

原 著

## 肺結核症ならびに非結核性肺抗酸菌症の血清診断

<sup>1</sup>近藤 有好    <sup>2</sup>桶谷 典弘    <sup>2</sup>丸山 倫夫    <sup>2</sup>齊藤 泰晴  
<sup>2</sup>宮尾 浩美    <sup>2</sup>大野みち子    <sup>2</sup>和田 光一    <sup>2</sup>土屋 俊晶  
<sup>3</sup>永井 忠    <sup>3</sup>土屋 邦子    <sup>3</sup>渡辺 靖

<sup>1</sup>JR 東日本旅客鉄道株式会社新潟鉄道健診センター,

<sup>2</sup>国立療養所西新潟中央病院呼吸器科, <sup>3</sup>臨床検査科

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF PULMONARY TUBERCULOSIS AND  
 NONTUBERCULOUS PULMONARY MYCOBACTERIOSIS

<sup>1</sup>\*Ariyoshi KONDO, <sup>2</sup>Norihiro OKETANI, <sup>2</sup>Michio MARUYAMA,  
<sup>2</sup>Yasuharu SAITO, <sup>2</sup>Hiroshi MIYAO, <sup>2</sup>Michiko OHNO, <sup>2</sup>Koichi WADA,  
<sup>2</sup>Toshimasa TSUCHIYA, <sup>3</sup>Tadashi NAGAI, <sup>3</sup>Kuniko TSUCHIYA, and  
<sup>3</sup>Yasushi WATANABE

<sup>1</sup>Niigata Tetsudo-Kenshin Center, East Japan Railway Company,

<sup>2</sup>Department of Respiratory Medicine and

<sup>3</sup>Department of Clinical Laboratory, National Nishi-Niigata-Chuo Hospital

Objective: The present study was undertaken to evaluate the utility of the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis and nontuberculous pulmonary mycobacteriosis by ELISA using a Pathozyme-Myc kit (Myc kit) and a Pathozyme-TB complex kit (TB kit) (OMEGA Diagnostics Ltd.).

Study population: The subjects comprised 256 healthy volunteers (HV, healthy hospital employees), 66 patients with sputum-positive active pulmonary tuberculosis (apTB), 14 patients with healed pulmonary tuberculosis (hpTB), 24 patients with nontuberculous pulmonary mycobacteriosis (NTM) and 32 patients with pulmonary diseases other than mycobacteriosis.

Results: 1) The serum IgG antibody titers determined with the Myco kit were significantly higher in the apTB group ( $p < 0.01$ ), the hpTB group ( $p < 0.01$ ), and the NTM group ( $p < 0.01$ ) than those in the HV and the other pulmonary disease group. At a cut-off value of the mean + 2SD of the values obtained in the HV, the positive rate was 47.0% in patients with apTB, 50.0% in those with NTM, 21.4% in those with hpTB, 3.1% in those with other pulmonary diseases, and 1.6% in the HV. Analysis of ROC curves showed that the HV and the pulmonary mycobacteriosis group (apTB and NTM) were best distinguished by a cut-off value of -0.280 OD (log), with the sensitivity and the

\*〒950-0908 新潟県新潟市幸西1-1-1

\*1-1-1, Saiwai-Nishi, Niigata-shi, Niigata 950-0908 Japan.

(Received 13 Oct. 2000 / Accepted 5 Jun. 2001)

specificity being 83.3% and 78.5%, respectively. It was impossible to distinguish apTB from NTM. 2) The serum IgG antibody titers determined with the TB kit were significantly higher in the apTB group than those in the HV ( $p < 0.01$ ), the NTM group ( $p < 0.05$ ) and the other pulmonary disease group ( $p < 0.01$ ). No significant difference was observed between the HV and the patients with NTM or those with other pulmonary diseases. Although the positive rate of the test was low in the apTB group (42.4%), there was a significant difference between apTB and NTM (12.5%) ( $p < 0.05$ ), suggesting that apTB could be distinguished from NTM. 3) Since the serum antibody titers determined by the Myco kit showed no significant difference between apTB and NTM, and there was also no difference in the positivity between the two diseases, we performed serologic examination using the Myco kit to detect both diseases as pulmonary mycobacteriosis. After diagnosing pulmonary mycobacteriosis by the Myco kit, we then used the TB kit to separate apTB from NTM. In this case, the sensitivity and specificity of the test were 55.6% and 85.7%, respectively. Better methods should be developed to distinguish apTB from nontuberculous mycobacteriosis.

**Key words:** Pulmonary tuberculosis, Non-tuberculous pulmonary mycobacteriosis, Serodiagnosis, 38kDa antigen, Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, Pathozyme-Myco kit, Pathozyme-TB complex kit

**キーワード:** 肺結核, 非結核性肺抗酸菌症, 血清診断, 38kDa 抗原, ROC 分析, Pathozyme-Myco kit, Pathozyme-TB complex kit

## はじめに

抗酸菌症の診断は近年急速に進歩した。特に核酸診断法や液体培地の導入などによって、菌種の同定も含め、迅速かつ正確にその検出が可能となった。また、結核菌の全遺伝子の塩基配列が解読された現在<sup>1)</sup>, より新しい遺伝子診断法の開発は一層加速されると思われる。

これに対し、抗酸菌症の血清診断は約1世紀にわたる開発の歴史を持ちながら、わが国では未だ臨床検査法として定着したとは言い難い。この間、測定法は血球凝集反応 (hemagglutination) から ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) や immuno (-dot) blot 法へと進歩し、使用された抗原も粗な結核菌菌体や結核菌細胞壁抗原<sup>2)</sup>, 可溶性濾液抗原<sup>3) 7)</sup> などから BCG<sup>2)</sup>, PPD<sup>2)</sup>, cord-factor (trehalose-6, 6'-dimycolate)<sup>4) 5) 30)~32)</sup>, glycolipids (acylated-trehaloses)<sup>6)</sup>, Antigen 5<sup>7) 8) 36)~38)</sup>, Antigen 6<sup>9)</sup>, Antigen 60<sup>10)~14)</sup>, P32-protein<sup>15) 28)</sup>, Kp90<sup>12) 16)</sup>, 10kDa<sup>17)</sup>, 14kDa<sup>18)</sup>, 16kDa<sup>17)</sup>, 19kDa<sup>18) 19)</sup>, 24kDa<sup>17)</sup>, 30kDa<sup>20)</sup>, 34kDa<sup>21)</sup>, 38kDa (Antigen 5)<sup>12) 13) 18) 23)~25)</sup>, 65kDa<sup>18)</sup>, 88kDa<sup>22)</sup> 蛋白, lipoarabinomannan<sup>18) 33) 34)</sup> など多岐にわたり、現在でも新しい抗原の開発が続けら

