

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

原田 登之 森 亨 宍戸 眞司 樋口 一恵
関谷 幸江

要旨：〔目的〕結核接触者健診における結核感染診断の目的のために、結核菌特異抗原（ESAT-6およびCFP-10）を用いた全血インターフェロン γ 応答を定量する方法（QuantiFERON[®]TB-2G）がどのように有効であるかを検討するために本研究を行った。〔対象と方法〕ある若年者集団（専門学校生）における結核患者の発生に際して、ツ反とともに本法を適用し、その知見をツ反と比較分析した。〔結果〕初発患者との接触が濃厚な群とそれ以外の接触者とでは本法の陽性率に大きな差が見られたが、ツ反では違いはわずかで、本法がBCG接種の影響を受けずに結核感染診断が正確に行えることを示唆していた。〔結論〕ツベルクリン反応検査との比較から、この方法は従来のツベルクリン反応検査とその便宜的な診断基準による方法で回避できない不必要に過剰な化学予防の指示を大幅に節減し、また適用方法を工夫することによって必要な対象者を最大限補足することが可能になると考えられる。いっそう信頼性のある方法として広範に利用できるものとなるために克服すべきいくつかの課題が残されているものの、この方法は今後の結核対策のなかで重要な手段のひとつとなるであろう。

キーワード：集団感染、結核感染、ツベルクリン反応、全血インターフェロン γ 応答測定法、予防内服

緒 言

結核感染の頻度が低下しているのに逆比例して、若年者を中心に結核の集団感染（集団発生）のリスクは大きくなっている。厚生労働省の資料¹⁾によれば2000年から2004年の初めまでの期間に同省に報告された集団感染事例170件のうち60%は学校および若者の多い事業所で起こっていた。このような事例では感染を受け未だ結核を発病していない者が多かれ少なかれ発見されるが、そのような者に対しては化学予防を行い、将来の発病の危険性を下げることが必要である。しかし日本のようにBCG接種が広範に行われている国においては、ツベルクリン反応検査（以下、ツ反）による正確な結核感染の診断は困難である。これに対して日本では、「BCG接種によるツ反反応は、確率的に結核感染によるものよりも弱い」ということを前提に、かなり便宜的な判定基準を設

け²⁾、さらに過去の反応との比較やBCG癩痕の状況、被験者が集団構成員であれば集団全体のツ反の状況など、といった「状況証拠」も考慮に入れた総合的な判断を行ってきた³⁾。しかしこの方法はかなりの過不足（不必要な化学予防指示と必要な人の看過）を免れない。BCG接種の予防効果と引き替えに、われわれはこのような不都合に甘んじてきたが、同時にBCG既接種の影響を受けない正確な結核診断技術の開発はわれわれが長年希求してきたところである。

近年の技術革新により末梢血免疫細胞の特異抗原刺激に対するインターフェロン γ 応答を定量することが可能になり、その簡易キット（QuantiFERON[®]-TB, Cellestis社、オーストラリア）が開発された⁴⁾。さらにこれに結核菌特異抗原としてESAT-6、CFP-10というタンパクを使用することにより上記の課題がようやく解決に向かいつつある⁵⁾。われわれはこの方法（QuantiFERON[®]TB-2G、同

上；以下 QFT と略記) をある集団感染事例に応用する機会を得たので、その知見について検討を加えて報告する。

対象と方法

(1) 集団発生事例の概要

某中都市でそろばん塾・カラオケ教室を経営し、さらに経理関係の専門学校で講師をしていた男性 A 氏 (57 歳) が発端患者である。A 氏は 2002 年 11 月初旬より風邪様症状を発症していたが、12 月 24 日受診して結核 (ガフキー 9 号, 学会病型 bⅢ2) と診断され、入院した。A 氏は結核の既往はなく、1999 年 4 月に近医で胸部 X 線撮影を受け、異常なしといわれたが、その後は健診等を受けていない。家族以外の接触者は専門学校生 300 人 (年齢 18 歳～25 歳)、職員 38 人のほか、そろばん教室生徒 57 人 (5 歳～12 歳)、カラオケ教室生徒などであった。とくに専門学校生のうち、73 人は 2002 年 11 月 30 日から 12 月 5 日にかけて A 氏と共にハワイへの修学旅行に参加していた。

