

原 著

結核血清診断キット，デタミナー TBGL 抗体の有用性の検討：
基準値の設定¹岸本 寿男 ²守屋 修 ³中村 淳一 ⁴松島 敏春
⁵副島 林造¹川崎医科大学健康管理学教室，²守屋おさむクリニック，³川崎医科大学附属川崎病院内科，
⁴川崎医科大学呼吸器内科教室，⁵川崎医療福祉大学医療福祉学科

EVALUATION OF THE USEFULNESS OF A SERODIAGNOSIS KIT, THE DETERMINER TBGL ANTIBODY FOR TUBERCULOSIS: SETTING REFERENCE VALUE

^{1*}Toshio KISHIMOTO, ²Osamu MORIYA, ³Jun-ichi NAKAMURA,
⁴Toshiharu MATSUSHIMA, and ⁵Rinzo SOEJIMA¹Department of Health Care Medicine, Kawasaki Medical School, ²Moriya Osamu Clinic,
³Department of Internal Medicine, Kawasaki Hospital, Kawasaki Medical School,
⁴Division of Respiratory Disease, Department of Internal Medicine, Kawasaki Medical School,
⁵Division of Medical Welfare, Kawasaki University of Medical Welfare

The determiner TBGL antibody developed by Kyowa-Medex co., ltd. is a new serodiagnostic kit for tuberculosis. To set cut-off point suitable for the kit, TBGL antibody titer of serum from healthy subjects were analyzed in relation to age, sex, previous and family history on tuberculosis. Based on results of healthy subjects, cut-off point was set by using several analytical methods. We propose 2U/ml as a cut-off point for screening of patients with tuberculosis considering the diagnostic efficiency by receiver operating characteristics (ROC) curve analysis and 4U/ml for diagnosis of tuberculosis, which was determined by parametric method considering its specificity.

Key words: Tuberculosis, Diagnosis, Serodiagnosis, Enzyme immunoassay, Cord factor, TBGL (tuberculous glycolipid antigen)

キーワード：結核，診断，血清診断，酵素免疫測定法，コード・ファクター，TBGL (tuberculous glycolipid antigen)

はじめに

肺結核症の菌検出による診断は，喀痰中の抗酸菌の塗

抹標本による証明か，または分離培養による菌の証明によって行われてきた。しかし，塗抹標本では検出率が低く，分離培養には長時間を必要とするなど欠点も多く，

* [REDACTED]

* [REDACTED]

(Received 23 Mar. 1999/Accepted 3 Jun. 1999)

結核症の迅速診断法の開発が強く求められていた¹⁾²⁾。最近、抗酸菌症の診断法としては、rRNA 増幅法やPCR (polymerase chain reaction) 法などの菌の遺伝子を検出する方法が脚光を浴びているが、これらの方法は測定手技が煩雑で、塗抹法や培養法と同様に菌(の特定遺伝子)を含む検体を採取する必要があり、迅速性はあるものの、症例、病型によっては必要な検体が得られない等の問題があり、その成績は従来の菌検出法を大きく上回るまでには至っていない^{3)~7)}。

近年、酵素により PPD (purified protein derivative of tuberculin) や結核菌体蛋白を抗原として結核患者の血清抗体価を測定し、結核症の迅速診断法に応用することが試みられている⁸⁾。Hua らは結核菌の最も特徴的な細胞膜表層成分である cord factor (trehalose-6, 6'-dimycolate; TDM) を抗原に用いた抗 cord factor 抗体価測定の ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を開発し、この方法が活動性肺結核の迅速診断に有用であることを報告した⁹⁾。これをもとに、協和メデックス(株)において、結核菌体膜成分中糖脂質抗原から結核患者血清中抗体と反応する複数の抗原を同定し、cord factor を中心に trehalose-6-mycolate, 2, 3-diacyl-trehalose, phenolic glycolipid, 2, 3, 6, 6'-tetraacyl-trehalose 2'-sulfate, 2, 3, 6-triacyl-trehalose 等を含む糖脂質抗原 TBGL (tuberculous glycolipid antigen) の精製に成功した。さらに抗原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、スタンダードを設定して抗体価を単位表示するなど実際の臨床現場に応用可能な形に改良してキット化された¹⁰⁾。