れている。また、血清のみならず喀痰や気管支肺胞洗浄液<sup>7) 13)</sup>, 胸水<sup>28)</sup>, 髄液<sup>18)</sup>, 唾液<sup>26) 27)</sup> なども測定の対象とされた。しかし、排菌がありながら抗体価の上昇しない個体の存在や、免疫抑制状態にある症例での陽性率の低下、活動性肺結核と陈旧性肺結核や非結核性肺抗酸菌症との鑑別の困難性など、抗体の測定という測定原理自体の問題もあり、定着への障害になっている。

しかし、一方、わが国では年間約4万4000人が新たな結核患者として登録され、その増加が緊急事態として宣言された。この4万4000人のうち、約半数の2万3000人は検査材料の採取ができないか、あるいは排菌陰性のいわゆる臨床診断例である。当然のことながら、これらの症例は遺伝子診断や液体培地による抗酸菌検出など最新技術を含む抗酸菌検出法の恩恵を受け得なかった症例であり、他の何らかの客観的指標が求められている抗酸菌症疑い例である。これらの症例に抗酸菌症としての根拠を与え、適切な治療と処置を行うことは重要な問題である。さらに、近年肺抗酸菌症に占める非結核性肺抗酸菌症の頻度は増加し、療養施設では約16%, 総合病院では少なくとも20%程度は占めるともいわれる<sup>29)</sup>。排菌陰性例で、肺結核と非結核性肺抗酸菌症を区別することも、その後の治療や対策を考えるとき重要な問題である

と言わざるを得ない。また、肺外結核は少数例ではあるが、診断に苦慮する場合が多い。血清診断はこれらの症例にも役立つと思われる。

抗酸菌症の診断法には、画像診断やツベルクリン反応、塗抹、培養（固形培地、液体培地）、核酸診断、血清診断、その他があるが、これらをどのように合理的に組み合わせ使用すべきかは、必ずしも明確に示されていない。私どもはこれらの問題も併せ考え、(1) 血清診断は有用か、(2) 血清診断による肺結核と非結核性肺抗酸菌症の鑑別は可能か、(3) 血清診断が有用とすればどのように使用すべきか、などを中心に検討を加えようと試みた。

### 対象と方法

#### 対象

(1) 健常対照者：同意が得られ、定期健診で異常の認められなかった男57例（44.4±9.1歳，28～58歳），女199例（39.3±10.3歳，21～59歳），計256例（40.4±10.2歳，21～59歳）の病院職員を健常対照とした。

(2) 活動性肺結核：入院時、喀痰の塗抹または培養、あるいは両者が陽性で入院3カ月以内の症例、あるいは採血時排菌陽性であった症例のみを活動性肺結核とした。症例は男50例（62.8±15.6歳，22～86歳），女16例（66.2±19.1歳，23～92歳），計66例（63.6±16.4歳，22～92歳）である。

(3) 陳旧性肺結核（結核治癒例）：入院時排菌陽性で、治療終了例を陳旧性肺結核とした。発症からの経過は約1年～9年といろいろで、男11例，女3例，計14例である。

(4) 非結核性肺抗酸菌症：国療非定型抗酸菌症共同研究班の診断基準を満たす男14例（73.1±61歳，64～84歳），女10例（65.7±13.3歳，51～84歳），計24例（70.4±9.8歳，51～84歳）で、*M. xenopi* 2例，*M. kansasii* 1例以外は *M. avium* あるいは *M. intracellulare* である。いずれも結核症の既往を認めない症例である。

(5) その他の肺疾患（肺結核，非結核性肺抗酸菌症以外の肺疾患）：特発性間質性肺炎6例，肺癌6例，気管支拡張症5例，塵肺症4例，肺炎，過敏性肺炎その他11例で、男21例，女11例，計32例である。

#### 方法

(1) 抗原：OMEGA Diagnostics社（Scotland, UK）の Pathozyme-Myco kit（以下 Myco kit と略）ならびに Pathozyme-TB complex kit（以下 TB kit と略）を使用した。

a) Myco kit：2種類の抗原を含む kit である。第1抗原は、*M. tuberculosis* (H<sub>37</sub>R<sub>A</sub>) の cell wall antigen から OMEGA Diagnostics 社によって精製された抗原で、抗原性が高く genus *Mycobacterium* に共

通して存在している抗原である。第2抗原は、*M. tuberculosis* より抽出した *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) に特異的な 38kDa 蛋白の *Escherichia coli* による組みかえ抗原であり、この2種類の抗原が well に coat されている。

b) TB kit：第2抗原単独の kit である。

(2) 測定法：測定法の詳細は同社の測定マニュアルに譲るが、血清は測定まで-30℃で保管し、同一血清に対してこれら2種類の kit に対する IgG 抗体を ELISA 法によって同時に測定した。

Myco kit は、genus *Mycobacterium* に共通する抗原と *M. tuberculosis* complex に特異的な 38kDa 抗原の両者を含むため、*M. tuberculosis* の診断にバイアスがかかっているが、広く genus *Mycobacterium* に共通する抗体を検出し、TB kit は *M. tuberculosis* complex に対する特異的な抗体を検出すると期待される。わが国では *M. africanum* による感染はみられず、BCG 接種によってもこの kit による抗体価は上昇しないといわれるので<sup>23)30)</sup> (*M. bovis* BCG も 38kDa 抗原に対する遺伝子を有するが、antigenic epitopes の発現量は *M. tuberculosis* antigen の 1/10 である)、実際には TB kit は *M. tuberculosis* 感染による抗体を特異的に検出するものと思われる。

(3) 抗体価：抗体価の表示は、optical density (OD) value (antibody index) で表した。

(4) Cut off 値の検討：cut off 値の設定は付属の陽性ならびに陰性コントロール血清からの算定によらず、① 健常対照者の mean+2SD と、② 健常対照者、活動性肺結核患者、非結核性肺抗酸菌症患者などの ROC (receiver operating characteristic) curve の分析によって設定した。

