

原 著

抗結核菌糖脂質抗原（抗 TBGL 抗原）抗体による結核の血清診断

— 抗 TBGL 抗体測定キットの臨床的検討 —

豊田 丈夫・大角 光彦
青柳 昭雄・川城 丈夫

国立療養所東埼玉病院内科

受付 平成 8 年 6 月 26 日

受理 平成 8 年 8 月 16 日

SERODIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS BY DETECTION OF ANTITUBERCULOUS
GLYCOLIPID ANTIGEN (TBGL ANTIGEN) ANTIBODIES IN SERUM USING
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY : CLINICAL EVALUATION
OF ANTI-TBGL ANTIBODIES ASSAY KITTakeo TOYODA*, Mitsuhiko OSUMI, Teruo AOYAGI,
Takeo KAWASHIRO

(Received 26 June 1996/Accepted 16 August 1996)

Kyowa Medex Co.,Ltd. developed the kit for the sero-diagnosis of tuberculosis, which detects IgG antibodies against tuberculous glycolipids antigen containing cord factor (TBGL antigen) prepared from *M. tuberculosis* using the enzyme-linked immunosorbent assay technique. We evaluated the kit using clinical specimens and the results are as follows :

- 1) In total, 34 out of 39 cases (87.2%) with active pulmonary tuberculosis showed positive anti-TBGL antibody.
- 2) Patients with cavity, patients with extensive lesions and patients excreting large amount of acid fast bacilli tended to show high positivity rates.
- 3) The antibody titers increased in 7 out of 11 cases after starting the antituberculous chemotherapy.
- 4) The use of the antibody is unsuitable for the determination of the activity of tuberculosis since the antibody titers only slightly decreased even after chemotherapy for two years.
- 5) Two out of four nontuberculous mycobacteriosis cases showed high antibody titers.
- 6) All three AIDS patients with tuberculosis showed low antibody titers.
- 7) The antibody was negative in almost all healthy controls showing a positive PPD skin test after vaccination with BCG, and it was therefore assumed that the antibody titer is not increased by BCG vaccination.

* From the National Higashisaitama Hospital, 4147, Kurohama, Hasuda-shi, Saitama 349-01 Japan.

8) The antibody titers of the staff members working in the tuberculosis wards were not high compared with those of staff members working in the other wards.

Key words : Serodiagnosis, Tuberculosis, Cord factor, Enzyme-linked immunosorbent assay, BCG, AIDS

キーワード : 血清診断, 結核, コードファクター, 酵素免疫測定法, BCG, AIDS

はじめに

Huaら¹⁾は、結核菌およびその類縁菌の細胞壁に特異的に含まれる cord factor に対する抗体測定が、結核の血清診断に有用であることを報告した。この研究をもとに協和メデックス(株)は、cord factor を含む糖脂質抗原を精製し、それを TBGL 抗原と名付け、結核の血清診断キット (デタミナー TBGL 抗体) を開発した。今回われわれはそのキットを用いて、結核患者および健康人の抗 TBGL 抗体を測定する機会を得たため、臨床的検討を加え報告する。

対 象

(1) 患 者

当院を受診した患者のうち、活動性肺結核39症例 (平均年齢54.3歳, 男女比29:10), 結核性胸膜炎5症例 (平均年齢61.6歳, 男女比4:1), 頸部リンパ節結核2症例 (29歳女性, 48歳男性), 粟粒結核2症例 (34歳男性, 46歳男性), 骨・関節結核3症例 (平均年齢48.3歳, 全例男性), 結核を合併した AIDS 3症例 (平均年齢43.7歳, 全例男性) の結核治療開始時血清および陳旧性肺結核4症例 (平均年齢62.8歳, 全例男性) の右心不全あるいは気道感染にて入院した際の血清, *M. avium* complex 症4症例 (平均年齢78.3歳, 男女比1:3) の治療開始時血清, 計62症例, 62検体を対象とした。

また、このうち肺結核症例については経時的变化を観察するため、治療開始後も可能な限り毎月1回採血を行い、4カ月以上経過を追うことができた11症例の治療開始後の血清56検体も対象とした。