測定法を臨床応用する場合、基準値の設定は重要である。基準値の設定にはその基となる母集団の構成が重要であり、基準標本群の選択、群内の年齢や性、抗体検査の場合には既往歴や家族歴などを考慮する必要がある。

今回、開発されたキットを用いてわれわれは健常者を年齢層別、男女別に調査し、年齢や性などの因子が抗体保有率に関与しているかを検討した。また既往歴や家族歴などの疫学データ、患者測定値を考慮し、複数の方法で基準値の設定を試みたので報告する。

対象と方法

1. 検討対象

・年代別健常人群

健常人の年齢別抗 TBGL 抗体価分布を調査した 499 例は、労働安全衛生規則第 44 条に基づいて行われた自治医科大学大宮医療センター関連施設での平成 5 年度の定期健康診断受診者で、かつ胸部 X 線間接撮影を含む

すべての検診項目において異常なしと判定されたものを選択した。検体はこの定期健康診断の際の採血血清を用いた。血清は測定に供するまで -85°C で凍結保存した。以下、後述の血清もすべて保存条件は同一とした。年齢や性の構成は、20代 77 例(男性 37, 女性 40), 30代 100 例(男性 50, 女性 50), 40代 100 例(男性 50, 女性 50), 50代 100 例(男性 50, 女性 50), 60代 100 例(男性 50, 女性 50), 70代 22 例(男性 10, 女性 12)であった。

・若年健常人群

30歳未満を若年と定義した。若年健常人群は、労働安全衛生規則第 44 条に基づいて行われた平成 5 年度定期健康診断の受診者で、胸部 X 線間接撮影を含むすべての検診項目で異常なしと判定されたものから構成した。自治医科大学大宮医療センター関連施設の 20代 77 例(男性 37, 女性 40)と、協和メデックス株式会社の 20代社員 63 例(男性 30, 女性 33)の血清を用いた。

・人間ドック受診者群

一般健康診断受診者の年齢構成に相当し、疫学的にも結核症の疑いのない群として、川崎医科大学人間ドック受診者 300 例の血清を用いた。この健常人群 300 例のうち、結核感染歴および家族の感染歴の有無の確認、専門医による胸部 X 線所見、赤沈などから、最終的に結核感染の疑いのない 210 例を選出した。血清検体は人間ドック受診時に採血されたものを用いた。年齢構成は 30代 18 例, 40代 95 例, 50代 67 例, 60代 29 例, 70代 1 例であった。

・結核患者群

淳風会旭ヶ丘病院において、胸部 X 線所見が異常を示し、かつ塗抹、または培養検査において結核菌が検出された活動性感染性肺結核症患者 74 例を対象にし、被検血清は初診時採血を基本とした。年齢性別は男性 52 例(10代 1 例, 20代 1 例, 30代 6 例, 40代 11 例, 50代 9 例, 60代 8 例, 70代 10 例, 80代 5 例, 90代 1 例), 女性 22 例(10代 1 例, 20代 1 例, 30代 2 例, 40代 2 例, 50代 5 例, 60代 2 例, 70代 4 例, 80代 4 例, 90代 1 例)であった。このうち 36 例は初診時より毎月経時的に 5 カ月間にわたり採血した。年齢性別は男性 24 例(30代 2 例, 40代 5 例, 50代 2 例, 60代 7 例, 70代 6 例, 80代 2 例), 女性 12 例(40代 1 例, 50代 3 例, 60代 1 例, 70代 3 例, 80代 3 例, 90代 1 例)であった。

・Cut-off 値検討のための対象群設定

かつて結核菌との接触の可能性が高かった集団においては、発病しなくとも、高い抗体価を保有する例が多い可能性が考えられる。そこで、対象となる健常者群を、①感染機会の少ないと思われる 20 代若年層に限定した若年健常人群(20 代男女 140 例)と、②感染機会を考慮に入れずに一般健康診断の年齢構成に相当する人間ドッ

ク受診者からさらに結核菌との濃厚接触の可能性を極力除いた人間ドック健常人群 (210例), の2群を設定して検討した。

2. 血清中抗体価の測定方法

先に発表された方法に準じて行った¹⁰⁾。試薬は協和メデックス(株)の“デタミナー TBGL 抗体”を用いた。概略を以下に示す。抗原プレートに検体希釈液 (0.1% ウシ血清アルブミン, 140mM NaCl を含む10mM リン酸緩衝液 (pH7.4)) で41倍希釈した被検血清またはスタンダードを100 μ l/ウェル分注し, 室温で1時間静置反応させた。反応後プレートを洗浄液 (0.05% Tween 20, 140mM NaCl を含む10mM リン酸緩衝液 (pH