#### 統計

各対象群の血清抗体価 (OD value) は対数変換で正規分布を示したので、OD value を常用対数に変換し統計処理を行った。また、表示も対数表示とした。2群間の比較は Student's t-test で、多群間の比較は一元配置分散分析、パラメトリックの多重比較 (multiple comparison, Scheffe, Tukey) で、ROC curve の分析には MedCalc software を使用した。

### 成績

(1) 健常対照者における抗体価

a) 分布：健常対照者 (n=256) における Myco kit ならびに TB kit に対する血中抗体価はそれぞれ -0.56±0.33, -0.90±0.24 で、正規分布を示した (Table)。

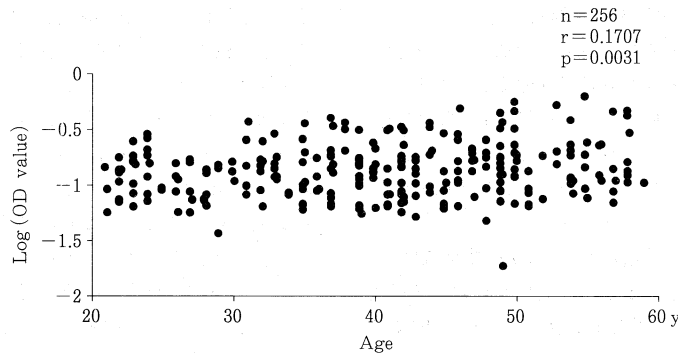
b) 性別：Myco kit に対する抗体価は、男 -0.52±

**Table** Characteristics of the groups and results of measuring IgG antibody to *M. tuberculosis* antigens by ELISA with a Pathozyme-Myco kit or Pathozyme-TB complex kit.

	Healthy volunteers	Active pulmonary tuberculosis	Healed pulmonary tuberculosis	Nontuberculous mycobacteriosis	Other pulmonary diseases
Number	256	66	14	24	32
Male	57	50	11	14	21
Female	199	16	3	10	11
Age (yr)	40.4±10.2	63.6±16.4	—	70.4±9.8	—
Antibody titer* (Pathozyme-Myco kit)	-0.56±0.33	-0.01±0.41	-0.20±0.40	0.03±0.31	-0.58±0.30
Antibody titer* (Pathozyme-TB complex kit)	-0.90±0.24	-0.57±0.58	-0.72±0.41	-0.84±0.29	-0.94±0.24

Antibody titers are expressed as optical density (OD) values.

\* Log Index



**Fig. 1** Correlation between IgG antibody to 38kDa antigen and age in healthy volunteers.

0.33 (n=57), 女 $-0.57 \pm 0.33$  (n=199), TB kitでは男 $-0.91 \pm 0.22$  (n=57), 女 $-0.90 \pm 0.25$  (n=199)で、いずれも性差は認められなかった (p=0.3956, p=0.6794)。

c) 年齢: 年齢による差は、Myco kitでは年齢との相関はみられず (n=256, r=-0.0672, p=0.8579), 20代 $-0.55 \pm 0.37$  (n=48), 30代 $-0.50 \pm 0.31$  (n=66), 40代 $-0.60 \pm 0.35$  (n=89), 50代 $-0.56 \pm 0.29$  (n=53)で、世代間にも有意差は認められなかった (p=0.2625)。これに対して、TB kitでは年齢と共に抗体価が上昇する傾向がみられた (n=256, r=0.1707, p=0.0031) (Fig. 1)。また、抗体価は20代 $-0.98 \pm 0.19$  (n=48), 30代 $-0.90 \pm 0.22$  (n=66), 40代 $-0.90 \pm 0.25$  (n=89), 50代 $-0.83 \pm 0.26$  (n=53)で、20代と50代の間に有意差がみられた (p<0.05)。

d) 再現性: 同一症例で春と秋に測定し、再現性を検

討した。Myco kitではFig. 2に示すごとく、両者の相関性は良好であったが (n=71, r=0.8470, p<0.0001), TB kitはMyco kitに比較するとやや不良であった (n=71, r=0.7608, p<0.0001)。

#### (2) 活動性肺結核患者における抗体価

Myco kitによる抗体価は、OD valueで $-0.01 \pm 0.41$ , TB kitは $-0.57 \pm 0.58$ で、いずれも健常対照者より高値であった (p<0.01)。また、男 ( $0.02 \pm 0.38$ ,  $-0.53 \pm 0.61$ ), 女 ( $-0.10 \pm 0.50$ ,  $-0.67 \pm 0.50$ )で差は認められなかった (Table)。重症度との関連では、

a) Myco kit: 病変が両側にあるものと1側にあるもの ( $0.04 \pm 0.36$ ,  $-0.23 \pm 0.54$ , p=0.1052), 空洞例と非空洞例 ( $0.03 \pm 0.41$ ,  $-0.07 \pm 0.43$ , p=0.3609), 拡がり(1)(2)(3) ( $-0.10 \pm 0.48$ ,  $0.03 \pm 0.45$ ,  $-0.11 \pm 0.28$ )では、いずれも有意差はみられなかった。

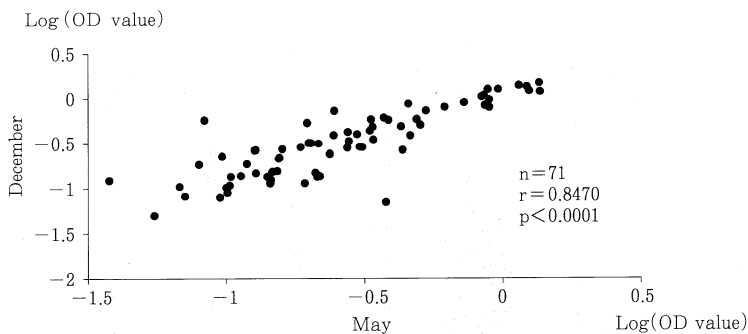


Fig. 2 Correlation between antibody levels in 71 healthy volunteers measured by ELISA with the Pathozyme-Myco kit in May and December.

b) TB kit : 病変が両側にあるものと1側にあるもの ( $-0.46 \pm 0.56$ ,  $-0.98 \pm 0.33$ ,  $p=0.0001$ ), 空洞例と非空洞例 ( $-0.38 \pm 0.60$ ,  $-0.76 \pm 0.46$ ,  $p=0.0107$ ), 拡がり(1)(2)(3) ( $-0.91 \pm 0.39$ ,  $-0.49 \pm 0.61$ ,  $-0.61 \pm 0.45$ ) では, 病変が両側にあるもの, あるいは空洞例では抗体価は有意に高かった。

