

特異免疫に基づいた結核感染診断法 クオンティフェロン®TB-2G

Specific immune-based diagnostic method of tuberculosis infection,
QuantiFERON® TB-2G

はら だ のぶ ゆき
原 田 登 之
Nobuyuki HARADA

要 旨

結核菌に感染した場合、大多数の人は発症に至らない潜在性結核感染となる。この潜在性結核感染の診断には、従来唯一ツベルクリン反応（ツ反）検査が世界的に使用されてきた。しかし、ツ反に用いる PPD は BCG や非結核性抗酸菌の抗原と高い類似性を持つため、BCG 接種あるいは非結核性抗酸菌感染によってもツ反検査が陽性になる場合がある。この低特異性という欠点のため、BCG 接種が広範に実施されている日本において結核感染診断をツ反で正確に行うことは非常に困難であった。しかし最近、ツ反の持つ欠点を克服する新たな結核感染診断法クオンティフェロン®TB-2G（QFT-2G）が診断試薬として承認された。今後、ツ反に替わり広く普及するものと期待される。

はじめに

結核は世界的に見ると新規登録患者が年間約 800 万人に上り、また死亡者数は年間約 200 万人という、単一の病原体としては依然として人類の第一の脅威である¹⁾。この大半は開発途上国におけるものである。しかし、日本でも新規登録患者数は漸減しているものの、医学的リスクを持った人々や社会経済的弱者への発生の集中、多剤耐性結核²⁾や HIV 感染症合併結核³⁾など、問題は複雑化しており、1997～1999 年のような発生の逆転増加が今後再び起こることもあり得る。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、残りの約 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⁴⁾、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」が起き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⁾、将来の感染源と成り得る。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持っている。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持つためである。したがって、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極めて困難である。低特異性はツ反の持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、等の弱点を持つ。しかし、最近上記のツ反の持つ全ての欠点を一挙に克服し、さらに高い感度・特異度を持

ち合わせた診断法クオンティフェロン®TB-2G (QFT-2G) が開発され、診断試薬として平成 17 年 4 月に承認された。さらに、本年 1 月に保険収載されるに至った。本稿では、QFT-2G で使用されている結核菌抗原、QFT-2G の操作法・特徴、ならびに最新の知見について解説する。

I. Interferon- γ 産生誘導性結核菌 特異抗原の発見

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 secreted antigenic target 6kDa 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⁵⁾。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⁶⁾。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、全ての *M. bovis* BCG 亜株と *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) と *M. africanum* を含む結核菌群、および極一部の非結核性抗酸菌にのみ存在することが判明した (表 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を開発することが可能になった⁷⁾。

II. 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 5mL を 24 ウェル培養プレートの 4 ウェルに 1mL 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℃ で 12～20 時間 (18 時間推奨) 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いけない。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 (図 1)。QFT-2G では、採血の翌日に ELISA 法で 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無い。このように QFT-2G はツ反の低特異性の欠点のみならず、他の全ての問題点を克服し得る診断法であると言える。

III. 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、いく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 既接種健常者 217 名のボランティアの協力を得て治験を行った⁸⁾。図 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、健常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

表 1 抗酸菌類における ESAT-6/CFP-10 の分布

ESAT-6/CFP-10を持つ 抗酸菌類	ESAT-6/CFP-10を持たない 抗酸菌類
Tuberculosis complex <i>M. tuberculosis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i>	BCG substrains Gothenburg Moreau Tice Tokyo Danish
Environmental strains <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. gastri</i>	Glaxo Montreal Pasteur
<i>M. leprae</i>	Environmental strains <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> etc