(2) 看護学生

当院附属看護学校学生のうち、まだ結核病棟での実習経験のない50名 (平均年齢18.9歳, 男女比2:48) の定期健康診断時採取した血清50検体を対象とした。

(3) 病院職員

当院で結核病棟に勤務したことがない職員40名 (平均年齢38.5歳, 男女比9:31) および結核病棟に半年以上勤務している職員46名 (平均年齢49.1歳, 全員女性) の定期健康診断時採取した血清86検体を対象とした。

方 法

1. 標準血清

抗 TBGL 抗体高値陽性結核患者血清をプールし、これを標準血清64U/mlとした。

2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 試験

10 μ g/mlの抗原液を調整し、25 μ l/ウェルでマイクロタイタープレートにコートした。この感作プレートに41倍希釈した被検血清を100 μ l/ウェルに加え、室温で60分反応させた。反応後プレートを洗浄液で5回洗浄し、酵素標識化抗ヒト IgG ウサギ Fab' を加え、室温で60分反応させた。洗浄液で3回洗浄し、発色液を加え、室温で15分反応させた後、1M 硫酸で反応を停止させ、プレートリーダーで450 nm の吸光度を測定した。

3. 抗体価の設定

標準血清の単位と吸光度より検量曲線を作製し、この検量曲線と各被検血清の吸光度から各検体の抗体価を求めた。

4. カットオフ値

岸本ら²⁾が健康者、肺結核患者を対象とし、本キットを用いて抗 TBGL 抗体価を測定した結果、菌感染をスクリーニングするカットオフ値2.0U/mlを提唱しており、本研究でもこの値を採用した。

結 果

1. 初回・再治療別抗 TBGL 抗体価

肺結核症例のうち、初回治療例が28例 (平均年齢50.6歳), 再治療例が11例 (平均年齢69.8歳)であった。抗 TBGL 抗体価の平均値は、初回治療例が10.1U/ml, 再治療例が13.4U/mlであり有意差はなかった (図1)。抗 TBGL 抗体陽性の症例は、初回治療例が28例中24例 (85.7%), 再治療例が11例中10例 (90.9%)であり、陽性率に有意差はなかった (表)。

2. X線所見分類別抗 TBGL 抗体価

抗 TBGL 抗体価は、空洞の有無、病変の広がり別では有意差はなかった (図2)。抗 TBGL 抗体陽性の症例

抗TBGL
抗体価
(U/ml)

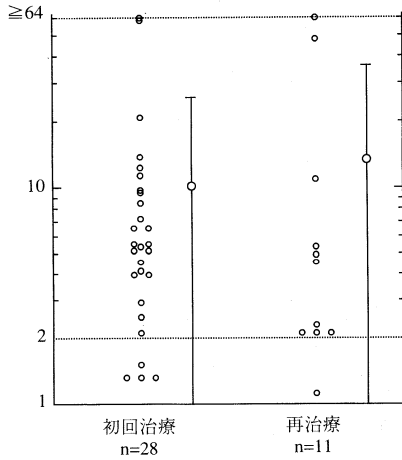


図1 初回・再治療別抗TBGL抗体価

表 抗TBGL抗体陽性率

初回	24/28	(85.7%)
再治療	10/11	(90.9%)
空洞なし	14/18	(77.8%)
空洞あり	20/21	(95.2%)
広がり1	4/7	(57.1%)
広がり2	26/28	(92.9%)
広がり3	4/4	(100%)
排菌なし	6/9	(66.7%)
少量排菌	8/9	(88.9%)
中等量排菌	7/8	(87.5%)
大量排菌	13/13	(100%)
計	34/39	(87.2%)

p<0.05

p<0.05

は、空洞のない患者では18例中14例(77.8%)、空洞のある症例では21例中20例(95.2%)であり、陽性率に有意差はなかった。病変の広がり別にみた場合、抗TBGL抗体陽性の症例は、学会分類で広がり1の症例

抗TBGL
抗体価
(U/ml)