### (3) 陳旧性肺結核患者(結核治癒例)の抗体価

陳旧性肺結核例では, Myco kit  $-0.20 \pm 0.40$ , TB kit  $-0.72 \pm 0.41$  で, 前者は健常対照者より高値を示したが ( $p<0.01$ ), 後者は有意差を認めなかった。また, 同様に性差はみられなかった (Table)。

### (4) 非結核性肺抗酸菌症患者の抗体価

Myco kit では  $0.03 \pm 0.31$  で健常対照者より高値を示したが ( $p<0.01$ ), TB kit は  $-0.84 \pm 0.29$  で健常対照者との間に有意差はみられなかった。また, 同様に男女差は認めなかった (Table)。

### (5) 抗酸菌症以外のその他の肺疾患患者における抗体価

Myco kit  $-0.58 \pm 0.30$ , TB kit  $-0.94 \pm 0.24$  で, いずれも健常対照者との間に有意差はなく, 性差も認めなかった (Table)。

### (6) 健常対照, 活動性肺結核, 陳旧性肺結核, 非結核性肺抗酸菌症ならびにその他の肺疾患間での抗体価の比較

a) Myco kit による抗体価の比較 : 上記5群間の抗体価を比較した結果, 5群間で差がみられ ( $p<0.0001$ ), 多重比較では健常対照と活動性肺結核 ( $p<0.01$ ), 陳旧性肺結核 ( $p<0.01$ ), ならびに非結核性肺抗酸菌症 ( $p<0.01$ ) との間に有意差がみられた。また, その他の肺疾患と活動性肺結核 ( $p<0.01$ ), 陳旧性肺結核 ( $p<0.05$ ), ならびに非結核性肺抗酸菌症 ( $p<0.01$ ) との

間にも有意差を認めた。しかし, 健常対照とその他の肺疾患との間には有意差はみられなかった (Fig. 3)。

b) TB kit による抗体価の比較 : Myco kit と同様に群間比較では差がみられ ( $p<0.0001$ ), 活動性肺結核と健常対照 ( $p<0.01$ ) ならびにその他の肺疾患 ( $p<0.01$ ) との間には有意差を認めた。また, 活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症との間にも有意差がみられた ( $p<0.05$ ) (Fig. 4)。

このように, 抗体価の比較からは Myco kit も TB kit も健常対照と活動性肺結核の間に有意差を認め両者の弁別が示唆されたが, 活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症の鑑別は TB kit のみに可能性があらうと思われた。そこで, まず活動性肺結核を診断する場合, Myco kit と TB kit のいずれが勝れているかを ROC curve の分析によって比較した。

(7) 活動性肺結核の診断 : 健常対照と活動性肺結核について, Myco kit (太線) と TB kit (細線) の ROC curve を Fig. 5 に示した。両曲線の曲線下面積の比較から明らかなように, 健常対照と活動性肺結核を鑑別する能力は Myco kit が勝っていた ( $p<0.01$ )。事実, 活動性肺結核の診断を健常対照の  $\text{mean}+2\text{SD}$  を cut off 値として行った場合, Myco kit では sensitivity は 47.0%, specificity は 98.4%, TB kit ではそれぞれ 36.4%, 96.5% であった。また, ROC curve の分析から得られた cut off 値では, Myco kit 81.8%, 78.5%, TB kit 42.4%, 93.4% であった。

そこで, 私どもは活動性肺結核の診断には Myco kit を使用し, 活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症の鑑別に TB kit を試みることにした。なお, Myco kit に対する抗体価は活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症で有意差がなく鑑別できなかつたので, 両者を肺抗酸菌症として

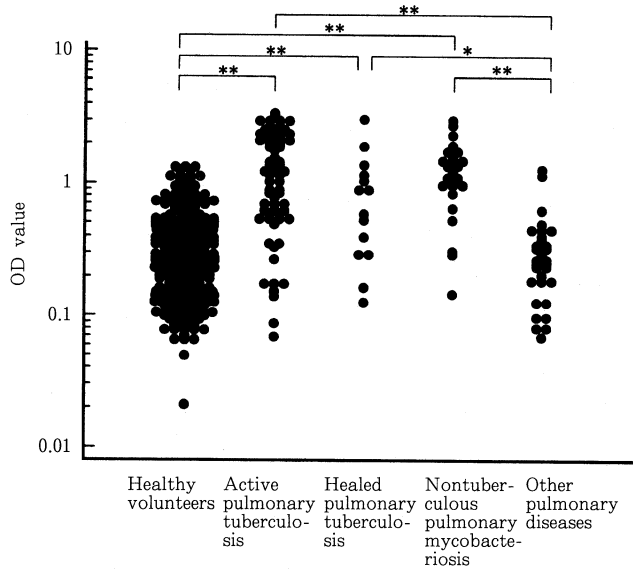


Fig. 3 Comparison of antibody levels between the groups: measurement was done by ELISA with a Pathozyme-Myco kit.  
\* p<0.05, \*\* p<0.01

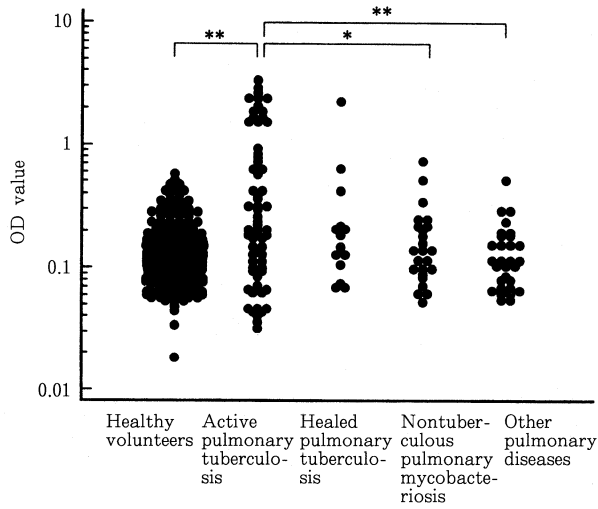


Fig. 4 Comparison of antibody levels between the groups: measurement was done by ELISA with a Pathozyme-TB complex kit.  
\* p<0.05, \*\* p<0.01

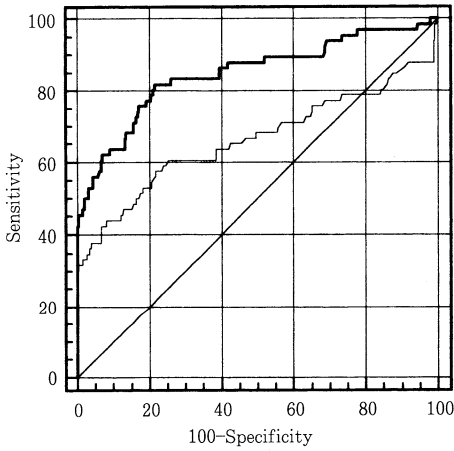


Fig. 5 Comparison of the ROC curves for the Pathozyme-Myco kit and Pathozyme-TB complex kit in differentiating patients with active pulmonary tuberculosis from healthy volunteers.