1 月 27 日専門学校生の B 氏 (18 歳, 女性) が気胸を発症、つづいて喀痰結核菌 PCR 陽性と診断された。ついで接触者健診の結果、ハワイ旅行に参加した専門学校生 C 氏 (20 歳, 男性) が 2 月 3 日に活動性結核 (rⅢ1) と診断された。

接触者に対して行った健診 (ツ反, X 線検査, およびツ反歴) および本研究で行った QFT の成績を参考として合計 23 人 (専門学校生 18 人, そろばん教室生徒 5 人) に化学予防が指示された。その後 2004 年 7 月現在まで患者発生は報告されていない。

(2) QFT による検査法

QFT の原理や方法の詳細は他⁵⁾⁶⁾に譲り、ここでは要点のみを記述する。被験者から静脈血を 5 ml ヘパリン採血し、採血後概ね 12 時間以内にその一定量に抗原 (ESAT-6, CFP-10; 実際はそれぞれの合成ペプチドのプール)、および陰性対照用生理食塩水、陽性対照として

PHA をそれぞれ作用させて、免疫細胞からインターフェロン γ (以下 IFN- γ) を産生させる。37°C で 16～24 時間静置培養した上清をとり、含まれた IFN- γ を、QFT キットを用いて、規定の使用法に従って測定した。測定されたそれぞれの抗原刺激による IFN- γ 計測値から陰性対照での計測値を差し引いた値を、対応する実効放出量として、いずれかの抗原での放出量が 0.35 IU/ml 以上のもを「陽性」と定義した。このカットオフについては別に論じた⁷⁾。

(3) ツ反・QFT の対象・方法

ツ反は日本の現行の制度上化学予防の対象となる 30 歳未満の接触者である、そろばん教室および専門学校生と定め、通常の方法で実施した。判定は医師が発赤長径および硬結横径を測定した。二重発赤の有無、水疱等のいわゆる副反応の有無も記載した。本研究では専門学校生を QFT 試験の観察対象としたので、以下この群のみについて記述する。

QFT は原則としてツ反で発赤長径が 30 mm を超える者を対象とした。QFT の実施に先立ち、定期外健診を担当する職員から本人または保護者に対して説明を行い、承諾をとった。

(4) 分析

ESAT-6, CFP-10 による実効 IFN- γ 放出量にもとづいて各被験者は陽性と陰性に判別されるが、各放出量の分布を検討する場合はその値を対数変換したものをを用いた。この際、元の値が 0 または負の場合には、仮に元の値が仮定的に 0.005 として集計・解析を進めた。

成 績

(1) ツ反の結果

専門学校生 270 人について行われたツ反発赤径の分布は Fig. 1 に示すとおりである。やはり右方に長く裾を引く正規分布に近似した分布で、明らかな二峰性は認めない。平均値は 25.8 mm (標準偏差 16.1 mm) であり、発赤

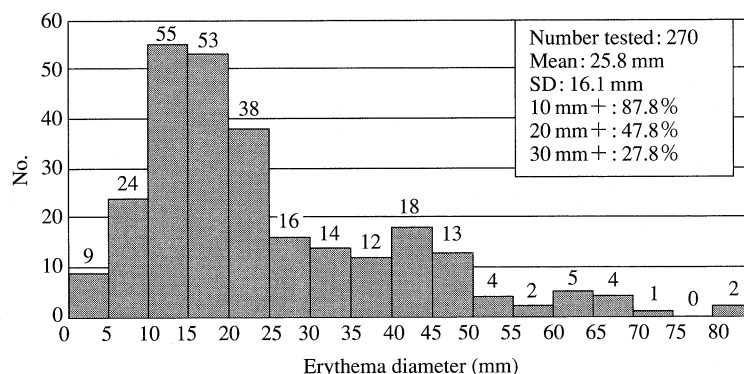


Fig. 1 Distribution of contacts by erythema size of tuberculin skin test (college students)

