

全血インターフェロン γ アッセイによる結核感染診断技術の特性

原田 登之

キーワード：結核感染診断，ツベルクリン反応，クオンティフェロン γ TB-2G，潜在性結核感染，接触者検診

はじめに

結核菌は体内に侵入した後、マクロファージにより貪食されるが、マクロファージの殺菌機構から逃れ、増殖あるいは休眠状態になると考えられている典型的な細胞内寄生菌である。結核菌に感染した者のうち発症するのは約10%程度であり、残りの90%は免疫防御機構により結核菌を封じ込めた潜在性結核感染となり、生涯発症しないか、あるいは高齢等により免疫能が低下した際に結核を発症する、いわゆる「再燃」が起これると考えられている。現在、この潜在性結核感染者は、世界人口の約3分の1と見積もられており¹⁾、将来の感染源となりうる。従って、有効な結核対策の1つとして、この潜在性結核感染者を早期に見出し、発病を防ぐために予防内服を行うことが実施されている。

潜在性結核感染の診断に用いられる方法は、従来唯一ツベルクリン反応(ツ反)が世界的に使用されてきた。しかし、ツ反の診断感度は優れているものの、その特異性の点で重大な欠点をもっている。その理由は、ツ反で用いるPPDには数百種類もの異なった結核菌抗原が混在し、そのほとんどのものがBCGや非結核性抗酸菌の抗原と高い類似性を持ち、抗原としての高い交差性をもつためである。従って、結核感染していないPPD被投与者においても、BCG接種あるいは非結核性抗酸菌感染によってツ反が陽性になる場合がある。この欠点のため、BCG接種が広範に行われている日本では、ツ反により正確な結核感染診断を行うことはきわめて困難である。低特異性はツ反のもつ最大の欠点であるが、他にも

PPD投与およびツ反測定における技術的差、PPD再投与によるブースター効果(抗原再投与による免疫反応の増強効果)、ツ反測定のための再受診の必要性、等の弱点をもつ。

しかし、最近これらツ反のもつすべての欠点を一挙に克服し、さらに高い感度・特異度をもち合わせた診断法クオンティフェロン γ TB-2G (QFT-2G)が開発され、診断試薬として平成17年4月に承認され、さらに本年1月に保険収載されるに至った。

Interferon- γ 産生誘導性結核菌特異抗原 ESAT-6 および CFP-10の発見

1995年、デンマーク国立血清研究所(Statens Serum Institute)のAndersenらのグループにより、マウス記憶T細胞からInterferon- γ (IFN- γ)産生を強く誘導する結核菌抗原ESAT-6(The early secretory antigenic target 6 kDa protein)が、結核菌培養濾液から精製・同定され、同時にその遺伝子もクローニングされた²⁾。翌1996年MahairasらのグループがBCGと*M. bovis*間の遺伝子レベルでの相違を解析した結果、先のESAT-6遺伝子がBCGでは欠落しているRD-1領域に存在していることが明らかになった³⁾。また、ESAT-6と同様にIFN- γ 産生を強く誘導する結核菌抗原CFP-10が、ESAT-6と同じRD-1領域内に位置していることも明らかにされた。さらにその後の解析の結果、ESAT-6およびCFP-10は、すべての*M. bovis* BCG重株と*M. avium*, *M. intracellulare*を含む大部分の非結核性抗酸菌には存在せず、*M. tuberculosis*, *M. bovis* (BCG以外の)と*M. africanum*を含む結核菌群、お

よびごく一部の非結核性抗酸菌にのみ存在することが判明した (Table 1)。これらの発見を基に、BCGと大多数の非結核性抗酸菌には存在しない ESAT-6 および CFP-10 を刺激抗原としてリンパ球を刺激し、T細胞より産生された IFN- γ 量を測定することにより、BCG接種および大多数の非結核性抗酸菌感染の影響を受けない結核感染診断法 QFT-2G を開発することが可能になった。

QFT-2G の検査法

QFT-2G の検査法は 2 段階から構成されており、第 1 段階の血液培養はヘパリン採血した全血約 5 ml を 24 ウェル培養プレートの 4 ウェルに 1 ml ずつ分注する。次に陰性コントロール、ESAT-6、CFP-10 および陽性コントロールを各 3 滴添加し、攪拌後 37°C で 16~24 時間培