— Pathozyme-Myco kit  
 - - - Pathozyme-TB complex kit

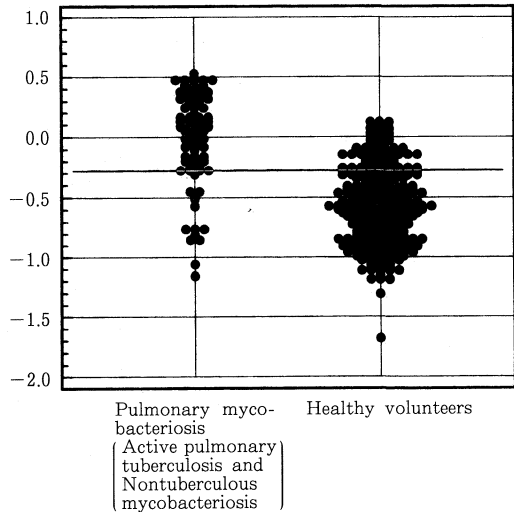
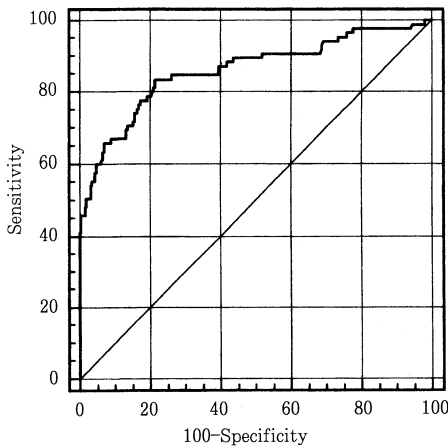


Fig. 6 ROC curve for the Pathozyme-Myco kit in differentiating patients with pulmonary mycobacteriosis from healthy volunteers. There was no significant difference in antibody titer between the patients with active pulmonary tuberculosis and those with nontuberculous pulmonary mycobacteriosis, so they were combined into a single group of pulmonary mycobacteriosis patients. At a cut-off of  $-0.28$ , the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of the test were 83.3%, 78.5%, 57.7% and 93.1%, respectively.

まとめた。

(8) Myco kitによる肺抗酸菌症診断のための cut off 値の設定: 健常対照の OD value を常用対数変換し,  $\text{mean}+2\text{SD}$  を cut off 値とする方法と, ROC curve の分析の両者で検討した。

前者による肺抗酸菌症に対する sensitivity は 47.8%, specificity は 98.4% であった。その場合の各群の陽性率は, 肺抗酸菌症 43 例/90 例 (47.8%), 活動性肺結核 31 例/66 例 (47.0%), 非結核性肺抗酸菌症 12 例/24 例 (50%), 陳旧性肺結核 3 例/14 例 (21.4%), その他の肺疾患 1 例/32 例 (3.1%), 健常対照 4 例/256 例 (1.6%) が陽性で, 特異性は高かったが肺抗酸菌症の陽性率は低く, 肺抗酸菌症と診断された症例の約半数は陰性とされた。

一方, ROC curve の検討では Fig. 6 に示すように, OD value (log) が  $-0.280$  で最も効果的に両群を鑑別できたが, その場合の sensitivity は 83.3%, specificity は 78.5%, positive ならびに negative predictive value はそれぞれ 57.7%, 93.1% であった。肺抗酸菌症 75 例/90 例 (83.3%), 健常対照 55 例/256 例 (21.5%) が陽性で, 陽性率は上昇したが健常対照群でもかなりの陽性率を示した。

次いで, Myco kit によって陽性とされた肺抗酸菌症を, 活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症に区分する cut off 値の設定を試みた。

		Pathozyme-Myco kit Log (OD value) -0.280	
Pathozyme-TB complex kit Log (OD value) -0.595	<b>【Group 3: others】</b>		
	active pulmonary tuberculosis	0 (0%)	<b>【Group 1: active pulmonary tuberculosis】</b> active pulmonary tuberculosis 30 (45.5%)
	nontuberculous pulmonary mycobacteriosis	0 (0%)	nontuberculous pulmonary mycobacteriosis 3 (12.5%)
	healed pulmonary tuberculosis	2 (14.3%)	healed pulmonary tuberculosis 1 (7.1%)
	other pulmonary diseases	3 (9.4%)	other pulmonary diseases 0 (0%)
	healthy volunteers	22 (8.6%)	healthy volunteers 9 (3.5%)
	<b>【Group 4: normal volunteers】</b>		<b>【Group 2: nontuberculous pulmonary mycobacteriosis】</b>
	active pulmonary tuberculosis	12 (18.2%)	active pulmonary tuberculosis 24 (36.4%)
	nontuberculous pulmonary mycobacteriosis	3 (12.5%)	nontuberculous pulmonary mycobacteriosis 18 (75.0%)
	healed pulmonary tuberculosis	4 (28.6%)	healed pulmonary tuberculosis 7 (50.0%)
other pulmonary diseases	26 (81.3%)	other pulmonary diseases 3 (9.4%)	
healthy volunteers	178 (69.5%)	healthy volunteers 46 (18.0%)	

Fig.7 Patients with active pulmonary tuberculosis, healed pulmonary tuberculosis, nontuberculous pulmonary mycobacteriosis, other pulmonary diseases than mycobacteriosis, and healthy volunteers were divided into 4 groups using an optical density (OD) of -0.280 (Pathozyme-Myco kit) or -0.595 (Pathozyme-TB complex kit) as the cut-off value.