7.4)) で5回洗浄し, 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ウサギ抗体溶液を50 μ l/ウェル分注して室温で1時間静置・反応させ, 洗浄液で5回洗浄した。最後に発色液 (0.5mg/ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) を100 μ l/ウェル加えて, 室温で15分反応させた後, 100 μ l/ウェルの反応停止液 (1M 硫酸水溶液) を加えて酵素反応を停止し, プレートリーダー (MTP-120, コロナ電気(株)) で450nmの吸光度を測定した。スタンダードの表示単位を実数でグラフの X 軸に, スタンダード吸光度をグラフの Y 軸に実数でとり, 各点を直線で結んで検量線を作製した。各近接する2点間の関係を表す式 ($Y=aX+b$) を求め, この式の Y に各検体の吸光度を代入し, X 値で与えられる TBGL 抗体価

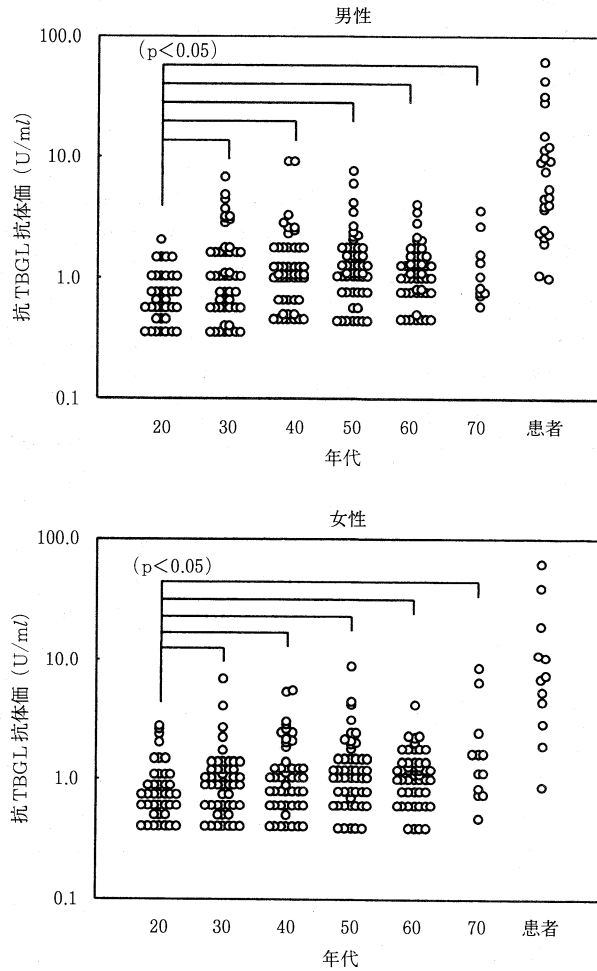


図1 健常人の年代別, 男女別抗体価分布

健常人499例を男女別年代別に分類し, 各男女年代別の抗 TBGL 抗体価分布を表示した。参考に男女別結核患者群の分布を加えた。

を求めた。

3. 統計計算

パラメトリック法による cut-off 値の設定は常法に従った¹¹⁾。すなわち健常人母集団の TBGL 抗体価を常用対数変換し、その分布が正規分布であることを χ^2 検定で確認した。対数変換した抗体価を用いて、その平均値と標準偏差 (SD) から平均+2SD の値を求め、この値を再び実数変換し cut-off とした。

Receiver operating characteristic (ROC) analysis (ROC 分析) は辻の方法で行った¹²⁾。すなわち疾患群と健常人群を設定し、0U/ml から 0.5U/ml 刻みで cut-off 値を設定し、その cut-off 値における感度 (陽性患者数/全患者数) と特異度 (陰性健常人数/全健常人数) を求め、1-特異度を X 軸に、感度を Y 軸にとり、各点を直線で結んで ROC 曲線を作成した。ROC 分析による cut-off 値の設定は、感度と特異度が最大となる ROC 曲線が最もグラフの左上角に近接する点を与える TBGL 抗体価を cut-off 値とした。