養する。この抗原刺激は、採血後 12 時間以内に行わなければならない。培養後、血漿を保存チューブに回収する。第 2 段階は、血漿中に産生された IFN- γ 量を測定する ELISA 法であり、各抗原特異的な IFN- γ 産生量を算出し、この値を指標に結核感染を診断する (Fig. 1)。QFT-2G では、採血の翌日に ELISA で IFN- γ 量の測定が機器によりなされるため、ツ反より迅速かつ客観的な結果が得られる。また、ツ反と異なり生体に PPD を投与しないため、ブースター効果は考慮する必要がなく、さらにツ反のように医療機関を再訪して反応結果を測定する必要もない。このように QFT-2G はツ反の低特異性の欠点のみならず、他のすべての問題点を克服しうる診断法であると言える。

Table 1 Distribution of ESAT-6 and CFP-10 among mycobacterial species

Species with ESAT-6/CFP-10	Species without ESAT-6/CFP-10
Tuberculosis complex <i>M. tuberculosis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i>	BCG substrains Gothenburg Moreau Tice Tokyo
Environmental strains <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. gastri</i> <i>M. leprae</i>	Danish Glaxo Montreal Pasteur Environmental strains <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> etc.

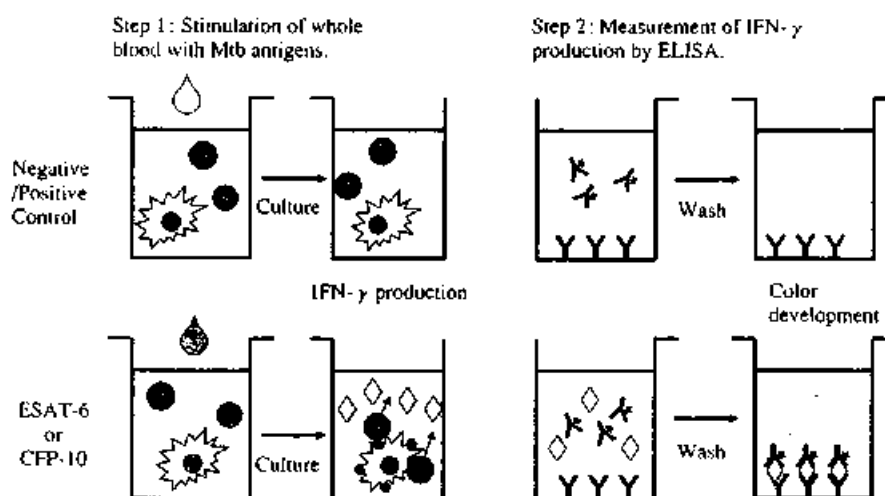


Fig. 1 QFT-2G test procedure

The procedure is composed of two steps. In the first step, each reagent (negative control, ESAT-6, CFP-10, and positive control) is added to whole blood taken in the presence of Heparin, and blood is cultured for 16 to 24 hours at 37°C. In the second step, plasma is harvested on the next day, and the IFN- γ produced is measured by ELISA.

QFT-2Gの治験

われわれは、このQFT-2Gを日本において結核感染診断法として使用するため、幾つかの機関と協力し、治療開始前の塗抹陽性結核患者118名およびBCG既接種健康者217名のボランティアの協力を得て治験を行った。Fig. 2に示すように、結核患者の大多数がESAT-6かCFP-10のいずれかの刺激に反応し、IFN- γ 産生が誘導された。対照的に、健康者群の大部分は反応しなかった。以上の結果から、各抗原特異的IFN- γ 産生量(各抗原刺激で誘導されたIFN- γ 産生量から、陰性コントロールでのIFN- γ 産生量を差し引いた値)を算出し、

診断に適切なカットオフ値0.35 IU (国際単位) /mlを決定した。本カットオフ値におけるQFT-2Gの感度および特異度はそれぞれ89.0%と98.1%であり (Table 2)、結核感染診断法としてきわめて優れた数値をもつことが示された。この治験結果より、QFT-2GはBCG接種の影響を受けず結核感染を感度よく診断できることが明らかになった。

