

原 著

抗酸菌抗体検出法の臨床有用性に関する共同研究

マイコドット法テスト共同研究会

代表世話人：螺 良 英 郎

結核予防会大阪府支部大阪病院

山 中 正 彰	同
坂 谷 光 則	国立療養所近畿中央病院
高 嶋 哲 也	大阪府立羽曳野病院
前 倉 亮 治	国立療養所刀根山病院
中 谷 光 一	国立療養所南京都病院

A COOPERATIVE CLINICAL STUDY ON THE EVALUATION OF AN ANTIBODY DETECTION TEST KIT (MycoDot™ Test) FOR MYCOBACTERIAL INFECTIONS

Cooperative Study Group for MycoDot™ Test

Chirman: Eiro TSUBURA*

Masaaki YAMANAKA, Mitsunori SAKATANI, Tetsuya TAKASHIMA,
Ryoji MAEKURA, Koichi NAKATANI

To determine the usefulness of a diagnostic kit for mycobacterial infection, we performed a five-hospital cooperative clinical study using serodiagnosis kits (MycoDot™ Test) to detect antibody for lipoarabinomannan (LAM) which is a membrane-derived component of mycobacterial species. We tested LAM antibody in the sera of patients with mycobacterial infection as well as healthy persons. Procedures for using the serodiagnosis kit are actually simple.

Out of 130 cases of active pulmonary tuberculosis, 103 cases (79%) were positive for anti-LAM, and cases out of 24 cases of active atypical mycobacterial infection, 15 (63%) were positive. On the contrary, only 4% of healthy volunteers (1 out of 25 persons) were positive on this test.

別刷り請求先:

螺良 英郎

結核予防会大阪府支部大阪病院

〒572 大阪府寝屋川市寝屋2276-1

* From the Osaka Hospital, Anti-tuberculosis Association Osaka Branch, 2276-1, Neya, Neyagawa, Osaka 572 Japan.

(Received 14 Jul. 1997/Accepted 18 Aug. 1997)

In conclusion, this diagnostic kit might be a useful test for early and supportive diagnosis of mycobacterial infections based on its sensitivity and specificity.

Key words : Pulmonary tuberculosis, Atypical mycobacteria, Mycobacterium antibody, Lipoarabinomannan

キーワードズ : 肺結核症, 非定型抗酸菌, 抗酸菌抗体, リポアラビノマンナン

はじめに

結核症と非定型抗酸菌症を含む抗酸菌症を他の肺疾患、例えば肺癌や非結核性肺疾患と早期に鑑別するための診断法の必要性については、これからの感染症の動向から考えて十分指摘されるべきところである。抗酸菌症の診断の要諦は、臨床診断に基づいて検査材料からの原因となる抗酸菌を塗抹と培養によつて的確に検出することはいうまでもない。しかし実地診療に当たつて抗酸菌症を推定しうる検査法としての免疫血清学的診断法は、これまでほとんど実用化していない、ツベルクリン皮内反応が唯一の診断根拠となつていた。

簡易に行える抗酸菌症の免疫血清学的補助診断によるデータが1つでも多いことは抗酸菌症の診断を進める上で望ましいことである。

マイコドットテストとは、抗酸菌由来の Lipoarabinomannan (LAM) を抗原としてプラスチックコームに吸着させてあり、コームを希釈した血清と反応させると、検体の血清中に特異抗 LAM 抗体が存在すれば抗原と結合する。そして抗 LAM 抗体結合物と結合する着色粒子の浮遊液を加えることによつてカラースポットが形成され、肉眼的に判定しうる。このようにマイコドットテストは簡便で、約20分間という短時間で血清中の抗酸菌に対する抗体を検出することが出来る利点を有している。

本法が果たして抗酸菌症の早期簡易診断上有用であるかどうかを検討する目的で共同研究を行った。今回の検討では、抗酸菌症を専門とする5施設において、臨床的に、1) 活動性と考えられる肺結核症および2) 非定型抗酸菌症群、3) 結核症ないし非定型抗酸菌症の既往が明らかで、数年にわたつて検痰上、排菌を認めず、胸部レ線所見上安定している非活動性陳旧性抗酸菌症群、4) 抗酸菌症以外の呼吸器疾患群、5) 抗酸菌症と呼吸器疾患を一応除外したその他の疾患群および6) 健常者の6群を対象として行い、本法による成績を感受性 (sensitivity) と特異度 (specificity) の立場から分析した。この際、血清希釈は原法では20倍希釈となつているが、5倍希釈まで濃度を高めることによつて有用性がどのよ