(9) 活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症の鑑別: Myco kitによって陽性とされた活動性肺結核患者54例, 非結核性肺抗酸菌症患者21例についてTB kitによるROC curveを検討した。両者の鑑別はOD value (log) が-0.595で最適であったが, sensitivityは55.6%, specificityは85.7%で, 感度は必ずしも良好ではなかった。

(10) Cut off値による診断: 肺抗酸菌症をMyco kitで選別し, 選別した肺抗酸菌症をTB kitで活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症に分けた場合, Myco kitのOD value (log) が-0.280以上でかつTB kitのOD value (log) が-0.595以上の場合【活動性肺結核】に, Myco kitのOD value (log) が-0.280以上でTB kitのOD value (log) が-0.595未満は【非結核性肺抗酸菌症】, Myco kitのOD value (log) が-0.280未満でかつTB kitのOD value (log) も-0.595未満の場合は【健常者】に該当することになるが, 実際はFig. 7に示すように, 活動性肺結核の区分で活動性肺結核に該当するものは45.5%, 同様に非結核性肺抗酸菌症では75.0%, 健常者69.5%であった。また, Myco kitによって肺抗酸菌症(活動性肺結核あるいは非結核性肺抗酸菌症)と診断する正診率は83.3%であった。

## 考 察

結核を血清学的に診断しようとする試みは古くから行われてきたが, 感度ならびに特異度は必ずしも高くなく, 活動性肺結核と陳旧性肺結核の鑑別や, 肺結核と非結核性肺抗酸菌症の鑑別などにも難点のあることから, 現在

でも一般的にはあまり使用されていない。しかし, 採痰不能あるいは排菌陰性の肺結核患者が多数存在することや, 排菌があっても必ずしも非結核性肺抗酸菌症の診断が下せない場合があることなどを併せ考えると, 抗酸菌症に対する血清診断をもう一度見直すことは意義あることと思われる。そこで, 私どもはgenus *Mycobacterium*に共通して存在する菌体壁抗原と*M. tuberculosis* complexに特異的といわれる38kDa蛋白の2種類の抗原を使用し, 血清診断の有用性の検証と, 肺結核と非結核性肺抗酸菌症の鑑別を試みたが, その結果は満足すべきものではなかった。

これまで多くの抗原が結核の血清診断に使われてきたが, わが国ではcord factorやTBGL (Tuberculo-glycolipid)に対する抗体の測定と, lipoarabinomannan (LAM)に対する抗体の検出が主として行われてきた。前者は, 結核菌や類縁抗酸菌の細胞壁に特徴的なcord factor, あるいはcord factorとこれより極性の高い糖脂質画分よりなる構成成分に対する抗体を測定しようとするもので(デターミナー<sup>®</sup>TBGL抗体)<sup>4)5)30)~32)</sup>, 測定感度は65.6%~87.2%, 特異度は82.6%~96%で, 活動性肺結核に対する陽性率は67.4%~87.2%と報告されている。当然のことながら非結核性肺抗酸菌症も陽性となり(62.5%~75.6%), 活動性結核との鑑別は困難であった。

後者のLipoarabinomannanによる結核の血清診断はimmuno-dot blot assayによって行われているが<sup>33)34)</sup>, この方法は迅速かつ視覚的で, 臨床検査としては魅力的な検査法である。特異度は84~100%で高い



が、感度は国により異なり33～100%といわれる<sup>34)</sup>。活動性肺結核と陈旧性肺結核(未治療)との鑑別<sup>34)</sup>や非結核性抗酸菌症との鑑別<sup>33)</sup>も今のところ困難である。しかし、ツ反陽性のみの既感染者では陰性であり、活動性結核に特異的であるといわれる。

わが国ではあまり使われていないが、数多く使用されている抗原の1つにAntigen 60がある。Antigen 60, Antigen 38kDa, Antigen Kp90の三者を比較したChiangら<sup>12)</sup>の成績によれば、感度はそれぞれ80.77, 64.21, 62.58%, 特異度は88.4, 80.74, 66.3%で、Antigen 60が最も勝っていたという。PPDのthermostable componentであるAntigen 60は、*Nocardia*や*Corynebacterium* speciesにも存在するといわれるが、活動性肺結核に対して感度は約60%～89%, 特異度は82%～100%とのことであり<sup>34)</sup>、検討に値する抗原の1つであるかも知れない。

抗原も、cut off値のとり方も、対象疾患も異なる私どもの成績とは単純には比較できないが、Myco kitによる私どもの成績では、cut off値をmean+2SDとした場合の肺抗酸菌症に対する感度は47.8%, 特異度は98.4%であった(活動性肺結核でもほぼ同様)。また、ROC curveによるcut off値では、それぞれ83.3%, 78.5%でいずれも満足すべきものではなかった。この点、Omega Diagnostics社の成績は、活動性肺結核に対する感度は86%, 特異度は91%と報告されている。

私どもが使用したもう1つの抗原、38kDa抗原では活動性肺結核に対する感度は42.4%, 特異度は92.4%で、感度は良好とは言えなかった。この38kDa抗原(Antigen 5)を使用した国外の成績<sup>8) 12) 23) 24)</sup>は、特異度は80.7%～100%が高かったが、感度は36.8%～89.3%で必ずしも良くない。Omega Diagnostics社の成績でも感度は66%, 特異度は100%と報告されている。従って、この38kDa抗原は、感度よりも特異度の高い抗原と言えるかも知れない。この抗原に対する抗体価が、非結核性肺抗酸菌症より活動性肺結核で有意に高値を示したため、私どもはこの抗原を両者の鑑別に試みたが、興味ある所見であった。

結核の血清診断は、報告により感度や特異度が異なる。使用した抗原の特性にもよるが、健常対照のとり方や対象疾患の選び方でも異なる。私どもの成績は、入院患者、外来患者、病院職員からなる1集団での成績であり、健常対照も健康な病院職員であった。健常対照といえども、こと結核に関してはBCG未接種・未感染者からBCG接種、既感染者までいろいろの組み合わせを持つヘテロな集合体である。TB kitに対する健常対照者のIgG抗体は、年齢と共に上昇傾向がみられたが、同様な成績はデタミナーTBGL抗体でもみられている<sup>34)</sup>。高齢者は