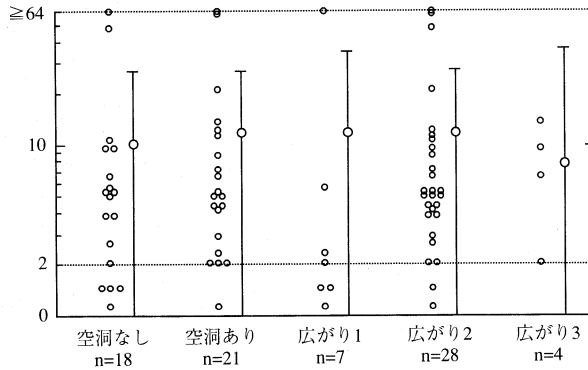


図2 X線所見分類別抗TBGL抗体価

抗TBGL
抗体価
(U/ml)

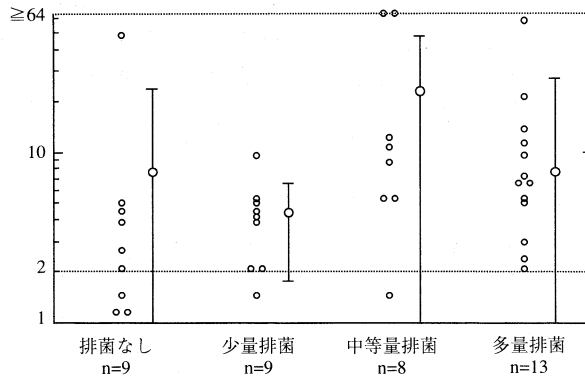


図3 排菌状況別抗TBGL抗体価

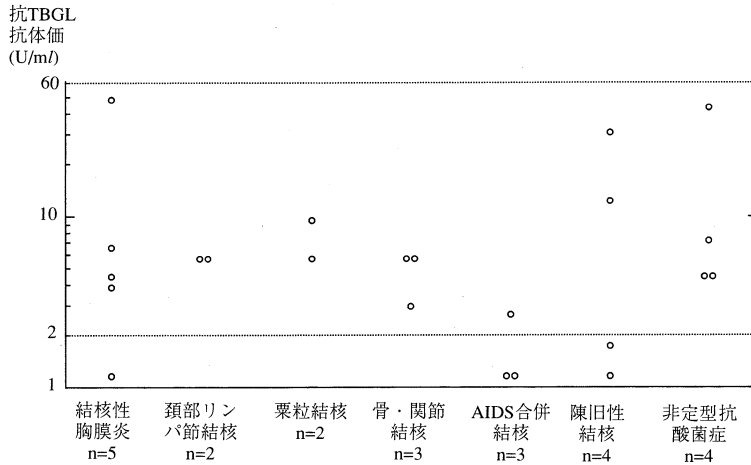


図4 疾患別抗 TBGL 抗体価

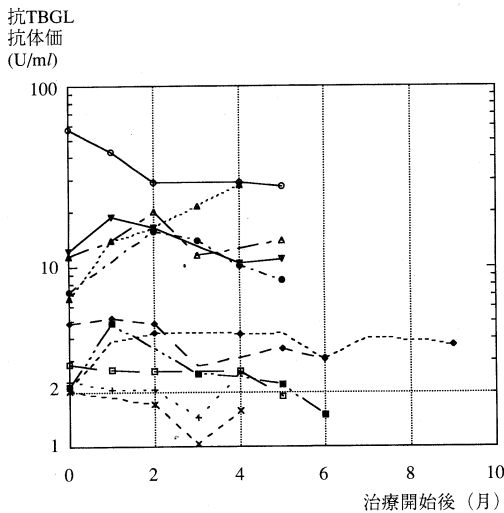


図5 治療開始後抗 TBGL 抗体価の経過

は7例中4例(57.1%), 広がり2の症例は28例中26例(92.9%), 広がり3の症例は4例中4例(100%)であり, 広がり2の症例は広がり1の症例より有意に陽性率が高かった ($p < 0.05$) が, 他の群間では有意差はなかった(表)。

