

# クオンティフェロン<sup>®</sup> TB-2Gの使用指針

平成18年5月

日本結核病学会予防委員会

結核感染の診断を既往のBCG接種の影響を受けずに行うことができる新たな技術クオンティフェロン<sup>®</sup>TB-2G (Cellestis社, オーストラリア, 以下QFTと略)が開発され, 日本でも2005年4月に体外診断薬として使用が承認され, ついで2006年1月には健康保険にも採用されることになった。この検査法は, 日本のようにBCG接種に熱心に取り組んできたためにツベルクリン反応検査 (以下, ツ反) の診断価値が下がっているような国にはとりわけ大きな有用性が期待される。しかし, その検査特性はいろいろな点でいまだ十分に確立されておらず, 当面は慎重にこれを利用していかたわら, 研究の推進を目指すことが重要と考える。本委員会はこのような観点に立ってその使用指針を以下のように策定した。

## 1. QFTの原理と検査実施方法, および精度管理

結核を発病していない人において, 結核菌に感染したことを検出する方法としてはコッホの時代からツ反がもっぱら用いられてきた。これは結核菌由来の多くの蛋白混合物であるPPDを皮内に投与し, そこで起こる特異的な細胞性免疫反応を核とする遅延型アレルギー反応を, 皮膚の発赤や硬結といった局所的な反応としてとらえ, 定量化する方法である。この方法はBCG未接種者においては感度, 特異度ともに高く基本的には優れた方法であるが, BCG接種を受けた人においては, 現れる反応が過去のBCG接種によるものか, 最近受けた結核感染によるものが区別できないという大きな問題があった。それは, ツ反に用いるPPDの成分の多くはBCGにも含まれており, BCG接種を受けた人はPPD中の結核菌由来抗原成分とも反応することに起因している。

QFTでは結核菌に特異的なESAT-6<sup>1)</sup>(1995年に発見), CFP-10<sup>2)</sup>(同1998年)という蛋白を抗原とし, これらを全血に添加して, 血液中のエフェクターTリンパ球(感作白血球)を刺激し, その結果放出されるインターフェロン $\gamma$ (以下IFN- $\gamma$ )を定量する。実際のQFT検査においては, 刺激抗原はこれらの蛋白そのものでなく,

各々の蛋白を構成する重複合成ポリペプチドの抗原性の強い部分をいくつか確認し(ESAT-6では7個, CFP-10では6個), それを混合して用いている。またIFN- $\gamma$ の定量は, サンドイッチ免疫酵素法(ELISA)で行う。

なお, これらの特異蛋白は結核菌群に含まれるすべての*Mycobacterium tuberculosis*株, 病原性*M. bovis*株および*M. africanum*から分泌される。同様に一般的に遭遇する非結核性抗酸菌のうち*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. flavescens*, *M. gastri*およびハンセン病の原因菌である*M. leprae*からも分泌される。一方, すべての*M. bovis* BCGワクチン亜株をはじめ, 日本における非結核性抗酸菌症中もっとも多い原因菌種である*M. avium*, *M. intracellulare*には存在しない。

実際の検査方法を略記する。QFTは, (1)全血を特異抗原で刺激し, IFN- $\gamma$ を放出させ, (2)血漿中に放出されたIFN- $\gamma$ をELISAで定量, という2段階から成っている。これをさらに細かく見ると以下ようになる。

①被験者から静脈血を5 mLヘパリン採血し, これを1 mLずつ培養プレートの4つのウェルに分注し, それぞれにESAT-6抗原, CFP-10抗原, 陰性コントロールの生理食塩水, 陽性コントロールのマイトジェン(PHA)溶液を滴下する。これは採血後12時間以内に行わなければならない。刺激抗原添加後, よく混合した培養プレートを37°C加湿機能付き孵卵器に静置し, 12~20時間(18時間を推奨)培養する。

②培養プレートの各ウェルからマイクロピペットで上清を静かに吸い上げ, その50  $\mu$ Lをサンドイッチ法ELISAキットのストリップに添加する。

③キットのストリップ中で, 添加した被験者培養上清とHRP標識抗ヒトIFN- $\gamma$ 抗体を120分間(22 $\pm$ 5°C)反応させた後, ストリップをよく洗浄する。