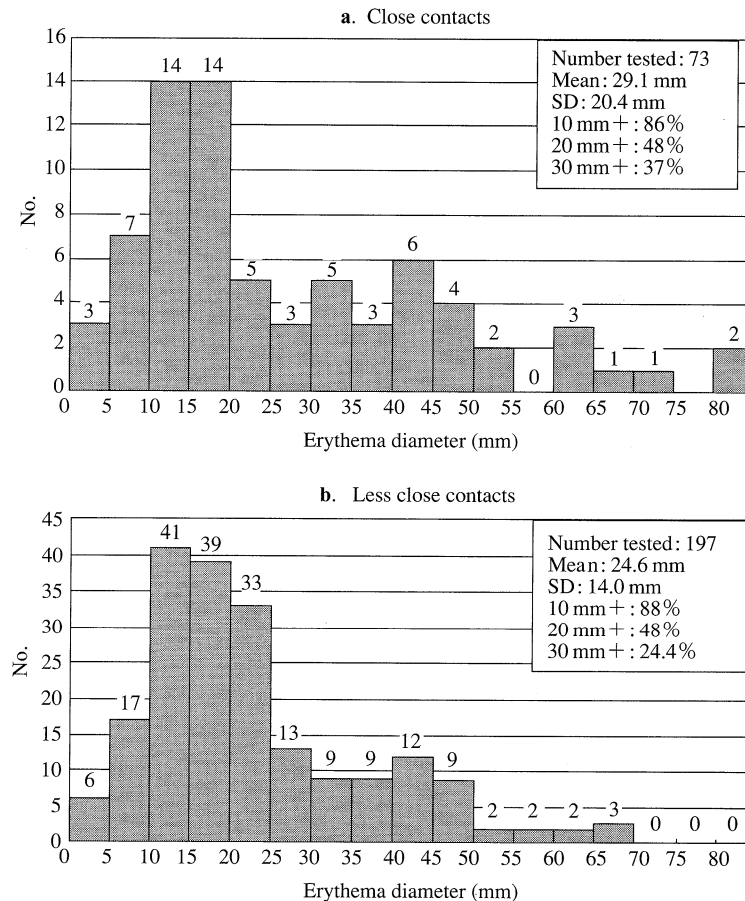


Fig. 2 Distribution of close and less close contacts according to erythema size of tuberculin skin test (college students)

Note: "Close contacts" include those who joined the excursion to Hawaii islands with the index case during 5 days, and thus considered to have been in closer contact with the infection source than "Less close contacts".

10 mm以上が87.8%, 20 mm以上47.8%, 30 mm以上が27.8%であった。平均年齢は19.7歳(標準偏差は1.8歳)であった。

この群をハワイ修学旅行への参加の有無によって二分し(それぞれ濃厚接触群, 非濃厚接触群と呼ぶ), ツ反発赤分布を比較したのがFig. 2である。ヒストグラムを比較すると, 両群はよく似ているが, ハワイ群(a. Close contacts)では非ハワイ群(b. Less close contacts)に比して右方の裾が厚くみえ, かすかながら二峰性とみることできる。平均値は有意に前者で大きい(両側検定の $t=0.0407$, $p=0.041$)。30 mm以上に達する反応の頻度も37.0%対24.4%で, 有意に前者で多い(非濃厚接触群を基準としたOdds比=1.82, カイ自乗の $p=0.040$)。

(2) QFTの結果

QFT分析は75人に対して行われた。いずれもツ反発検査のうち発赤径30 mm以上の者である。これら両群のIFN- γ 産生量の分布をESAT-6, CFP-10について見

たのがFig. 3である。IFN- γ の分布は対数正規分布をするので, 元の値の自然対数変換を行っている。濃厚接触群の分布は明らかに二峰性であり, 対数値-2(真数で0.14 IU/ml)近傍がantimodeとなっている。一方非濃厚接触者では分布はやや不規則な指数関数型の分布で右肩下がりである。0.35 IU/mlを基準として陽性率を見るとTableのようになる。