3. 排菌状況別抗 TBGL 抗体価

臨床的に肺結核と診断された患者を, ①排菌なし: 塗抹陰性かつ培養陰性の患者, ②少量排菌: 培養のみ陽性あるいはガフキー1~2号の患者, ③中等量排菌: ガフキー3~7号の患者, ④大量排菌: ガフキー8~10号の患者, の4群に分けて比較した。抗 TBGL 抗体価は4群で有意差はなかった(図3)。抗 TBGL 抗体陽性症例

は, 排菌なし患者が9例中6例(66.7%), 少量排菌患者が9例中8例(88.9%), 中等量排菌患者では8例中7例(87.5%), 多量排菌患者が13例中13例(100%)であり, 大量排菌症例は排菌なし症例より有意に陽性率が高かった ($p < 0.05$) が, 他の群間では有意差はなかった(表)。

4. 疾患別抗 TBGL 抗体価

頸部リンパ節結核, 結核性胸膜炎, 粟粒結核, 骨・関節結核, 陳旧性肺結核, 非定型抗酸菌症のいずれの症例もほとんどが抗 TBGL 抗体価は2.0U/ml以上を示した(図4)。なお, 陳旧性肺結核4症例は, いずれも結核治療終了後7~11年経過しており, 今回受診時も明らかに結核の活動性はないと診断された症例であるが, 4例中2例が抗 TBGL 抗体陽性であった。

非定型抗酸菌症例は, 4症例すべてが抗 TBGL 抗体陽性であったが, 抗 TBGL 抗体価が7.2U/ml, 42.5U/mlと高値を示した2症例は結核の既往がなく, 4.4U/ml, 4.5U/mlと比較的低値を示した2症例は結核の既往がある症例であった。AIDS合併症例はいずれも結核発病後半年以上経過した重症な結核であったが, 3例中1例が2.8U/mlで残り2例は1.0U/ml未満の低値を示した。

5. 結核治療開始後の抗 TBGL 抗体価の経過

結核治療開始後4カ月以上抗 TBGL の経過が追えた症例が11症例あった(図5)。そのうち4例は治療開始時以後は抗 TBGL 抗体価は低下し, 残り7例は治療開始後さらに上昇した。上記11症例のうち2年以上経過を追えた症例は7例であったが, いずれも治療開始時と2年後では大きな変化はなく, カットオフ値の2.0U/ml