うになるかも検討した。

検査対象は、国立療養所近畿中央病院、大阪府立羽曳野病院、国立療養所刀根山病院、国立療養所南京都病院、結核予防会大阪府支部大阪病院の5施設における合計387検体である。

症例の群別は調査表に従つて病歴の調査を行い、I : 活動性結核症、II : 活動性非定型抗酸菌症、III : いわゆる陳旧性と思われる肺抗酸菌症、IV : 抗酸菌症以外の呼吸器疾患群、V : 呼吸器疾患以外の疾患群、VI : 健常者の6群に分けた。なおこの際の活動性とは塗抹、培養検査のいずれか一方、または両者が陽性であり、胸部レ線、活動性と考えられる病巣が認められるものを指している。

検体の適格性に関しては、調査表より疾患名、病型分類、抗酸菌の塗抹、培養の結果、抗結核薬の投与期間の記載、その他を厳密にチェックして54症例は除外することとした。除外例の詳細は表1のごとくである。

除外した残り333例を6群に分け、さらに活動性肺結核症は以下の5群に分けて検討した。

I : 活動性結核症 ; 130例	
初回治療例	93例治療 3カ月以内 ; 64例 治療 3カ月以上 ; 29例
再治療例	25例治療 3カ月以内 ; 16例 治療 3カ月以上 ; 9例
持続排菌例	12例

表1 除外した54症例の内訳

塗抹、培養検査ともに陰性	19例
疾患名記載なし	13
病型分類記載なし	10
調査票未提出	5
塗抹、培養検査結果記載なし	3
抗結核薬投与期間記載なし	1
同一患者	1
不明	2
合計	54例

表2 血清希釈度による陽性率の比較

対 象	(例数)	希 釈 倍 数			
		×5		×20	
		陽性/陰性	陽性率	陽性/陰性	陽性率
活動性肺結核症	(130)	103/27	79	72/58	55
活動性肺非定型抗酸菌症	(24)	15/9	63	9/15	38
健常者	(25)	1/24	4	1/24	4

表3 6群における血中抗酸菌抗体陽性率
(マイコドットテスト陽性率)

対 象	(例数)	陽性/陰性	陽 性 率
活動性結核症	(130)	103/27	79
活動性非定型抗酸菌症	(24)	15/9	63
陳旧性抗酸菌症	(15)	6/9	40
他の呼吸器疾患*	(79)	10/69	13
その他の疾患*	(60)	9/51	15
健常者	(25)	1/24	4

*抗酸菌症を一応除外

持続排菌例とは、検痰上、常に塗抹または培養検査のいずれか一方、またはその両者が抗結核療法を行ったにもかかわらず数年にわたって陽性のものを指す。

II：活動性非定型抗酸菌症；24例

III：陳旧性抗酸菌症；15例

IV：抗酸菌症を除外する呼吸器疾患；79例

V：以上を除く有症患者；60例

VI：健常者；25例

測定方法

血液を採取、血清を分離、凍結保存して大阪病院検査部とサカイ生化学研究所の2施設で同一検体について、それぞれ測定を行った。測定キットは、試験紙法であるが希釈検体に固相化抗原(LAM)であるコームを入れ6分間反応させ抗原抗体複合体を形成させ、次いでこれに呈色剤としての金コロイドを加え10分間反応させる。コームを洗浄し、発色した色の濃淡を目視にて陽性(+), 陰性(-)とに判定する。同時にキットに添付している陽性、陰性コントロール血清についても検定して確認した。通常測定開始より終了まで約20分である。血清の希釈濃度は任意に変更可能である。今回は5倍希釈と20倍希釈の2つについて測定した。

結 果

1) 血清希釈度による感度と特異度

血清を20倍希釈(×20と略す)する場合と5倍希釈

(×5)とで感度と特異度がどうなるか、各群について比較した。各群のうち最も本検査法にとって問題となる活動性の肺抗酸菌症2群と健常者群での成績をまとめたのが表2である。この際、本検査法の判定上目視で不明瞭な陽性例は、すべて陰性と判断するのが適切とした。そうした判定でもってみると、活動性肺結核症130例では×20で55%であるのに対し×5で79%、活動性非定型抗酸菌症24例では×20で38%に対し、×5では63%であった。一方、健常者群25例では×20と×5は、ともに4%であった。これらの結果から、本検査法はスクリーニングとして活用する立場から感度を重要視して×5の方がよいと判断した。したがって、以下の分類した各群での成績はすべて×5のものとした。

2) 各群での成績

有効検討症例数333例の各群別での結果成績は表3と図に示す。活動性肺結核症での陽性率(マイコドットテスト陽性率)は、初回治療例で74%、再治療例で88%、持続排菌例では100%陽性であり、肺結核全体としては79%であった。