(3) IFN- γ とツ反の相関

Fig. 4はIFN- γ (対数変換済み)とツ反発赤径の相関を示す。ツ反発赤径30 mm以上の者のみについてのQFT応答であるが, 両者の間にはESAT-6, CFP-10のいずれも弱い相関がみられる(相関係数はそれぞれ0.387, 0.207; 無相関の検定の p 値は0.000, 0.074)。相関係数の自乗値(決定係数)はそれぞれ0.15, 0.04で, ツ反発赤の変動の15%, 4%だけがこれらの抗原への応答に依存するということになる。

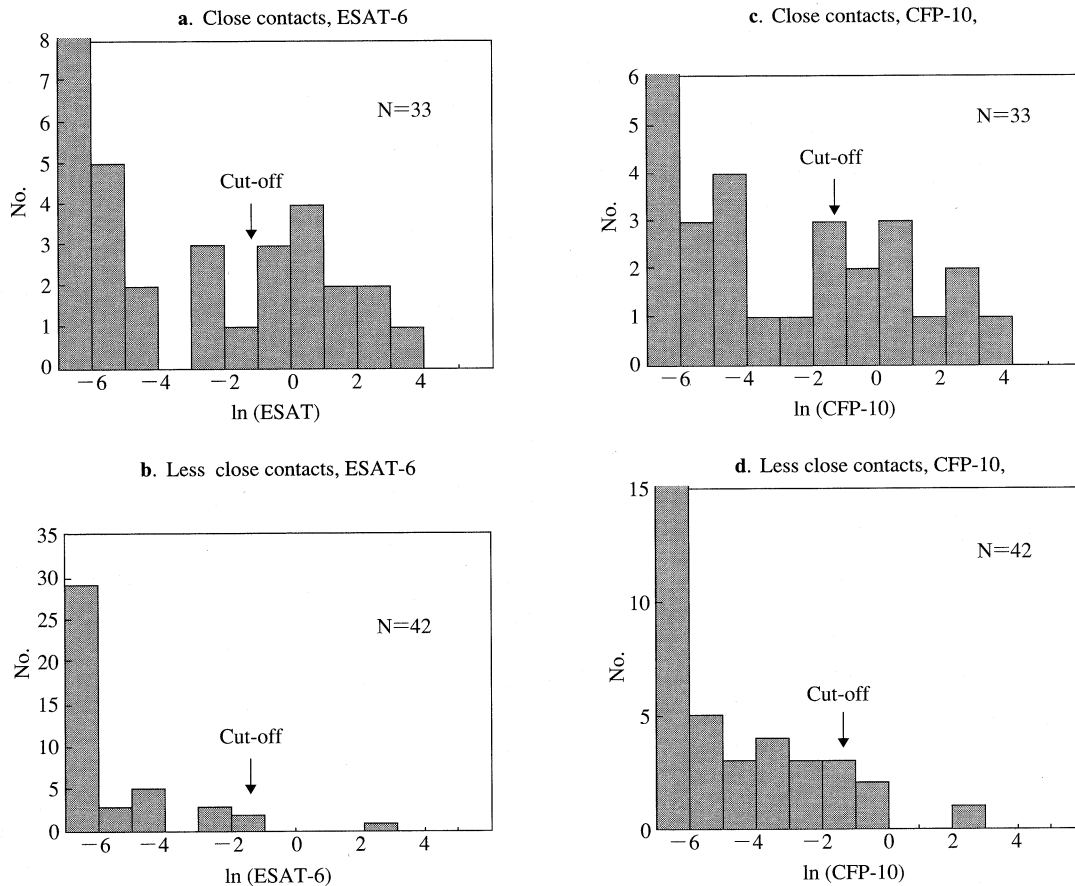


Fig. 3 Distribution of subjects according to log-transformed values of IFN- γ (close vs less close contacts)

Table QFT positivity among close contacts and less close contacts, Cut-off = 0.35

	Close contacts			Less close contacts			Comparison*	
	Tested	Positive	(%)	Tested	Positive	(%)	OR	p-value
ESAT-6		12	36.4		1	2.4	24.0	0.000
CFP-10	33	9	27.3	42	3	7.1	4.9	0.041
Either		15	45.5		3	7.1	12.8	0.000

*OR: Odds ratio. P-values are based on Chi-square test with Yates correction.