④発色試薬を100  $\mu$ L添加し, 遮光し厳密に30分間反応させる。

⑤停止液50  $\mu$ Lを添加後, 5分以内に吸光度(測定フィルター450 nmと, レファレンスフィルターとして620 nmまたは650 nmのどちらか一方を組み合わせて, 2種類を必ず使用する)を測定する。

⑥測定した吸光度データは Cellestis社の解析ソフトを使用し IFN- $\gamma$ 濃度に変換する。

具体的にはメーカーの提供する取扱説明書に従う。

これらの手順のすべての段階で、特に正確な標準 IFN- $\gamma$ 血清の希釈系列作製とストリップの洗浄操作、および発色反応（厳密に30分遵守）の段階は測定値のばらつきが生じやすいので注意が必要である。初めてこの検査技術を導入するときには経験のある検査施設との比較対照を行うべきである。

## 2. 判定基準とその考え方

上記1で見たように1人の被験者検体について、4個の IFN- $\gamma$ 値が得られる。つまり特異抗原 (ESAT-6, CFP-10)で刺激されたもの(それぞれ IFN<sub>E</sub>, IFN<sub>C</sub>)、生理食塩水添加に対するもの(無刺激の状態, バックグラウンド, 陰性対照 IFN<sub>N</sub>)、マイトジェン刺激に対するもの(非特異的な刺激に対する個体の最大限の細胞性免疫反応によるもので QFTの判定が可能か不可かの参考, 陽性対照 IFN<sub>M</sub>)である。特異抗原およびマイトジェンに対する IFN- $\gamma$ 放出量は、上記の測定値から陰性対照の値を差し引いたもの (IFN<sub>E</sub>-IFN<sub>N</sub>, IFN<sub>C</sub>-IFN<sub>N</sub>, IFN<sub>M</sub>-IFN<sub>N</sub>)とする。

判定のための基準値(カットオフ)の決定は、既感染者(治療前の結核患者で代用)、未感染者(結核曝露歴のない看護学生で代用、3項参照)における IFN- $\gamma$ 測定値の分布から、その基準値に対応する偽の陽性と偽の陰性の比率が至適になる値に設定する。これは ESAT-6, CFP-10の各々について独立に設定されるが、上のように基準値としては両者同じ0.35 IU/mLとされている。これから、これらの抗原の少なくとも一方に対してこの基準値あるいはそれを超える応答値のある場合に「陽性」と判定する(表参照)。

なお、この陽性基準とは別に0.10 IU/mLを「判定保留(疑陽性)」基準として設定することを推奨する。これは、あらかじめ状況証拠などから感染を受けている確率

が大きい被験者において、測定値が0.35 IU/mLには達しないがこの値あるいはそれを超える場合には、「既感染」として対応することが望ましいことに即して設定するものである<sup>3)</sup>。

このような二様の基準の設定は、すべての定量的検査の判定基準と同様、絶対的・普遍的なものでなく、どの基準値を用いてもそれによる見逃し、読み過ぎは完全には避けられず、その程度は検査対象の有病(既感染)の確率に依存することを基礎としている。なお (IFN<sub>E</sub>-IFN<sub>N</sub>)あるいは (IFN<sub>C</sub>-IFN<sub>N</sub>)が0.35 IU/mLを超えない場合で、同時に測定される陽性対照 (IFN<sub>M</sub>-IFN<sub>N</sub>)の値が0.5 IU/mL未満であれば、細胞性免疫応答が脆弱化しているものとし、特異的免疫応答による測定値には信頼性がないとして、成績は「判定不可」となる。

結果の報告には、上のような基準に基づき、「陽性」、「判定保留」、「陰性」の区分、および「判定不可」とともに、それらの根拠となる上記の4個の測定値を添えて記載される。

米国では陰性対照(生理食塩水添加のもとでの応答)の測定値が0.7 IU/mL以上でかつ特異抗原への応答値がその50%以下の場合にも、バックグラウンド値が高すぎるため「判定不可」として扱われる<sup>4)</sup>。日本ではこの条件は本検査法の承認条件に含まれておらず、製品の説明書にも記載されていないが、参考にすべきである。

QFTの適応年齢は十分な知見が今のところないので、5歳以下の小児についてはこの判定基準は適用されない。また12歳未満の小児については、全般に応答は成人よりも低めに出ることを念頭に結果を慎重に解釈する必要がある。