接触者検診におけるQFT-2G検査のパフォーマンス

治験では活動性結核をこの検査の真の目的である「潜在結核感染」の代用指標としてQFT-2Gの感度(潜在感染の状態にあるものの陽性率)を解析し、またQFT-2G

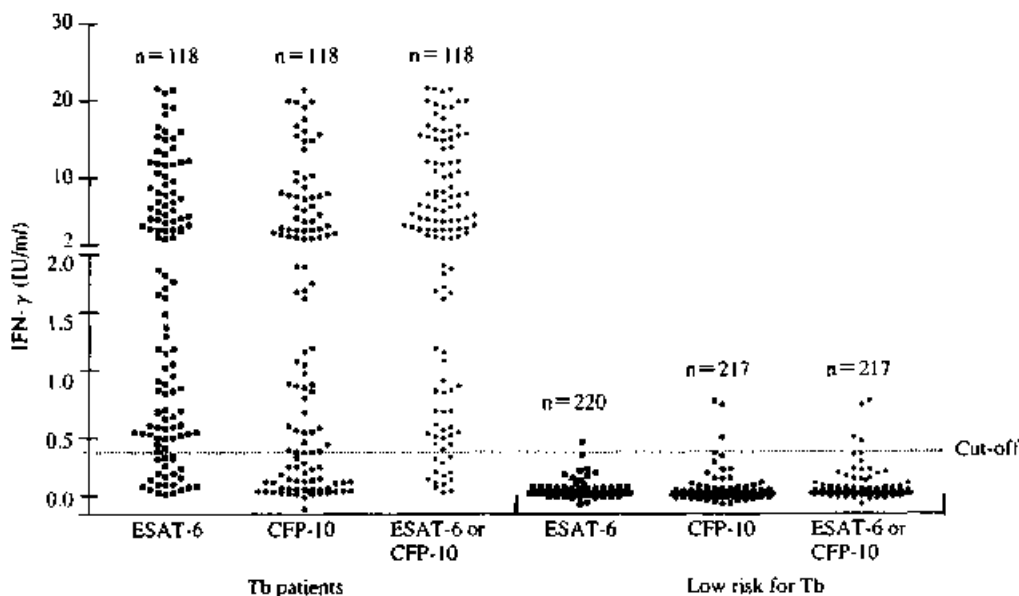


Fig. 2 Dot plot of individual responses to ESAT-6 and CFP-10 for Tb patients and lowrisk subjects. Individual responses to ESAT-6 (the left lane), CFP-10 (the middle lane), and the highest response to either ESAT-6 or CFP-10 (the right lane) in each group are shown.

Table 2 Specificity and sensitivity in each cut-off value

Cut-off (IFN- γ IU/ml)	CFP-10		ESAT-6		CFP-10 and ESAT-6	
	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)
0.05	92.5	81.4	94.8	94.9	89.4	97.5
0.10	94.4	77.1	96.2	90.7	92.0	95.8
0.15	95.8	72.9	97.6	88.1	93.9	93.2
0.20	96.7	71.2	99.1	86.4	96.2	91.5
0.25	97.2	67.8	99.1	84.7	96.7	91.5
0.30	97.7	66.9	99.1	83.1	97.2	89.8
0.35	98.6	65.3	99.5	81.4	98.1	89.0
0.40	98.6	61.9	99.5	79.7	98.1	88.1
0.45	98.6	60.2	100.0	78.8	98.6	86.4
0.50	99.1	60.2	100.0	75.4	99.1	83.9

Specificities and sensitivities at every 0.05 IU/ml of IFN- γ are shown in the left column (CFP-10 alone), the middle column (ESAT-6 alone), and the right column (the highest response in either antigen).

検査の判定基準に「疑陽性(判定保留)」の概念を導入した⁷⁾。しかし、QFT-2Gは活動性結核症に反応するだけでなく、より本来的に潜在性結核感染に反応する、すなわち潜在結核感染も診断可能であるということは、多くの接触者検診事例でQFT-2Gを適用した経験から証拠が固められてきた。とくに、感染源と被験者の接触の濃厚さとQFT-2G陽性率の相関は有力な証拠である。

このような最初の事例は、某大都市の専門学校男性講師が初発患者であった事例である⁸⁾。その際、接触度の濃淡を基に、初発患者の講師と共に海外修学旅行に参加した集団を濃厚接触群、海外修学旅行に参加しなかった集団を非濃厚接触群とに分けてQFT-2G検査の結果を解析した。その結果、濃厚接触群では45.5%、非濃厚接触群では7.1%がQFT-2G陽性となり、明らかに接触度の濃厚さに応じてQFT-2G陽性率が上昇していた。

次に報告されたのは、初発患者が大学生である大学における集団感染事例である⁹⁾。この事例においては、ツ反発赤径にかかわらず接触者全員にQFT-2G検査が実施された。濃厚接触群のツ反発赤径の分布は非濃厚接触群のそれと比較し有意に右方偏位していたことから、濃厚接触群において大規模な感染が予想されたが、QFT-2G陽性率の圧倒的な違いから感染が明白になった。濃厚接触群におけるQFT-2G陽性者と疑陽性者はそれぞれ32.7%と16.8%であったのに対し、非濃厚接触群におけるQFT-2G陽性者と疑陽性者はそれぞれ0.8%と0.8%であった。この事例で得られたもうひとつの重要な証拠は、QFT-2G陽性者のツ反の分布が典型的な正規分布に従い、その平均は発赤で50 mm、これは活動性結核患者における平均30 mmの分布とは異なるもので、QFT-2G陽性が活動性結核とは別の現象、つまり潜在結核感染を判定していることが支持される。なお、この濃厚接触群での観察からツ反発赤30 mm未満のQFT-2G陽性者が少なくないことも確認された。