ど結核菌に感作される機会が多いためと考えられるが、病院職員では一層その危険性は大きい。今回の成績が必ずしも良好でなかった原因の1つはそこにあると思われるが、BCG未接種で結核未感染者を健常対照とすれば感度、特異度などはまた異なった結果を示したであろう。結核に対してヘテロな集団であるわが国の問題点の1つかも知れない。

抗原の優劣を決めるためには、同一集団の同一血清で測定し、ROC curveの比較で決めるのが1つの方法である。今後、わが国で診断法の1つとして血清診断の普及を図るならば、このような検討も必要ではなからうか。

次に、活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症との鑑別の問題であるが、デターミナーTBGL抗体やLAMに対する抗体の測定と同様に、Myco kitも両者の鑑別はできなかった。*M. tuberculosis*のみでなく他の抗酸菌に共通する抗原を使用する限り両者の鑑別は困難であると思われるし、これまでも完全に両者を鑑別できる方法は見当たらない。天野ら<sup>35)</sup>は、*M. tuberculosis*由来の抗原(PPD)に対するIgG抗体やIgA抗体の測定では肺結核と非結核性肺抗酸菌症(*M. avium-intracellulare* complex)の鑑別は困難であったが、*M. avium-intracellulare* complex由来の抗原に対するIgGならびにIgA抗体ではある程度可能であり、特にIgA抗体では感度69.2%, 特異度90.5%で両者を鑑別できたと記載している。また、矢野は第39回日本臨床化学会年会ランチョンセミナー「結核症の血清診断」で、単一ミコール酸subclassを含むcord factorを用いれば菌種の鑑別も不可能ではないとし、結核患者の血清は結核菌cord factorに強く反応するが*M. avium* cord factorには反応性が低く、一方*M. avium*患者血清は*M. avium* cord factorによく反応するのに結核菌cord factorとの反応性は低かったと述べている。私どもは、活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症の鑑別にはTB kitを使用した。確かに、TB kitでは活動性肺結核は66例中28例(42.4%)が陽性であったのに対し、非結核性肺抗酸菌症では24例中3例(12.5%)のみが陽性で、有意差が認められた( $p=0.00875$ )。同様な差はBenjaminら<sup>8)</sup>の報告でもみられ、Antigen 5(38kDa)による活動性肺結核の陽性率89.3%に対し非結核性肺抗酸菌症のそれは52.2%で低値を示した。しかし、これのみで両者を鑑別できると考えるのは早計である。TB kitに対する抗体価は非結核性肺抗酸菌症では有意差はなかったが、活動性肺結核では病変の拡がりや重症度と関連し、病変が両肺にあるもの、また空洞例では有意に高値であった。従って、活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症の重症度が等しくないと比較はできないが、私どもが対象とした活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症の重症度の比較で

は、両者に有意差は認められなかった。

私どもは、Myco kitによって肺抗酸菌症をまず選別し、これをTB kitで活動性肺結核と非結核性肺抗酸菌症に区分してみた。Fig. 7に示すごとく、いずれの分画も目的とする疾患が最も多かったが、それ以外の疾患の混入もかなりみられた。38kDa抗原は*M. tuberculosis* complexに特異的なphosphate metabolismにかかわる細胞外リポ蛋白であるといわれ、それゆえに*M. tuberculosis* complexにhighly specificであるといわれたにもかかわらず、非結核性肺抗酸菌症でも抗体価が高値を示す症例もみられた。これらの症例については、抗原の特異性や交差反応性(cross-reactive epitopes)の問題などさらに検討を加える必要がある。抗酸菌症の核酸診断では、結核菌群と非結核性抗酸菌を鑑別できる方法が確立されているので、血清診断においても感度と特異度がより高く、両者を鑑別できる検査法の出現が望まれる。

結核の血清診断はまだ不十分ではあるが、使用できる局面は多い。それでは、血清診断はどのように使用されるべきであろうか。前倉<sup>5)</sup>によれば、血清抗体価は発症時よりもむしろ2~3カ月後に高値を示すという。同様な傾向は和田ら<sup>32)</sup>や、lipoarabinomannanを抗原として使った螺良ら<sup>33)</sup>も認め、治療前の陽性率よりも治療後の陽性率が高かったと述べている<sup>32)</sup>。抗体価を経時的に調べた私どもの症例にも、入院時よりその後の1~3カ月で抗体価の高い症例が多くみられた。このことは、現存の血清診断が早期診断には適しないことを示しているのかも知れないが、そうであるとすれば、血清診断は初診直後の喀痰の塗抹検査や核酸診断と同時にを行うのではなく、それらの陰性を確認した後で行うか、あるいは経時的な測定が効果的であることを示唆しているのではなかろうか。また、検査の意義は、それがどのような場面で使用されるかによっても異なる。感度や特異度が高くても100%でない限り、結核の低蔓延地域ではその意義は低下する。Myco kitによる肺抗酸菌症の検出感度は83.3%、特異度は78.5%であったが、これを有病率(disease prevalence)人口10万対38.9程度のがわのフィールドで使用した場合の陽性的中率(positive predictive value)は0.15%、陰性的中率(negative predictive value)は99.99%である。このことは、cut off値をmean+2SDとしても大差なかった。活動性肺抗酸菌症を否定する参考とはなっても、血清診断のみで肺抗酸菌症を診断することは困難である。今回対象とした集団は、健常対照者256名、活動性肺結核66名、陈旧性肺結核14名、非結核性肺抗酸菌症24名、その他の肺疾患32名、合計392名であったが、この集団での肺抗酸菌症の陽性的中率は53.6%、陰性的中率は94.0%

であった。抗酸菌症の血清診断は、自他覚所見や画像所見、臨床検査所見等で疾患を選別し、pretest probability(検査前確率)を高めてから行うのが効果的である。また、cut off値については、今回の場合に限って言えば、診断重視の場合はmean+2SDを、スクリーニング重視の場合はROC curveによるのが適切と思われる。

(終わりに臨み、抗原の提供を戴いたヤマサ醤油株式会社、故黒田真実氏、斉藤健一氏に厚く御礼申し上げます。)