## 3. QFTの検査特性

### 3.1 感度

結核菌感染を規定する絶対基準(Gold standard)は存在しない。そのため代理マーカーとしてまず細菌学的に証明された活動性結核で未治療の状態を採り上げ、これ

表 測定結果の判定

(IFN <sub>E</sub> -IFN <sub>N</sub> ) あるいは (IFN <sub>C</sub> -IFN <sub>N</sub> )	判定	解釈
0.35 IU/mL 以上	陽性	結核感染を疑う
0.1 IU/mL 以上～0.35 IU/mL 未満	判定保留	感染リスクの度合いを考慮し、総合的に判定する
0.1 IU/mL 未満	陰性	結核感染していない*

注：(IFN<sub>E</sub>-IFN<sub>N</sub>)および (IFN<sub>C</sub>-IFN<sub>N</sub>)が共に0.35 IU/mL未満であっても、(IFN<sub>M</sub>-IFN<sub>N</sub>)の値が0.5 IU/mL未満の場合は「判定不可」とする。

\*ただし、免疫抑制状態の人においては、QFTの結果が陰性だけでは結核菌感染を否定するには十分ではない。他の臨床結果と合わせて総合的に診断すること。また、陰性の結果であっても潜在結核感染の可能性が高い人、あるいは結核を発病すると重症化したり、予後が不良となるおそれのある人においては、治療ないし病気に関する綿密な経過観察が必要である(例：5歳未満の小児、HIV感染のある者、TNF $\alpha$ 拮抗剤治療を受けようとする者、等)。

らの患者における陽性率(すなわち感度)を見た分析結果がいくつかある。Moriら<sup>5)</sup>は日本のいくつかの施設に入院後、治療開始1週間以内の患者119人(年齢13歳～86歳、平均は54歳、66%が男性)についてみた。QFT陽性率は89.0%(95%信頼区間81.9%～94.0%)であった。同様な治験を行ったCDCの成績<sup>6)</sup>では、QFT陽性率は23人の未治療結核患者で91%(95%信頼区間73%～98%、ツ反では79%)であった。

デンマークで行った初期の小規模な試験(方法は日本のQFTと少し異なる)では結核患者(1週間以上の治療を受けていない)18人における陽性率は72%(95%信頼区間49%～88%)であった<sup>7)</sup>。おなじくデンマークで48名の活動性結核に対する本検査の感度は85%(95%信頼区間75%～96%)であった。肺外結核患者では92%(12/13)がQFT検査陽性であった<sup>8)</sup>。韓国では54人の未治療結核患者(細菌学的あるいは組織学的に確認)についてみたところ、陽性率は81%(95%信頼区間69%～90%、ツ反では78%)であった<sup>9)</sup>。

このような成績を総合すれば、菌陽性未治療結核患者からみたQFTの感度は80%～90%程度といえよう。これは対象者の年齢、病状などによって変わる可能性がある。個々の要因に関する十分な観察は未だ行われていないが、ツ反と同様、細胞性免疫抑制状態においては様々な程度に応答が低下すると考えられる。

QFTが発病前の感染初期ないし潜在結核感染をどのように反映するかは最も切実な問題であるが、以下のような間接的証拠が観察されている。

集団感染発生事例での接触者集団に対してQFTを行ったところ、陽性率は濃厚接触群で45.5%、非濃厚接触群で7.1%という感染源との接触の濃さの違いに応じた明確な陽性率の差が得られた<sup>10)</sup>。別の事例においても、濃厚接触者の陽性率は33%、非濃厚接触者では0.7%であり、陽性者のツ反の分布は、非濃厚接触者とは明らかに異なる、平均45 mm前後の典型的な正規分布を示した<sup>11)</sup>。さらに、最近の大規模な集団感染事例でも同様であった<sup>12)</sup>。この陽性者の集団はひとつのまとまった感染曝露を受けた結果を反映していると思われることができる。

デンマークの集団感染事例<sup>13)</sup>で、BCG未接種の濃厚接触者45人についてみたツ反とQFT判定の一致は $\kappa = 0.87$ と非常に高く(非濃厚接触者を含む全体85人についても $\kappa = 0.87$ )、BCG未接種の集団ではこの診断がツ反をよく反映していることを示している。日本の結核病棟をもつ総合病院の職員でQFTを観察したところ、陽性率は年齢、結核病棟勤務歴、外来勤務歴と相関した<sup>14)</sup>。これらもQFT陽性が潜在結核感染リスクを反映することを支持する。