考 察

著者らは先に QFT の結核感染の診断における特性について感度 89.0%, 特異度 98.1% という知見を得た⁶⁾。ただその感度については、目標とする (潜在的) 結核感染の代理指標として菌陽性肺結核 (治療開始前の) を用いたもので、感染して未だ発病していない状態において QFT がどのようなパフォーマンスを示すかを見たものではない。今回は比較的規模の大きい集団感染、しかも集団を感染曝露の濃淡の差で二分しうる状況でこの検査の所見を吟味したもので、間接的ながら潜在感染における特性についてより詳細に検討することができた。

対象となった専門学校生の集団は年齢が比較的均質な若者で構成されており、初発患者の症状出現からほぼ 2

カ月間接触があり、その一部は特に濃厚な接触関係 (1 週間のハワイ旅行に同行) を持っていた (ただし続発例がこの申告による症状出現時期から 2 カ月で発病していることから、初発患者の発病時期はこれよりさらに以前だった可能性もあり、真の接触期間はもっと長かったかもしれない)。これによって分けられた濃厚接触、非濃厚接触両群から活動性結核患者が続発しており、集団感染は何らかの程度で起こっていることは十分考えられた。そして、従来の接触者健診で行われるツ反検査の成績 (濃厚接触群と非濃厚接触群の比較) において、前者でやや強い反応が見られることから、集団感染の存在がさらに疑われた。従来であれば、便宜的に設定されている「30 mm 以上 (いわゆる強反応)」を「潜在感染」の基準として用い、全接触者中から 75 人 (28%) に対して化

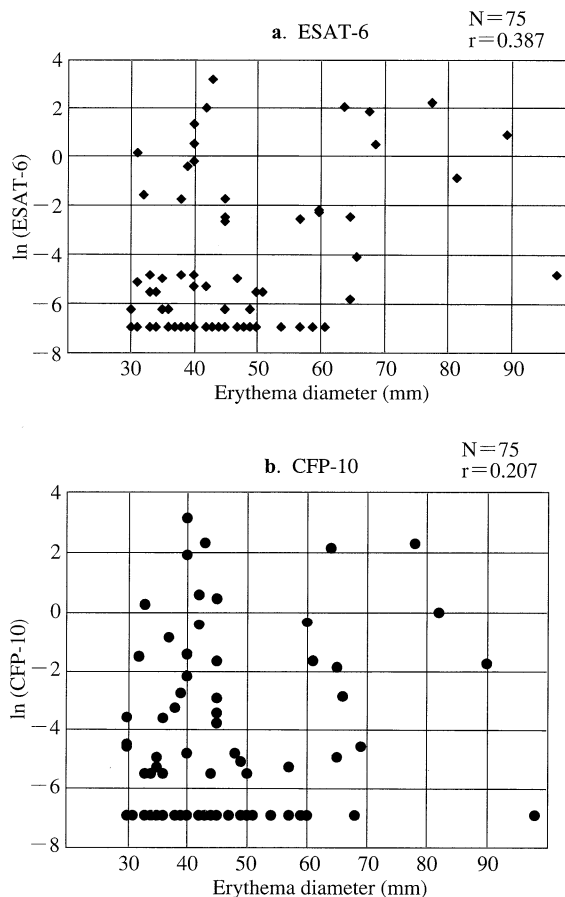


Fig. 4 Correlation between tuberculin reaction and IFN- γ response

学予防を指示することになったはずである。

QFTをこれらの者に適用したところ、2群の反応は感染曝露に対応した明確な違いを示した。濃厚接触群ではIFN- γ 応答は感染の有無を示唆する2個の亜群からなる截然とした二峰性の分布を示し、非濃厚接触群では低頻度の被感染者の存在は未感染者の応答に覆われてはつきりしない分布となっていた。先に設定されたQFTの診断基準⁷⁾から、濃厚接触群の45.5%、非濃厚接触群7.1%、あわせて24.0%が潜在感染の状態にあるとされた。これはもとの接触者全体からみると、濃厚接触群の20.5%、非濃厚接触群の1.5%、全体では6.7% (95%信頼区間4.3%~10.3%, 実人数18人) に相当する。集団感染の対応としては、これに基づきこれら18人に化学予防が指示された。QFTを用いることによって化学予防の指示は従来法の75人からその4分の1に節減することができたことになる。