2 群の平均の差の検定はスチューデント t 検定で行った。

結 果

1. 健常人群における抗 TBGL 抗体価の分布

・抗 TBGL 抗体保有率の年齢別推移

健常人群 499 例を男女年齢別に分類し、それぞれの群の抗 TBGL 抗体価を調査し、その分布を図 1 に示した。男女別抗 TBGL 抗体価は男女 1.4 ± 1.2 U/ml (平均 \pm SD, n=247)、女性 1.3 ± 1.2 U/ml (平均 \pm SD, n=252) で、男女による有意な差は観察されなかった。同様に 20 代から 70 代の各年代別男女群においても各年代男女間に有意な差は確認されなかった。男女別 20 代～70 代各年代群間での抗体価比較では、男女とも年代が上がるとともに、抗体価が上昇する傾向が観察されたが、有意差が観察されたのは 20 代群とその他の各年代間で、20 代を除く各年代間ではいずれも有意差は観察されなかった。男女をまとめて各年代で分けた群で保有する抗 TBGL 抗体価の平均値とパラメトリック法による cut-off 値 (平均値+2SD) を求め、図 2 に示した。20 代で最も値が低く、その後加齢とともに軽度ながら上昇し、70 代で最高値を示した。

2. cut-off 値設定の検討

まず各健常人群と結核患者群との識別において、感度と特異性の両者を比較しながら cut-off 値を検討するため、各健常人群と結核患者群とで ROC 分析を行った。結核患者群は全 74 例とし、2 例を除き初診時採血血清を

用いた。図 3 に示したように、両者とも左上側に偏位する ROC 曲線が得られた。若年健常人群と結核患者群とで判断した場合、左上にもっとも近接する点は 2U/ml であった。Cut-off 値を 2U/ml として判断すると、有病正診率 83.3%、無病正診率 87.9% となった。人間ドック健常人群と結核患者群とで分析した場合も、若年健常人群で分析を行った時とほぼ同じ曲線が得られた。2 者の ROC 分析結果からは、2U/ml が cut-off 値として適当と判断した。

次に特異性をより重視する目的で、検討する母集団に各健常人群のみを用い、その抗体価分布を調べ (図 4)、正規化してパラメトリック法で平均値+2SD を cut-off 値とした場合、若年健常人群では ROC 分析で求めた値と同じ 2U/ml となった。人間ドック健常人群では cut-off 値 4U/ml であった。Cut-off 値を 4U/ml で判断した場合、無病正診率は 93.8% であった。

3. 患者群の抗体価測定

参考 cut-off 値が得られたので、患者群をこの cut-off 値で分類した。初診時より経時的に抗 TBGL 抗体価を測定できた排菌性結核患者 36 例に対し、塗抹、培養検査を基準に本測定法の有用性を検討した (表)。

Cut-off 値としては、まず若年健常人群および人間ドック患者群と、結核患者群とから感度と特異性を考慮し ROC 分析を用いて求めた値、すなわち 2U/ml を設定した。次に人間ドック受診者の健常人群を用い、特異性に重点をおいてパラメトリック法で求めた値として 4U/ml を設定した。排菌性結核患者を経時的抗 TBGL 抗体価の推移より、以下のように陽性群と陰性群に分類した。

陽性群は A 群：初診時の測定から常に陽性のグループ、B 群：初診から 1～2 カ月以降に陽性に転移したグループ、とした。陰性群は、C 群：初診から 2～3 カ月まで陰性で、それ以降に弱陽性となったグループ、D 群：一度も陽性にならなかったグループ、とした。陰性群の C 群は、抗体産生が臨床経過と比較して遅く、臨床的意義が乏しいと判断した。Cut-off 値を 2U/ml とした場合は、36 例中 30 例が陽性となり検出率は 83.3% であった。Cut-off 値を 4U/ml とした場合は、36 例中 27 例が陽性となり検出率は 75.0% であった。

考 察

結核症のような感染症は、年齢や性別等によって起炎菌との接触の機会や密度に違いが生じている可能性がある。結核菌による感染の機会が多かった結核流行期を経験した世代と、機会の少ない若年層とを一律に扱うことは議論のあるところであろう。