### 3.2 特異度

結核感染を受けていないことについても絶対基準は存在しない。ただしこの場合には昨今の結核低蔓延を考慮すると、明らかな結核感染曝露の機会のない若者は事実上未感染と考えられる。Moriら<sup>5)</sup>は日本のいくつかの看護学生のボランティアにツ反とともにQFTを行った。被験者216人の平均年齢は20歳、93%が女性で、大半が1回以上のBCG接種歴をもっていた。QFT陽性率は1.9%(95%信頼区間0.5%～4.7%)であった。つまりこの群に結核感染が全くないと仮定すれば、QFTの特異度は98%となる。仮に最近の20歳の既感染率を1%と推定し、既感染者の89%がQFT陽性になると仮定すると(以下の観察により)、真の特異度は99%となる。米国の観察<sup>6)</sup>では、BCG未接種の健常者573人においてQFT陰性率は99.8%であった(ツ反では99.1%)。

これらはいずれもQFTの特異度がきわめて高い(100%に近い)ことを示している。

### 4. 実際の応用

日本では当面この検査は以下のような場合において、記載するような方法で利用されることが望ましいと考えられる。なお、5歳以下の幼児については現在のところ妥当な判定基準が確立されていないため、この検査は推奨しない。

#### 4.1 接触者健診

これまで接触者健診の中でツ反検査を行うとされてきた状況<sup>15)</sup>、つまり結核患者が発生し、その接触者に感染が疑われる場合(とくに初発患者が喀痰塗抹陽性の肺結核患者の場合)にはこの検査をツ反検査に代わって行うことが望ましい。

ただし、集団感染が疑われるような場合で、対象者が多数にわたるときには、経費や検査の省力を考慮して、まずツ反検査をし、対象を限定してQFTを行うことも考えられる。この場合にはツ反検査で発赤10 mm以上(あるいは硬結5 mm以上)に行うことを原則とする。場合によっては、まず発赤20 mm以上(あるいは硬結10 mm以上)の者にQFTを行い、QFT陽性率が明らかに高い(年齢に対して予測される推定既感染率<sup>16)</sup>よりも有意に高い)場合には発赤10 mm以上(あるいは硬結5 mm以上)などに枠を拡大するような方式も考えられる。

感染曝露後QFTが陽転するまでの期間(細胞性免疫反応が検出できるまで)についての詳細な観察は未だ行われていない。しかし同じ結核感染に関して見る、ツ反のツベルクリンアレルギー発現の時期で代用すると、8～10週間とする考え方が合理的であろう。そこで原則としてQFT検査は最終接触後8週間後に検査するものとし、曝露期間が長いとか、既に二次患者が発生している

ような場合、あるいは対象者が免疫抑制状態にあるような場合には、初発患者発生直後でも QFT 検査を行い、陰性であればその後 8 週間後に再度 QFT 検査を行う。

この検査の結果が陽性であれば結核発病について精査を行い、発病が否定されれば潜在結核感染症の治療を行う。なお、集団的に検査をして陽性率が高い場合（年齢から予想される推定既感染率よりも）には、「判定保留」者も既感染として扱うことが望まれる。この検査で陰性であれば、その後の追跡は原則として不要である。ただし陰性であっても潜在結核感染の可能性の大きい場合（所属集団の陽性率が高いとか、既に多くの二次発病患者があるとかの場合）は経過観察をしてもよい。

なお、成人では陽性でも最近の感染とはいえない可能性があり<sup>17)</sup>、潜在結核感染に関する解釈は慎重に行う。

#### 4.2 医療関係者の結核管理

職業上、結核感染の曝露の機会が予想される職場に就職・配属される職員について現在は二段階ツ反検査と、患者接触時のツ反検査が勧奨されてきたが、今後はツ反検査を廃止して QFT を行うべきである。この検査で陰性の者が、不用意に結核感染に曝露された場合には QFT 検査を行い、陽性者に化学予防を行う。

