diagnosis of active tuberculosis : Evaluation of its potential and limitation in a high prevalence area, Trop Geogr Med, 39 : 228-232, 1987.
- 48) Torgal-Garcia, J., David, H. I. and Papa, F. : Preliminary evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* phenolglycolipid antigen in the serologic diagnosis of tuberculosis, Ann Inst Pasteur/Microbiol, 139 : 289-294, 1988.
- 49) Levy, H., Wadee, A. A., Feldman, C. et al. : Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* in bronchial washings and serum, Chest, 93 : 762-766, 1988.
- 50) Raja, A., Baughman, R. P. and Daniel, T. M. : The detection by immunoassay of antibody to mycobacterial antigens and mycobacterial antigens in bronchoalveolar lavage fluid from patients with tuberculosis and control subjects, Chest, 94 : 133-137, 1988.
- 51) Levy, H., Feldman, C., Wadee, A. A. et al. : Differentiation of sarcoidosis from tuberculosis using an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Mycobacterium tuberculosis*, Chest, 94 : 1254-1255, 1988.
- 52) Raheman, S. F., Vasudeva, N. D., Ingole, D. L. et al. : ELISA : A potential screening procedure in epidemiological survey of tuberculosis, Indian J Tuberc, 35 : 8-11, 1988.
- 53) Agarwal, A. and Moudgil, K. D. : Enzyme immunoassay based study of IgG and IgM antibody response to antigens of *M. tuberculosis* (H37Rv) in patients with pulmonary tuberculosis, Indian J Tuberc, 35 : 12-16, 1988.
- 54) Raheman, S. F., Vasudev, N. D., Ingole, D. L. et al. : A study of humoral immune response in tuberculosis, Indian J Tuberc, 35 : 171-175, 1988.
- 55) Turneer, M., van Vooren, J.-P., de Bruyn, J. et al. : Humoral immune response in human tuberculosis : Immunoglobulins G, A, and M directed against the purified P32 protein antigen of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin, J Clin Microbiol, 26 : 1714-1719, 1988.
- 56) van Vooren, J. P., Turneer, M., Yernault, J. C. et al. : A multidot immunobinding assay for the serodiagnosis of tuberculosis : Comparison with an enzyme-linked immunosorbent assay, J Immunol Methods, 113 : 45-49, 1988.
- 57) Watt, G., Zaraspe, G., Bautista, S. et al. : Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay to detect mycobacterial antigen and antibody in cerebrospinal fluid, J Infect Dis, 158 : 681-686, 1988.
- 58) Huygen, K., van Vooren, J.-P., Turneer, M. et al. : Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis, Scand J Immunol, 27 : 187-194, 1988.
- 59) Mauch, H., Fischer, W., Grange, J. M. et al. : The serodiagnosis of tuberculosis : A comparison of an enzyme-linked immuno-

- sorbent assay and a solid-phase radioimmunoassay, *Zbl Bakt Hyg A*, 267 : 357-362, 1988.
- 60) Alde, S. L. M., Piñasco, H. M., Pelosi, F. R. et al. : Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 in the diagnosis of active tuberculosis in children, *Am Rev Respir Dis*, 139 : 748-751, 1989.
- 61) Makonkawkeyoon, S., Makonkawkeyoon, L., Songsiri et al. : Evidence for a highly conserved, immunoreactive lipid in *Mycobacterium tuberculosis*, *Am Rev Respir Dis*, 139 : 774-778, 1989.
- 62) Espitia, C., Cerveral, I., González, R. et al. : A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation, *Clin Exp Immunol*, 77 : 373-377, 1989.
- 63) Thongkrajal, P., Lulitanon, V. and Chamanvanakit, C. : Improved ELISA with immunoabsorbent-purified mycobacterial antigen for serodiagnosis of tuberculosis, *J Med Microbiol*, 30 : 101-104, 1989.
- 64) Daniel, T. M. and Debanne, S. M. : The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay, *Am Rev Respir Dis*, 135 : 1137-1151, 1987.
- 65) Engvall, E. and Perlmann, P. : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochem*, 8 : 871-874, 1971.
- 66) 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔 (編) : 酵素免疫測定法 (第2版), 医学書院, 東京, 1982.
- 67) Tijssen, P. : Practice and theory of enzyme immunoassay, 1985, Elsevier Sci Pub (Amsterdam) : 石川栄治 (監訳) : エンザイムイムノアッセイ, 東京化学同人, 東京, 1989.
- 68) Voller, A., Bidwell, D. E. and Bartlett, A. : Enzyme immunoassay in diagnostic medicine, Theory and practice, *Bull WHO*, 53 : 55-65, 1976.
- 69) Mohammad, K. and Esen, A. : A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blots and Western blots, *J Immunol Methods*, 117 : 141-145, 1989.
- 70) Malvano, R., Boniolo, A., Dosis, M. et al. : ELISA for antibody measurement : Aspects related to data expression, *J Immunol Methods*, 48 : 51-60, 1982.
- 71) 岩井和郎 : 肺結核の臨床と病理—今日の問題点, *日本胸部疾患学会雑誌*, 19 : 699~706, 1981.
- 72) 和田雅子 : 肺結核症の疫学的変貌と本院入院患者の25年間の臨床的変貌, *結核*, 64 : 801~806, 1989.
- 73) 高 東 哲, 馬 淑 萍, 張 鵬 翀他 : 接種 BCG 前後血内抗 BCG-IgG 水平的変化, *中華結核和呼吸雜誌*, 10 : 168~170, 1987.