非濃厚接触者におけるQFT陽性率1.5% (95%信頼区間0.5%~4.3%) は、1998年の20~29歳に対して森⁸⁾が推定した既感染率1.6%と類似しており、ここでは感染はそれほど大量に起こっていたわけではないことがうか

がわれる。その一方で濃厚接触者群での陽性率20.5% (95%信頼区間12.9%~31.2%) がいかに濃密な感染伝播であったかを物語る。

ただし、ここには問題が少なくとも2点残されている。まずQFTの潜在感染に対する感度である。上に述べた結核患者におけるQFT陽性率は89%であり、潜在感染ではIFN- γ 応答は患者よりも高いことがあっても低くはないとする論拠は少なくない^{9)~11)}。それが正しければ、QFTでは(ツ反で30 mm以上の者の中から)最大10%程度の感染が見落とされることになる。本事例における化学予防の対象者は、抗原特異的IFN- γ 産生量が0.35 IU/ml以上の者であったが、別に論じたようにこのような既感染率が高い集団に適応するにはカットオフ値を下げることにより陽性的中率をあまり下げずに見落としを減らすことができる⁷⁾。

第2の問題は、QFTの被験者をツ反30 mm以上に限定したことによる感染者の見落としの可能性である。結核患者におけるツ反は平均値を発赤30 mm近傍にもつ正規分布である¹²⁾。もし潜在感染者のツ反がこれと同じ分布に従うとすれば、発赤30 mm以上に感染の疑いをかけることにより、分布の半数にあたる30 mm未満の反応の者を見落とすことになる。上の議論により潜在感染は患者よりも強いツ反を示す可能性があり、さらにわれわれが問題にしている既接種集団では、接種後の自然感染によるツ反は強くなることが考えられる。Fig. 1に見るように感染によって生じたと考えられる二峰性の右方のモードは40~45 mm付近にあることからもうなずける。このことはこれまでに報告された学校等での集団感染でも繰り返し観察されている¹³⁾。これからすれば、30 mmの基準で見落とされるのは被感染者の半数には達しないとしても、いずれにせよかなりの見落としは免れないことを忘れることはできない。これは今後QFTを限定的に適用する場合に、考えなければならない問題である。ただし現行の化学予防基準と比較する場合には、ツ反発赤30 mm以上とすることは見落としを増やすことにはならない。いきなり接触者全員に本法を適用するまではしなくても、たとえば発赤20 mm以上に対し適用するなどの妥協を行うだけでもツ反による「見落とし」を飛躍的に回復することが可能になるであろう。

BCG既接種者を含む集団での接触者健診にQFTが有用なことを示す事例は最近デンマークからも報告されている¹⁴⁾。長期間有症状だった高校生患者の接触者700人の健診で大半が未接種の高校生および多くの既接種者を含む成人について検査が行われ、未接種者ではQFTとツ反はよく一致し、また既接種者では濃厚接触者と非濃厚接種者の間でQFT陽性率の明らかな対比が見られた(陽性率は50%対6%)。既接種集団にはツ反皮膚反応で

はなく、PPDを抗原にしたIFN- γ 応答(QFT-PPD)を見ているが、これでの陽性率は濃厚接触群、非濃厚接触群でそれぞれ38%、44%であり、皮膚反応と同様に曝露の影響を浮き彫りにすることはできなかった。