二段階ツ反は不正確であり、またブースター現象を免れない。QFT にはそれらの問題はない。

#### 4.3 臨床

まず結核発病リスク者に対する化学予防の適応の決定に用いる。例えば糖尿病患者、副腎皮質ホルモン剤や TNF  $\alpha$  阻害剤使用患者などについてである。なお、成人とくに 50 歳以上の場合には、感染を受けてから長期間経過していることが多く、そのような場合には QFT 検査はしばしば陰性にでる<sup>17)</sup>。このようなときには結核発病のリスクが QFT 陽性の場合と比べてどうかはまだよく知られていない。したがって QFT 陰性を理由に感染を否定することには慎重でなければならない。

QFT は結核の補助診断としても有用である。細菌学的な確証はないが、胸部 X 線所見や臓器の所見から結核性の疾患が考えられるとき、QFT 陽性であれば結核感染が支持される。また結核以外の病気との鑑別にも参考となる。QFT 陰性であれば、結核を否定できる可能性は大きい。これはツ反と同じであるが、ツ反よりも特異度が高いので、このような除外診断の有用性は遥かに大きい。なお、日本における非結核性抗酸菌の最重要の原因菌である MAC 感染（結核感染が併存しないとき）では QFT 検査は陽性にならないこともその有用性を大きくする。なお、本検査を根拠として活動性結核を診断することはできない。あくまでも補助診断として、傍証として利用されるべきであることを重ねて言明する。

#### 5. 今後の課題

QFT が広く普及し、有用性を発揮するためには以下のような問題が残されている。

- ① 潜在結核感染診断上の感度のより正確な確認、またそれに関連して、感染曝露から QFT 陽転までの期間の観察、陽転後の QFT 応答の時間的消長（年～数十年の経過で応答がかなり減弱することは確実である）、治療の影響（一般に応答は低下するらしい）、また感度をさらに上げるための更なる新たな抗原の追加、など。
- ② QFT 応答の程度とその後の結核発病リスクとの関連、同様に ESAT-6 と CFP-10、あるいはさらに他の特異抗原に対する応答が反映するものの違いの有無や内容など。
- ③ 小児における QFT 検査の妥当性や診断基準の設定等々。
- ④ 免疫抑制宿主、あるいは広くその他の宿主要因との QFT 応答の関連。
- ⑤ 採血量節減（とくに小児において）の可能性、採血後処理までの時間（採血後 12 時間以内の処理の必要性）の問題。後者については日本では現在「QFT 第三世代」という新方式の治験が行われており、一つの解決策となることが期待される。

#### [文 献]

- 1) 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.
- 2) Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al.: A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology.* 1998; 144 (Pt 11): 3195-3023.
- 3) 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<sup>®</sup> TB-2G の基礎的検討. *結核.* 2004; 79: 725-735.
- 4) Mazurek GH, LoBue P, Iademarco MF, et al.: Guidelines for using the QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR.* 2005; 54 (RR15): 49-55.
- 5) 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.
- 6) Mazurek GH: インターフェロン  $\gamma$  アッセイを用いた結核感染の検出. 平成 16 年度国際結核セミナー. 2005 年 3 月 (東京).
- 7) Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, et al.: Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CEP-10. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001; 5: 462-467.

- 8) Ravn P, Munk ME, Andersen AB, et al.: Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol. 2005 ; 12 : 491-496.
- 9) 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.
- 10) 原田登之, 森 亨, 宍戸眞司, 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.
- 11) 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.
- 12) 深沢啓治: 中野区内の学習塾における結核集団感染. 東京都中野区保健所資料. 2005年12月15日.
- 13) Brock I, 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.
- 14) 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 (In press).
- 15) 森 亨 (監修): 保健所における結核対策強化の手引き. 結核予防会, 2002.
- 16) 森 亨: 結核. 総合臨床. 2003 ; 52 (増刊) : 1260-1266.
- 17) 森 亨, 原田登之, 樋口一恵, 他: 日本の一般住民集団における結核感染の実態—QuantiFERON-Goldによる感染診断の試み—. 結核. 2004 ; 79 : 197.

## 日本結核病学会予防委員会

委員長	鈴木 公典				
副委員長	高松 勇				
委員	片岡 賢治	佐藤 牧人	長谷川直樹	吉山 崇	
	辻 博	藤岡 正信	沖本 二郎	渡辺憲太朗	
委員長推薦委員	原田 登之	森 亨			