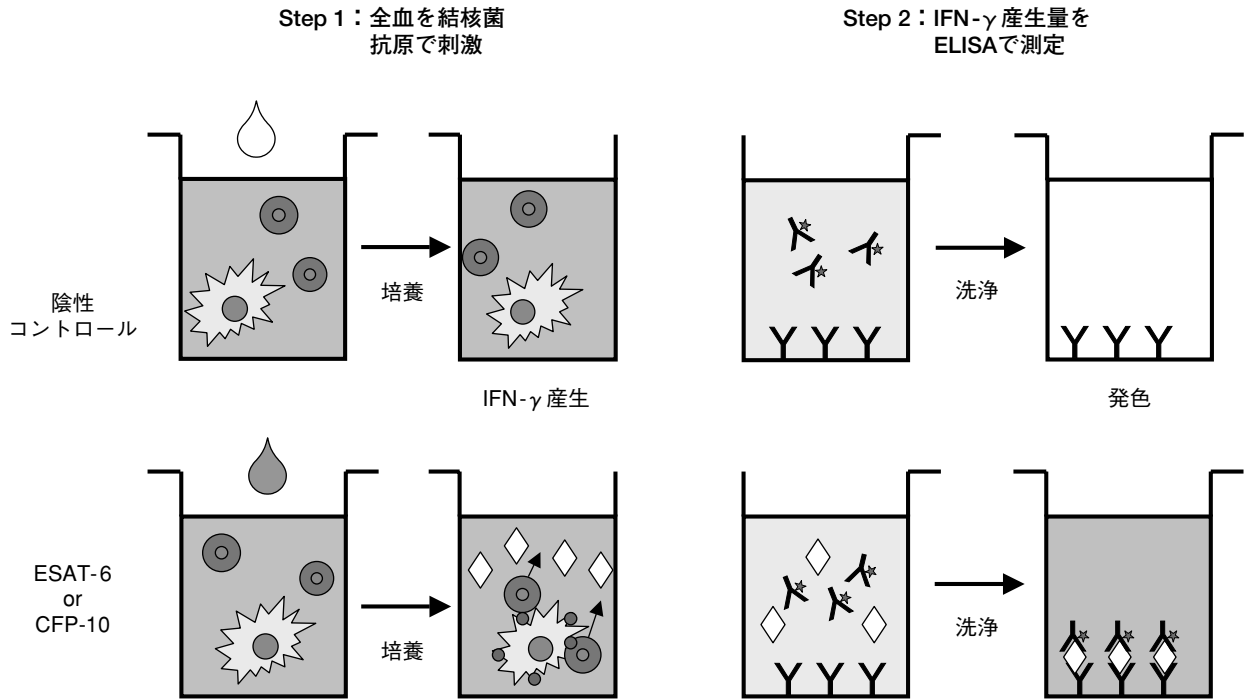


図1 クオンティフェロン®TB-2G のアッセイ法

アッセイ法は2段階からなる。1段階目は、採血後12時間以内にヘパリン採血した全血を各抗原（生理食塩水、ESAT-6、CFP-10、および Mitogen）を添加し、1晩37℃で培養する。2段階目は、翌日培養した検体の上清を回収し、ELISAによりIFN- γ の産生量を測定する。