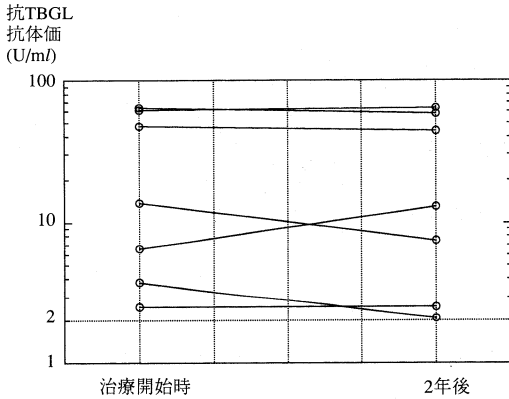


図6 結核治療開始2年間後の抗TBGL抗体価

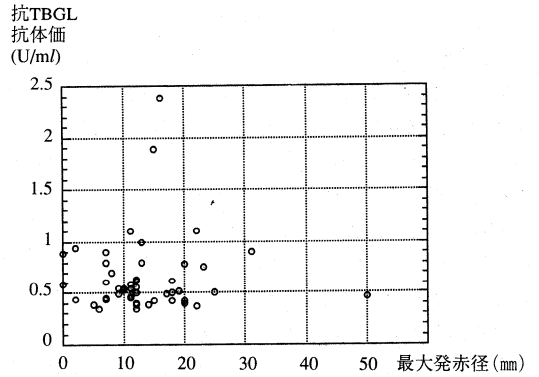


図7 看護学生ツ反最大発赤径と抗TBGL抗体価

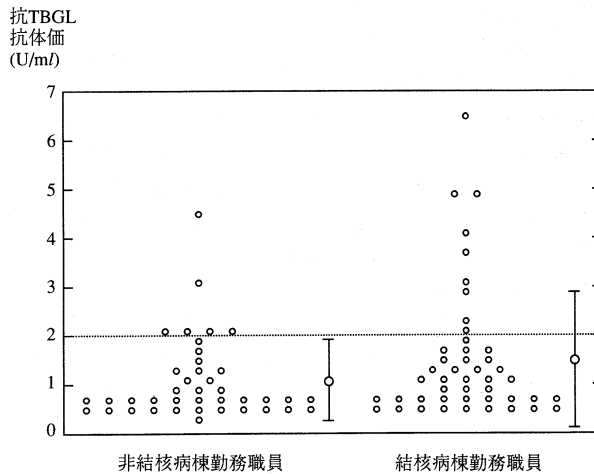


図8 非結核病棟・結核病棟別職員抗TBGL抗体価

以下にまで低下した症例はなかった(図6)。

6. ツ反と抗TBGL抗体価

当院看護学生50名のうち、ツ反陽性者は35名(70%)、抗TBGL抗体価が2.0以上の者は1名(0.2%)のみであった。ツ反の最大発赤径との間には相関関係は見られなかった(図7)。

7. 非結核病棟勤務職員と結核病棟勤務職員の抗TBGL抗体価

非結核病棟・結核病棟別職員の抗TBGL抗体価の比較では、2群に有意差はなく、結核菌に接する機会が多いと考えられる結核病棟勤務職員に抗TBGL抗体価が特に高いとは言い得なかった(図8)。

考案

結核の確定診断は、細菌学的に結核菌を証明することによりなされるが、結核菌の培養に長時間を要すること、臨床的に結核と考えられる症例でも結核菌が培養できないことも少なくないため、いくつかの補助診断法が考えられている。結核の補助診断法の一つに培養以外の手法を用いて結核菌の存在を証明する方法があり、最近では核酸増幅法が脚光を浴びている。核酸増幅法は菌の核酸を含む検体を採取する必要があり、症例、病型によっては、検体が得られないなどの問題がある。別の補助診断法として、免疫学的に結核菌の感染の有無を調べる方法がある。

この方法には、まずツ反があげられるが、ツ反の最大の利点は、簡便、安価であることである。欠点として、

ツ反は注射48時間後に判定のため被検者に再度来院してもらう必要があることや接種あるいは判定の仕方に個人差が大きいことなどがあげられる。さらに、ツ反はBCG接種者も陽性になるため、自然陽転者と区別できないという問題がある。一方、血清診断法は容易に検体が得られ、検査も1回の採血ですみ、客観的な評価が可能といった大きな利点があり、精度が良好であれば結核の補助診断としての価値は高いと考えられる。

結核の血清診断は古くから行われており^{3)~4)}、特にELISA法が開発された後多数の報告がある^{5)~8)}が、特異性が低かったり、抗原の精製法が難しいなどの理由で商品化、キット化されたものはなかった。Huaらの研究をもとに協和メデックスはcord factorを含む糖脂質抗原の精製法にカラムクロマトグラフィー法を導入して抗原供給や品質管理の問題を解決し、また、測定操作を簡便化して結核の血清診断キットを開発した⁹⁾。

本キットによる今回の成績では、抗TBGL抗体は結核患者で高い陽性率を示し、結核菌感染の判定に有用であると考えられた。ただし、2年の観察では抗体価は大きな低下はみられず、また、治療後7年以上経過した陈旧性結核症例でも4例中2例が10U/ml以上の高値を示したため、結核の活動性の判断には適さない場合があると考えられた。このように臨床的に結核の活動性がないと考えられる陈旧性結核症例で抗TBGL抗体価が高値を示す症例については、結核菌の完全除菌が困難なため、不顕性感染化した菌の存在を示している可能性が考えられ、抗TBGL抗体価と結核の再発率や残存病巣の性状、大きさとの関連についての研究がなされれば興味深い結果が得られるかもしれない。

今回検討した*M. avium* complex症は4症例と少数であったが、結核の既往がない2症例で抗体価が7U/ml以上の高値を示しており、抗TBGL抗体により結核と非定型抗酸菌症の鑑別をすることは困難であると考えられた。