各群をさらに分類したところ、活動性結核症例においては初回治療例で治療開始3カ月以内の64例では、陽性率が69%であり、治療開始3カ月以上の29例では86%のものが陽性であった。さらに、再治療例で治療開始3カ月以内と3カ月以上とで比較すると、いずれの群においても、88%、89%と陽性率が高く、さらにいわゆる持続性排菌例では、100%であった(表4)。

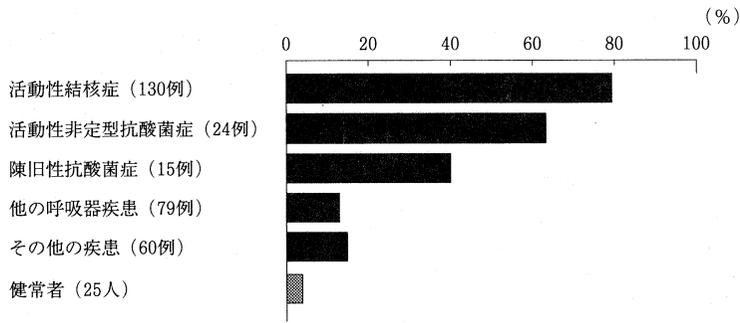


図 6 群における血中抗酸菌抗体陽性率
(マイコドットテスト陽性率)

表 4 活動性結核症の治療期間と血中抗酸菌抗体陽性率 (マイコドットテスト陽性率)

対象	治療期間	(例数)	陽性/陰性	陽性率
初回治療例	3カ月以内	(64)	44/20	69
	3カ月以上	(29)	25/4	86
再治療例	3カ月以内	(16)	14/2	88
	3カ月以上	(9)	8/1	89
持続治療例	—	(12)	12/12	100

表 5 抗酸菌症以外での呼吸器疾患別血中抗酸菌抗体陽性率 (マイコドットテスト陽性率)

対象	(例数)	陽性/陰性	陽性率
気管支炎	(9)	1/8	11
肺炎	(7)	0/7	0
気管支喘息	(7)	0/7	0
塵肺	(7)	1/6	14
肺癌	(28)	3/25	11
肺気腫	(10)	2/8	20
肺線維症	(4)	1/3	25
その他	(7)	2/5	29
合計	(79)	10/69	13

表 6 抗酸菌症以外の呼吸器以外の疾患別血中抗酸菌抗体陽性率 (マイコドットテスト陽性率)

対象	(例数)	陽性/陰性	陽性率
心疾患	(14)	2/12	14
高血圧症	(13)	3/10	23
糖尿病	(13)	1/12	8
高脂血症	(5)	0/5	0
その他	(15)	3/12	20
合計	(60)	9/51	15

次に、肺抗酸菌症例を排菌陽性の活動性と排菌陰性でレ線上也いわゆる非活動性陳旧性と判断される群とに分けてみれば、それぞれ77% (118/154例)と40%であった(表3)。抗酸菌症以外の各種呼吸器疾患を有する79例についてみると、陽性率は13%(表5)、また呼吸器疾患以外の各種疾患60例では15%であった(表6)。

さらにレ線所見上肺野に異常なく、また自覚症状のないものを健常者25名として検査した結果は表3のごとく4%にすぎなかった。すなわち活動性の抗酸菌症群と健常者群とは明らかに差がみられた。

考 察

結核症ならび非定型抗酸菌症の診断にあたっては、結核菌および非定型抗酸菌を確実に検体中に検出することにある¹⁾。そのための塗抹法にしても培養法にしても、従来抗酸菌症の診断には一定の時間と経費が必要である。菌検索の方法については近年遺伝子診断法も加わって迅速診断法が検討され普及しつつある^{2)~4)}。しかし、いまだ早期に抗酸菌症のスクリーニングを簡易に迅速に行うのは不十分である。抗酸菌症は、我が国においては減少したとはいえ、臨床診断上いままなお大きい問題となっている。プライマリーケアにおいて抗酸菌症を疑う場合には、現状ではツベルクリン反応が免疫学的補助診断の指標となっている。より簡易に、より迅速に抗酸菌症であるかどうかの推測をたてる免疫血清学的診断法の必要性は、実地臨床医にとっては関心の高いところである⁵⁾。近年エイズの蔓延や結核蔓延地域との国際交流がより密接になるにつれて、結核症診断の迅速化が求められるところである。

マイコドットテストはLipoarabinomannan (LAM)を抗原として、血清中のLAM抗体を検出することによって抗酸菌感染に対する免疫抗体の有無を知る方法であり、少量の血清採取による本測定キットは簡単な試験紙法である⁶⁾⁷⁾。ただ本診断キットは、抗原抗体反応に