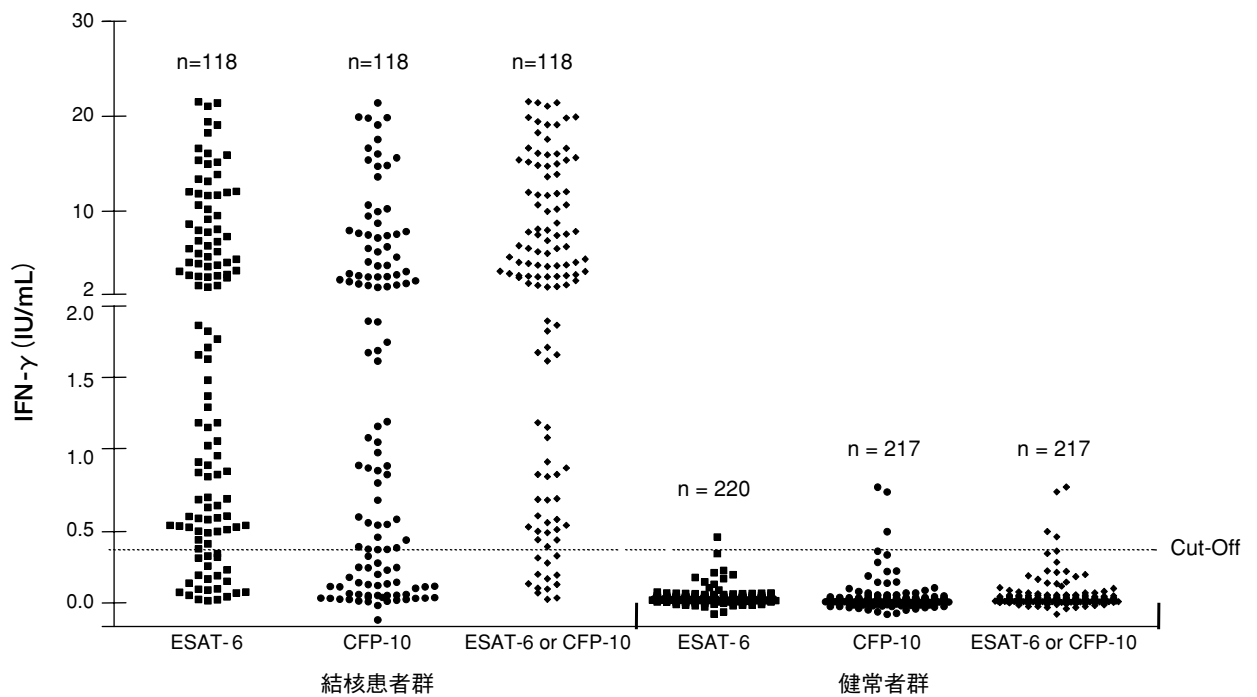


図2 結核患者群と健常者群の ESAT-6 と CFP-10 に対する反応

それぞれの群における各個人の ESAT-6 に対する反応（ESAT-6 特異的 IFN- γ 産生、左のレーン）、CFP-10 に対する反応（CFP-10 特異的 IFN- γ 産生、中央のレーン）、および ESAT-6 あるいは CFP-10 に対する反応の高い方の値をプロットした（右のレーン）。

表2 それぞれのカットオフ値における特異度と感度

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

IFN- γ 産生量 0.05 IU/mL 毎の特異度と感度を、CFP-10 単独の結果（左カラム）、ESAT-6 単独の結果（中央カラム）、および両者のうち高い反応を示した結果（右カラム）に区分し示した。

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（表 2）、結核感染診断法として極めて優れた数値を持つことが示された。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良く診断出来ることが明らかになった。

IV. 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 検査の判定基準に「疑陽性」の概念を導入した⁹⁾。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、多くの接触者健診事例で QFT-2G を適用した経験から証拠が固められてきた。とくに、感染源との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、某中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¹⁰⁾。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%、被濃厚接触群では 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った大学における集団感染事例である¹¹⁾。この事例においては、ツ反赤発径にかかわらず接触者全員に QFT-2G 検査が実施された。濃厚接触群のツ反赤発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 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 50mm、これは活動性結核患者における平均 30mm の分布とは異なるもので、QFT 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赤発 30mm 未満の QFT-2G 陽性者が少なくないことが確認された。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、接触者健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¹²⁾、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インド¹³⁾ 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¹⁴⁾、結核中蔓延国である韓国¹⁵⁾などからもその利用の経験が報告され、いずれも QFT による潜在感染結核の妥当性と有用性を示唆している。

一方、大規模な接触者健診において、従来のツ反による診断法で感染と診断された予防内服対象となった者の大部分が QFT 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。最近、森らにより QFT-2G の検査単価が 5,000 ～ 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が示された¹⁶⁾。このように今後接触者健診に際し、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・効率の良い結核対策ができると考えられる。

おわりに

QFT-2G は開発されて間もないため、今後解決されるべきいくつかの疑問点を持っている。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、とくに乳幼児では現行の最低採血必要量 (5mL) 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。

文 献

- World Health Organization. Tuberculosis fact sheet number 104, 2002 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>)
- Abe, C., Hirano, K., Wada, M., et al.: Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four-line anti-tuberculosis drugs in Japan. *Int J Tuberc Lung Dis.*, **5** : 46-52, 2001.
- 森 亨, 中田 光, 永井英明, 他.: HIV 陽性抗酸菌症の動向と治療のあり方に関する研究. 厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業「日和見感染症の治療に関する研究」. 平成 12 年度研究報告書, 23-30, 2001.
- Comstock, G.W.: Epidemiology of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* **125** (suppl.): 8-16, 1982.
- Andersen, P., Andersen, A.B., Sorensen, A.L., et al.: Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* **154** : 3359-72, 1995.
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., et al.: Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **178** : 1274-82, 1996.
- Andersen, P., Munk, M.E., Pollock, J.M., et al.: Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* **356** : 1099-104, 2000.
- 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.* **170** : 59-64, 2004.
- 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 QFT-2G の基礎的検討. *結核*, **79** : 725-35, 2004.
- 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*, **79** : 637-43, 2004.
- 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 QFT-2G の有用性の検討. *結核*, **80** : 527-34, 2005.
- Brock, I., Welding, K., Lillebaek, T., et al.: Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med.* **170** : 65-9, 2004.
- Pai, M., Gokhale, 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.* **293** : 2746-55, 2005.
- 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.* **172** : 631-5, 2005.
- Kang, Y.A., Lee, H.W., Yoon, H.I., 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.* **293** : 2756-61, 2005.
- 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*, **80** : 675-86, 2005.