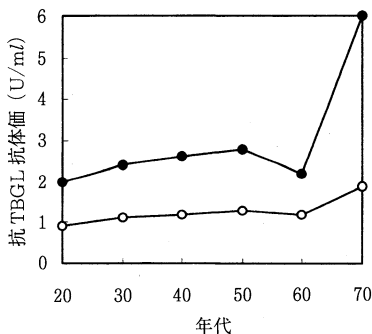


図2 年代別平均抗体価と cut-off 値

健康人 TBGL 抗体価分布を対数化することで正規化し、パラメトリック法により平均値とSD値を求めた。この平均値とSD値から平均値+2SDの値を求め、実数化して cut-off 値とした。

○：平均値，●：cut-off 値 (平均+2SD)

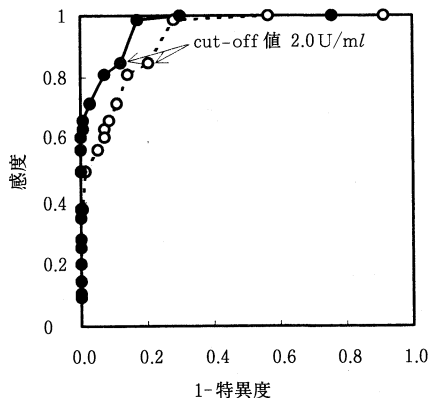


図3 ROC 分析

感度と特異性を同時に分析変数として解析する目的で、健康人群と結核患者群を設定し、0U/mlから0.5U/ml刻みで cut-off 値を変化させ、その cut-off 値における感度（陽性患者数/全患者数）と特異度（陰性健康人数/全健康人数）を求め、1-特異度を X 軸に、感度を Y 軸にとり、各点を直線で結んで ROC 曲線を作成した。

●：若年健康人群と結核患者群で求めた値
○：人間ドック健康人群と結核患者群で求めた値

結核は統計上でも明らかのように、年齢とともに罹患率が上昇していることや、不顕性感染化がみられる疾患であることが示されている¹³⁾。検査値が年齢、性別などの因子によって左右される場合は、それらを加味して考える必要がある。これを確認するために、年齢、性を

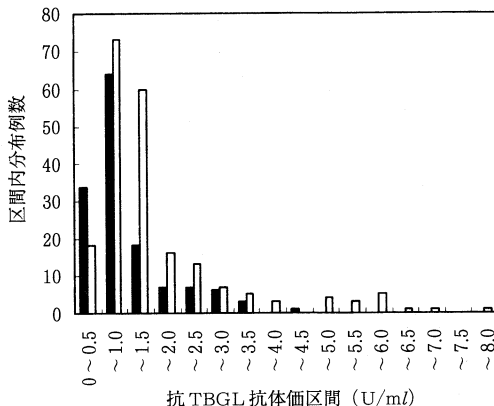


図4 各健康人群の抗体価分布

抗 TBGL 抗体価を 0U/ml から 0.5U/ml 刻みで区間分けし、各区間内に値の存在する健康人群の例数を求め、分布図化した。

■：若年健康人群，□：人間ドック健康人群

表 結核患者群の TBGL 抗体価による分類

cut-off 値	例数			
	陽性群		陰性群	
	A 群	B 群	C 群	D 群
2U/ml	28	2	4	2
4U/ml	24	3	6	3

陽性群 A 群：初診時から常に陽性の群，
B 群：初診から 1～2カ月後に陽性に転移した群
陰性群 C 群：初診から 2～3カ月まで陰性であった群
D 群：一度も陽性とならなかった群

考慮した母集団を設定して、その抗体価を測定した。抗 TBGL 抗体価の分布に性差は確認されなかったが、年齢とともに上昇する傾向が観察された。各年代ごとに、その分布型を考慮して正規化して求めた cut-off 値も年齢とともに上昇していた。

結核症の成立過程から考えると、通常結核菌の感染を受けても95%以上は発病することなく経過するが、不顕性感染として結核菌が体内に残留することがあり、この場合、持続的に抗体価が上昇している可能性が考えられる。したがって、結核発症機序とあわせて考えると、年齢の上昇に伴う抗体価の上昇は十分推察できる。