よって生じた発色を肉眼判定するために、弱陽性と判定されることもあるが、原法に準じて明らかな呈色を見るものに限って陽性とした。血清の希釈濃度に関しては、原法では20倍希釈を標準としている。今回5倍と20倍希釈の2法で検討を行った結果、5倍希釈が有用であると考へた(表2)。その理由は、本血清診断法はあくまでも抗酸菌症診断初期のスクリーニング法であって、感度を上げて陽性例を選択し、その後の菌検索、レ線検査、血液生化学的検査、菌培養等の精密検査に移行させるのが有用と考へたからである。

5倍希釈血清について検索した結果、いわゆる活動性の肺結核症では79%、非定型抗酸菌症では63%が陽性であり、一応抗酸菌症を否定した健康者での陽性率は4%しかなかった。このことは本診断キットが抗酸菌症早期補助診断のスクリーニング法として臨床応用に有用であるといえる。結核菌感染早期には陽性率は低いが3カ月後には陽性率が増し、また持続治療例では100%陽性となった。このことは抗体形成の上からも当然のことといえる。本テストは他の感染症との鑑別にも有意義であり、臨床上前題の多い肺抗酸菌症と肺癌等との鑑別診断にあたっても有意義であろう。感染後ほぼ3カ月を境に陽性率が上昇することは、LAMに対する抗体が血中で上昇することと一致して注目される成績である。

本研究は、抗酸菌症を主に取り扱う5施設で検討を行ったので、肺野に何らかの呼吸器疾患を持つ者で陽性率が10%前後認められることは、抗酸菌感染の既往が潜在していた可能性もあり、当然のことと考へられる。このことは健康者群においても、より厳密な対象選択を行う必要があるかもしれないが、いずれにしても全群を比較して考へた場合には、本血清診断法は抗酸菌症のスクリーニングとして有用性のあるものといえる⁸⁾。LAM抗原は、結核菌のみならず非定型抗酸菌にも共通しているので非定型抗酸菌症での抗体陽性率も高い。現在临床上非定型抗酸菌症は地域差もあるが抗酸菌症の10%以上に及んでおり、今後も増加が予測されることであり、結核症と非定型抗酸菌症を含めての診断的価値も十分評価されうる。

次に各施設による検査成績の格差が多少見られたが、これは各施設においての疾病群の不均一性によるものかもしれない。

本診断キットの精度管理については各種検査材料について別途に検討をしたが、精度管理上危惧することはなかった。検査の簡便性について本診断法は、測定開始から20分前後で終了し、患者負担も少なく、また検査過程

も簡便である利点が見られた。

これらの点を総合して、マイコドット法は結核症、非定型抗酸菌症の初期補助診断法としては有用な検査法と評価しうる。本診断法は、あくまでも抗酸菌症の早期での補助的診断の域を脱しない。その診断限界を十分にわきまえた上で活用すれば、呼吸器疾患の診断検査法の一つの手だてとして十分な意義を有するといえる。

文 献

- 1) Strumpf IJ, Tsang AY, Sayre JW: Re-evaluation of sputum staining for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Resp Dis.* 1979; 119: 599-602.
- 2) Barnes PF: Rapid diagnostic tests for tuberculosis. *Am J of Resp Crit Care Med.* 1997; 155: 1497-1498.
- 3) 青木正和, 片山 透, 山岸文雄, 他: PCR法を利用した抗酸菌DNA検出キット(アンプリコアTMマイコバクテリウム)による臨床検体からの抗酸菌迅速検出. *結核.* 1994; 69: 593-605.
- 4) 青柳昭雄, 豊田丈夫, 大角光彦, 他: 核酸(rRNA)増幅を応用した結核菌直接検出法(Gen-Probe; MTD)の臨床的検討. *結核.* 1994; 69: 7-14.
- 5) Kwen-Tay L, Chong-Jen Y, Pan-Chyr Y, et al.: Tuberculosis antigen A 60 serodiagnosis in tuberculous infections: Application in extrapulmonary and smear-negative pulmonary tuberculosis. *Respirology.* 1996; 1: 145-151.
- 6) Sada E, Brennan PJ, Herrera T, et al.: Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 2587-2590.
- 7) Brennan PJ: Structure of mycobacteria: Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Inf Dis.* 1989; vol. II, Suppl. 2: 420-430.
- 8) Sada E, Herrera T, Torres M, et al.: Evaluation of lipoarabinomannan (LAM) from *Mycobacterium tuberculosis* for the serological diagnosis of tuberculosis. Abstracts of the Ann. Meeting of the American Society for Microbiology. 1989: 160.