この他に病院における集団感染でも、やはり接触度の濃厚さに比例しQFT-2G陽性率が上昇していた事例、あるいは結核高蔓延国からの就労者等における高いQFT-2G陽性率等の結果が得られている。また海外においても、接触者検診で接触の濃厚さとQFT-2G陽性率が相関するという報告がデンマークから¹⁰⁾、医療従事者の職務上の結核感染曝露の程度とQFT-2G陽性率が相関するという報告がわれわれ¹¹⁾、およびインド¹²⁾から報告されている。このような事例からQFT-2G検査により潜在性結核感染の検出が可能であることが明らかになってきた。さらにイタリア¹³⁾、結核中蔓延国である韓国¹⁴⁾などからもその利用の経験が報告され、いずれもQFT-2Gによる潜在結核感染診断の妥当性と有用性を示唆している。

一方、大規模な接触者検診において、従来のツ反によ

る診断法で感染と診断され予防内服対象となった者の大部分がQFT-2Gで陰性であったことから、これまではツ反により過剰な予防内服を行っていた可能性が示唆されてきた¹⁵⁾。最近、われわれはQFT-2Gの検査単価が5,000円から10,000円の場合、感染曝露が高度でない事例ではツ反検査でスクリーニングされた者にQFT-2Gを追加することは費用対効果の点で有利であることを示した¹⁶⁾。このように今後接触者検診に際し、QFT-2G検査が広く使われるようになると、過剰な予防内服を防ぐことができ、さらにより正確に既感染者を見出すことができるため効果・効率のよい結核対策ができると考えられる。

おわりに

QFT-2Gは開発されてまもないため、今後解決されるべき幾つかの疑問点をもっている。例えば、感染源への曝露の時期から反応が陽性になるまでの期間、感染後長期間における応答の消長、化学予防や化学療法の影響など、まだその診断特性について知見は十分ではない。また小児・幼児における特性についても同様であり、さらに小児、とくに乳幼児では現行の最低採血必要量(5 ml)の多さからくる制約の克服も課題である。われわれはこれらの点についての検討を進めるべく現在も研究を行っており、得られた知見を基にQFT-2Gのより適切なる使用法を提供することにより、結核対策に貢献できると期待している。

謝 辞

発表の機会をお与えいただき、また座長の労をお取りいただきました第81回日本結核病学会会長渡辺彰先生、今村賞にご推薦いただきました結核研究所所長石川信克先生、本研究において終始ご指導を賜りました森亨先生、免疫検査科樋口一恵先生はじめ多くの共同研究者の諸先生方、接触者検診の際にご協力いただきました保健所・施設等のご担当の方々に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Comstock, GW: Epidemiology of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1982; 125 (suppl.): 8-16.
- 2) World Health Organization: Tuberculosis fact sheet number 104, 2002. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>)
- 3) Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, et al.: Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 1995; 154: 3359-3372.
- 4) Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al.: Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol.* 1996; 178: 1274-1282.

- 5) Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al.: Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000 ; 356 : 1099-1104.
- 6) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al.: Specific detection of tuberculosis infection with an interferon-gamma based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 ; 170 : 59-64.
- 7) 原田登之, 樋口一恵, 関谷幸江, 他: 結核菌抗原 ESAT-6 および CFP-10 を用いた結核感染診断法 QuantiFERON® TB-2G の基礎的検討. *結核*. 2004 ; 79 : 725-735.
- 8) 原田登之, 森 亨, 穴戸真司, 他: 集団感染事例における新しい結核感染診断法 QuantiFERON®TB-2G の有効性の検討. *結核*. 2004 ; 79 : 637-643.
- 9) 船山和志, 辻本愛子, 森 正明, 他: 大学での結核集団感染における QuantiFERON®TB-2G の有用性の検討. *結核*. 2005 ; 80 : 527-534.
- 10) Brock J, Weldingh K, Lillebaek T, et al.: Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 ; 170 : 65-69.
- 11) Harada N, Nakajima Y, Higuchi K, et al.: Screening for Tuberculosis Infection Using Whole-Blood Interferon-gamma and Mantoux Testing Among Japanese Healthcare Workers. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006 ; 27 : 442-448.
- 12) Pai M, Gukhale K, Joshi R, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA*. 2005 ; 293 : 2746-2755.
- 13) Ferrara G, Losi M, Meacci M, et al.: Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 ; 172 : 631-635.
- 14) Kang YA, Lee HW, Yoon HI, et al.: Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA*. 2005 ; 293 : 2756-2761.
- 15) 宮下裕文, 樋口一恵, 東山典子, 他: 接触者検診における全血インターフェロングammaアッセイを用いた結核感染の診断—QuantiFERON®TB-2Gを用いた検討—. *結核*. 2005 ; 80 : 557-564.
- 16) 森 亨, 原田登之: 接触者健診におけるQuantiFERON®TB 第二世代による感染診断の経費効果分析. *結核*. 2005 ; 80 : 675-686.