HIV感染者の血清診断については、Barreraら¹⁰⁾は、HIV感染者の結核合併例で血清抗PPD-IgG抗体の測定をした結果、血清抗PPD-IgG抗体は増加せず、血清診断は有用性がないと報告している。今回検討したAIDS症例も3例とも重症結核で、結核発病後6カ月以上経過しているにもかかわらず抗TBGL抗体価は、1例が2.8U/ml、2例が2U/ml以下とすべて低値であり、HIV感染者では結核菌に対する液性免疫の異常が起こっている可能性が考えられた。

今回研究対象とした看護学生のツ反は、50名中35名(70.0%)が陽性であったが、現在20歳代のツ反自然陽転率は2~3%といわれており、今回のツ反陽性者の大部分がBCGによる陽転と考えられる。一方、抗

TBGL抗体価は50名中1名のみが2.38U/mlとカットオフ値以上の値を示したが、他はすべてが1.0未満の低値を示した。以上より抗TBGL抗体価はBCGによる免疫では上昇しない可能性が高いと考えられる。したがってBCG既接種者でも、抗TBGL抗体が陽性であれば、結核の感染が起こった可能性が高いと推定してよいと考えられる。なお、抗TBGL抗体価が2.38U/mlであった1名の看護学生の結核感染の既往については確認できなかった。

結核病棟勤務職員は日常的に結核菌に暴露され、軽度の感染が成立している可能性が高いと考えられるが、非結核病棟勤務職員と比較して抗TBGL抗体価の有意差はみられなかった。これより、自然の感染が成立しても感染の度合いが一定レベル以上でなければ抗TBGL抗体価は上昇しないことが推測された。

結 論

抗TBGL抗体価を結核患者、健常人で測定し、以下の知見を得た。

- 1) 臨床的に活動性肺結核と診断された患者のうち87.2%が抗TBGL抗体陽性であった。
- 2) 空洞のある症例、病変の広がり大きな症例、排菌の多い症例で抗TBGL抗体陽性率が高い傾向があった。
- 3) 結核治療開始後もおよそ2/3の症例で、さらに抗TBGL抗体価の上昇が見られた。
- 4) 治療開始後2年では抗TBGL抗体価がカットオフ値以下に低下した症例はなく、結核の病勢判定には適しないと考えられた。
- 5) 抗TBGL抗体による結核症と非定型抗酸菌症との鑑別は困難であると考えられた。
- 6) AIDSの結核合併例では、抗TBGL抗体価は低値であった。
- 7) BCG免疫や軽度の感染では抗体価は上昇しないと考えられた。
- 8) 結核病棟に勤務する職員と非結核病棟に勤務する職員では抗TBGL抗体価に有意差はなかった。

文 献

- 1) Hua H, Oka S, Han Y, et al.: Rapid serodiagnosis of human mycobacteriosis by ELISA using cord factor (trehalose-6, 6'-dimycolate) purified from *Mycobacterium tuberculosis* as antigen. F. E. M. M. 1991; 76: 201-204.
- 2) 岸本寿男 (感染症学会雑誌に投稿中)
- 3) Middlebrook G and Dubos RJ: Specific

- serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J Exp Med.* 1948; 88: 521-528.
- 4) Takahashi Y: Specific serum agglutination of kaolin particles sensitized with tubercle phosphatide and its clinical evaluation as serodiagnostic test for tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1962; 85: 708-719.
 - 5) Benjamin RG and Daniel TM: Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis.* 1982; 126: 1013.
 - 6) Pan X, Yang P, Weng X: Determination of anti-PPD antibody by ELISA. *Chin J Tuberc Respir Dis.* 1983; 6: 68-70.
 - 7) Zeiss CR, Kalish SB, Erlich KS: IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 130: 845-848.
 - 8) Daniel TM and DeBanne SM: The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 135: 1137-1151.
 - 9) Kawamura M, Sueshige N, Imayoshi K, et al.: Enzyme immunoassay to detect anti-tuberculous glycolipid antigen (anti-TBGL antigen) antibodies in serum for diagnosis of tuberculosis. [*J Clin Lab Anal* に投稿中 (掲載許可済)]
 - 10) Barrera L, de Kantor I, Reniero A, et al.: Humoral response to *Mycobacterium tuberculosis* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Tubercle Lung Dis.* 1992; 73: 187-191.