そこで、基準値の下限値を探る目的で、結核菌感染の可能性が低いと考えられる若年健康人群を対象に抗体価

を詳細に調べたところ、特異性を重視してパラメトリック法で値を決定した場合、cut-off 値 2U/ml が得られた。また健康人群と結核患者群との識別において、感度と特異性の両者を比較しながら cut-off 値を検討するため、ROC分析法を用いた。ROC分析は検査法の精度について、感度と特異性を同時に分析変数として解析する方法で、ROC曲線が左上になるほど、また曲線で囲まれる面積が広いほど疾患群と非疾患群との識別能力に優れた測定法、すなわち診断効率に優れた測定法であると言える。この分析法から、本キットは診断効率に優れた測定法であることが示された。ROC分析から求めた cut-off 値は同じ 2U/ml であった。この結核菌感染の可能性の少ない集団で得られた cut-off 値 2U/ml は、感度と特異性を共に考慮したもので、鋭敏に結核菌感染を検出できる値と考えられる。

一方、年齢構成は考慮せず、人間ドック受診者で疫学的データまで調査して十分に結核症の疑いを排除した集団と結核患者群とを対象とした場合、感度と特異性の両者を考慮して ROC 分析で求めた cut-off 値は、若年健康人群と同じ 2U/ml を示した。しかし、この集団で特異性を重視し、結核患者群の抗体価分布を考慮することなくパラメトリックで求めた cut-off 値は 4U/ml であった。実際に若年健康人群と人間ドック健康人群との差は、特異性を重要視した場合に表れることから、結核菌との接触の可能性の差、不顕性感染の可能性の差が大きく反映しているものと考えられる。患者群にこの cut-off 値を適用した場合、十分な陽性率が得られ、この値の有用性を確認することができた。

そこで今回、われわれは 2U/ml を発症、不顕性にかかわらず結核菌感染をスクリーニングする場合の cut-off 値とし、4U/ml を結核症患者か否かを診断する場合の cut-off 値とすることを提唱する。

ただし今回の検討で、少ないながらも排菌性感染性結核症であっても陽性化しない症例が存在した。これについては、対象となった結核患者に高齢者が比較的多かったことから、加齢による免疫機能の低下が影響した可能性が考えられる。豊田ら¹⁴⁾は免疫機能の低下がある AIDS 患者 3 例で TBGL 抗体測定の有効性を検討しているが、発症後半年以上の重症結核でありながら、cut-off 値を 2U/ml に設定した場合、陽性となったのは 1 例のみであったと報告している。免疫機能が低下している場合の本測定法の利用については、今後さらに検討する必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、検体収集にご協力頂いた淳風会旭ヶ丘病院の理事長 原 義人先生ほか医局員の方々、

窪田医院院長 窪田好文先生、自治医科大学 櫻林郁之助教授に感謝致します。また、TBGL 抗体価測定キットを提供いただいた協和メデックス(株)に感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省保険医療局結核感染症課監修：結核の統計 1997, 財団法人結核予防会, 1997, 56.
- 2) 小栗豊子：結核菌検査・薬剤耐性検査。臨床と微生物。1989; 16: 413-417.
- 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™ 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: 7-19.
- 4) 阿部千代治, 森 亨, 藤井英治, 他：結核菌の迅速検出のための MTD の評価に関する共同研究。結核。1995; 70: 7-12.
- 5) 古賀宏延：抗酸菌感染症に対する分子生物学的アプローチ。結核。1995; 70: 31-36.
- 6) 川田 博, 鈴木直仁, 武田祐子, 他：高張食塩水吸入誘発痰による肺結核の診断。結核。1996; 71: 7-10.
- 7) 倉島篤行：新しい抗酸菌検査法に関するアンケート調査成績。結核。1996; 71: 42-46.
- 8) 森下宗彦：結核の免疫学的診断法の進歩。結核。1994; 69: 97-106.
- 9) 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. FEMS Microbiol Immunol. 1991; 76: 201-204.
- 10) 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 Labo Anallysis. 1997; 11: 140-145.
- 11) 市原清志：「NEW 臨床検査診断学」, 宮井 潔編, 南江堂, 東京, 1992, 83-93.
- 12) 辻 一郎：ROC 分析の基本概念 集団検診への応用。臨床病理。1990; 38: 597-600.
- 13) 露口泉夫, 東 市郎：結核のアレルギー・免疫。臨床と微生物。1989; 16: 398-403.
- 14) 豊田丈夫, 大角光彦, 青柳昭雄, 他：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。結核。1996; 12: 655-661.