CHARACTERISTICS OF A DIAGNOSTIC METHOD OF TUBERCULOSIS INFECTION
BASED ON WHOLE BLOOD INTERFERON- γ ASSAY

Nobuyuki HARADA

Abstract It is assumed that about 10% of individuals infected with *M. tuberculosis* (Mtb) develop tuberculosis (Tb), and the remaining 90% suppress contain Mtb through their immune systems, but have a latent tuberculosis infection (LTBI). To effectively control Tb, it is essential to detect individuals with LTBI in a Tb outbreak and provide chemoprophylaxis for them.

Until recently, the tuberculin skin test (TST) has been the only diagnostic method for LTBI. However, the specificity of TST is low, because the purified protein derivative (PPD) used for TST contains numerous Mtb antigens that are almost identical to BCG antigens or similar to non-tuberculous mycobacterium (NTM) antigens. For this reason, TST may produce positive results in BCG-vaccinated individuals or NTM-infected individuals without Mtb infection. Therefore, it is very difficult to diagnose LTBI in Japan, where BCG vaccination is widely administered. In addition to this, TST has other defects, such as technical variations for injecting PPD or measuring the TST response, the necessity of a return visit to the doctor to measure the TST response 2 days after PPD injection, and the booster effect through reinjection of PPD.

More recently, a new diagnostic method that can overcome these defects in TST, QuantiFERON[®]TB-2G (QFT-2G), has been developed. In QFT-2G, two Mtb-specific antigens, ESAT-6 and CFP-10, are used to stimulate whole blood, and based on produced interferon- γ (IFN- γ), Mtb infection is diagnosed. Since ESAT-6 and CFP-10 are absent from all *M. bovis* BCG substrains and most of NTM including *M. avium*, *M. intracellulare*, but are present in tuberculosis complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) and only a few strains of NTM, QFT-2G is not affected by prior BCG vaccination nor most of NTM infections. Moreover, as measurement of IFN- γ can be carried out by machines on the next day following the blood draw, more objective results are obtained more quickly than with TST. It is not necessary to consider the booster effect in QFT-2G as PPD is not injected, nor to revisit the doctor. Thus, QFT-2G overcomes the defects of TST described here.

From a clinical trial of QFT-2G in which the subjects were smear-positive, untreated Tb patients and BCG-vaccinated healthy individuals, it has been demonstrated that the specificity and sensitivity of QFT-2G are 98.1% and 89.0%,

respectively, and QFT-2G is an excellent diagnostic method. Furthermore, many contact investigations have shown that QFT-2G detects not only active Tb but also LTBI. Several data indicate that frequency of contact with Tb patients correlates well with QFT-2G positive rates in contact investigations. The validity and usefulness of diagnosing LTBI by QFT-2G have been suggested in other countries.

In many contact investigations, it has been shown that most contacts who had been diagnosed as LTBI based on TST results were QFT-2G negative, suggesting that as a result, many unnecessary chemoprophylaxes were indicated. On the contrary, many QFT-2G positives were identified in those who were diagnosed to be uninfected with Mtb based on TST. Therefore, as the wide spread of QFT-2G testing in contact investigations would prevent unnecessary chemoprophylaxes and detect true infected individuals more accurately, we hope that more effective Tb control could be performed.

Although QFT-2G is an excellent diagnostic method, it is still new, and some questions remain to be answered. For example, the period of converting QFT-2G positive after Mtb infection, alteration of long-term QFT-2G responses after Mtb infection, and the effects of treatment for Tb or LTBI are not fully understood. The behavior of QFT-2G in infants or children is not understood either. Especially in infants, the problem of the blood volume required for the QFT-2G test is the major issue. We are working on these issues to provide more appropriate directions for QFT-2G users, and hope that we can contribute to Tb control.

Key words: Diagnosis of tuberculosis infection, Tuberculin skin test, QuantiFERON[®]TB-2G, Latent tuberculosis infection, Contact investigation

Immunology Division, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to: Nobuyuki Harada, Immunology Division, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: harada@jata.or.jp)