## 文 献

- 1) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 11: 393: 537-544.
- 2) Winters WD, Cox RA: Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay. *Am Rev Respir Dis*. 1981; 124: 582-585.
- 3) Nassau E, Parsons ER, Johnson GD: The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle*. 1976; 57: 67-70.
- 4) Maekura R, Nakagawa M, Nakamura Y, et al.: Clinical evaluation of rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis by ELISA with cord factor (trehalose-6, 6'-dimycolate) as antigen purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148: 997-1001.
- 5) 前倉亮治: 抗酸菌感染症の迅速診断法。2. 血清診断法。結核。1992; 67: 775-779.
- 6) Escamilla L, Mancilla R, Glender W, et al.: *Mycobacterium fortuitum* glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154: 1864-1867.
- 7) Raja A, Baughman RP, Daniel TM: The detection by immunoassay of antibody to mycobacterial antigens and mycobacterial antigens in bronchoalveolar lavage fluid from patients with tuberculosis and control subjects. *Chest*. 1988; 94: 133-137.
- 8) Benjamin RG, 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: 1013-1016.
- 9) Stroebel AB, Daniel TM, Lau JHK, et al.: Serologic diagnosis of bone and joint tuberculosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. J Infect Dis. 1982; 146: 280-283.
  - 10) Turneer M, Van Nerom E, Nyabenda J, et al.: Determination of humoral immunoglobulins M and G directed against mycobacterial antigen 60 failed to diagnose primary tuberculosis and mycobacterial adenitis in children. Am J Respir Crit Care Med. 1994; 150: 1508-1512.
  - 11) Luh K-T, Yu C-J, Yang P-C, et al.: Tuberculosis antigen A60 serodiagnosis in tuberculous infection: Application in extrapulmonary and smear-negative pulmonary tuberculosis. Respirology. 1996; 1: 145-151.
  - 12) Chiang I-H, Suo J, Bai K-J, et al.: Serodiagnosis of tuberculosis: A study comparing three specific mycobacterial antigens. Am J Respir Crit Care Med. 1997; 156: 906-911.
  - 13) Grubek-Jaworska H, Zwolska Z, Droszcz P, et al.: Serum and bronchoalveolar IgG against A60 and 38kDa antigens in the diagnosis of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 1997; 1: 556-562.
  - 14) Gupta S, Bhatia R, Datta KK: Serological diagnosis of childhood tuberculosis by estimation of mycobacterial antigen 60-specific immunoglobulins in the serum. Tuberc Lung Dis. 1997; 78: 21-27.
  - 15) 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-Guerin. J Clin Microbiol. 1988; 26: 1714-1719.
  - 16) Alifano M, De Pascalis R, Sofia M, et al.: Evaluation of IgA-mediated humoral immune response against the mycobacterial antigen P-90 in diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chest. 1997; 111: 601-605.
  - 17) Verbon A, Weverling GJ, Kuijper S, et al.: Evaluation of different tests for the serodiagnosis of tuberculosis and the use of likelihood ratios in serology. Am Rev Respir Dis. 1993; 148: 378-384.
  - 18) Chandramuki A, Bothamley GH, Brennan PJ, et al.: Levels of antibody to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculous meningitis. J Clin Microbiol. 1989; 27: 821-825.
  - 19) Bothamley G, Batra H, Ramesh V, et al.: Serodiagnostic value of the 19 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in Indian patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1992; 11: 912-915.
  - 20) Sada ED, Ferguson LE, Daniel TM: An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis. 1990; 162: 928-931.
  - 21) Amicosante M, Barnini S, Corsini V, et al.: Evaluation of a novel tuberculosis complex-specific 34kDa protein in the serological diagnosis of tuberculosis. Eur Respir J. 1995; 8: 2008-2014.
  - 22) Laal S, Samanich KM, Sonnenberg MG, et al.: Surrogate marker of preclinical tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: Antibodies to an 88-kDa secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis. 1997; 176: 133-143.
  - 23) Cole RA, Lu HM, Shi YZ, et al.: Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic assay based on the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* on patients with pulmonary tuberculosis in China. Tuberc Lung Dis. 1996; 77: 363-368.
  - 24) Demkow U, Zielonka TM, Strzalkowski J, et al.: Diagnostic value of IgG antibody levels against 38 kDa mycobacterial antigen. (abstract) Pneumonol Alergol Pol. 1998; 66: 509-516.
  - 25) Rosales-Borjas DM, Zambrano-Villa S, Elinos M, et al.: Rapid screening test for tuberculosis using a 38-kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. (abstract) J Clin Lab Anal. 1998; 12: 126-129.
  - 26) Barlow PB, Daniel TM: The immunoglobulin response to tuberculosis. 3. Studies of hemagglutinating antibody to tuberculoprotein

- and tuberculopolysaccharide in serum, sputum, and saliva of patients with tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1973; 108: 675-676.
- 27) Del Pezzo M, Alifano M, Faraone S, et al.: Detection of IgA against the mycobacterial antigen A60 in serum and saliva in patients with active pulmonary tuberculosis: preliminary results. (abstract) *New Microbiol.* 1996; 19: 363-367.
- 28) Van Vooren J-P, Farber C-M, De Bruyn J, et al.: Antimycobacterial antibodies in pleural effusions. *Chest.* 1990; 97: 88-90.
- 29) 坂谷光則: 非定型抗酸菌症の疫学と臨床. 第73回日本結核病学会総会教育講演, 1998年, 新潟.
- 30) 岸本寿男, 守屋 修, 中村淳一, 他: 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. *結核.* 1999; 74: 701-706.
- 31) 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; 71: 655-661.
- 32) 和田雅子, 阿部千代治, 河野弘明, 他: TBGL による肺結核症の血清診断. *日胸疾会誌.* 1997; 35: 43-48.
- 33) 螺良英郎, 山中正彰, 坂谷光則, 他: 抗酸菌抗体検出法の臨床有用性に関する共同研究. *結核.* 1997; 72: 611-615.
- 34) Chan ED, Reves R, Belisle JT, et al.: Diagnosis of tuberculosis by a visually detectable immunoassay for lipoarabinomannan. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1713-1719.
- 35) Amano H, Mizoguchi K, Tsukamura M, et al.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the differential diagnosis of pulmonary tuberculosis and pulmonary diseases due to *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Jpn J Med.* 1989; 28: 196-201.
- 36) Daniel TM, De Murillo GL, Sawyer JA, et al.: Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134: 662-665.
- 37) Ma Y, Wang Y-M, Daniel TM: Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134: 1273-1275.
- 38) Chan SL, Reggiardo Z, Daniel TM, et al.: Serodiagnosis of tuberculosis using an ELISA with antigen 5 and a hemagglutination assay with glycolipid antigens. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 142: 385-390.