この報告もわれわれの事例と同様、QFTがBCG既接種の影響を受けずに結核感染をよく反映することを示しており、さらにわれわれが観察し得なかった未接種集団でのツ反との高い一致性をも示している。同じ特異抗原を用い、IFN- γ 応答ではなく、感作リンパ球を検出する方法(ELISPOT)による感染診断も同様な特性を示している。Ewerら¹⁵⁾は英国で発生した中学校での集団感染で535人の接触者を接触程度に5段階に分け、ツ反とELISPOT法を行い、後者による陽性率のほうが接触程度によく相関する成績をあげたことを見ている。

このようにQFTは日本のようにBCG既接種者の多い集団(さらには環境中抗酸菌感染の多い集団¹⁶⁾)での結核感染の正確な診断に非常に有用な方法となると思われる。ただし、感染源への曝露の時期から反応が陽性になるまでの時間経過やさらに長期の応答の消長、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も知見が十分ではない。また小児、特に幼児の場合の特性についても同様であり、さらに現行の最低採血量(5 ml)からくる制約の克服も課題である。さらに一般には採血してから12時間以内の処理の必要性という操作上の制約もある。これについては最近、採血管に抗原を固定しておき、採血と同時に抗原刺激が自動的に起こる第3世代QFT(<http://www.cellestis.com>)が開発されつつあり、いちおうの解決の可能性が見えてきた。

一方、新たな結核対策への転換の時期にあって、化学予防への積極的な取り組みは、米国¹⁷⁾のような国に限らず日本でもますます重大な課題である。接触者健診に限らず、一般臨床の場でも結核発病のリスクにある者には化学予防を年齢に限らず行うべき時期に来ていると思われる。このような適用を決めるための感染診断は今後ますます重要な意味を持つてくると思われる、そのためにもQFTのような方法が確立され、広く利用されるようになることが望まれる。

ま と め

若年者集団での結核発生に際して結核菌特異抗原(ESAT-6およびCFP-10)を用いた全血インターフェロン γ 応答を定量する方法(QuantIFERON[®]TB-2G)を試行したところ、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、この方法はBCG接種の影響を受けない、特異度の高い結核感染診断の方法として有用であることが知られた。

謝 辞

接触者健診の機会を利用して頂き、諸般にわたり研究にご協力頂いた保健所職員の皆様、ならびに特異抗原を提供されたCellestis社(オーストラリア)に深謝する。

本研究は平成14年厚生労働科学研究補助金による新興再興感染症研究事業研究課題(主任研究者 森 亨)、および平成15年度厚生労働科学研究補助金による新興再興感染症研究事業研究課題(主任研究者 森 亨)のそれぞれ一部として行われた。

本研究の成績の一部は第79回日本結核病学会総会(2004年、名古屋)で樋口が発表した。

文 献

- 1) 厚生労働省結核感染症課:「結核の統計2004」. 結核予防会, 東京, 2004.
- 2) 厚生省保健医療局疾病対策課結核・感染症対策室長通知: 初感染結核に対するINHの投与について. 平成元年2月28日健医感発第20号.
- 3) 森 亨: ツベルクリン反応検査による予防投薬対象の決定. 「命令入所及び初感染結核の取扱いとその説明」. 厚生省監修, 結核予防会, 1989, 117.
- 4) Streeton JA, Desem N, Jones SL: Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 443-450.
- 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. (印刷中)
- 8) 森 亨: 結核の現状と対策. *日本内科学会雑誌.* 2001; 90: 111-115.
- 9) Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, et al.: Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis.* 1999; 180: 2069-2073.
- 10) Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, et al.: Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol.* 2001; 167: 5217-5225.
- 11) Vekemans J, Lienhardt C, Sillah JS, et al.: Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in The Gambia. *Infect Immun.* 2001; 69: 6554-6557.
- 12) 森 亨: 「ツベルクリン反応検査」. 結核予防会, 東京, 1995, 27-29.

- 13) 森 亨：「結核の統計1984」. 厚生省保健医療局結核難病課編. 結核予防会, 東京, 1984, 11.
- 14) 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.
- 15) Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al.: Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet*. 2003; 361: 1168-1173.
- 16) Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K, et al.: Tuberculin skin testing and *in vitro* T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis*. 2002; 186: 1797-1807.
- 17) ATS/CDC Statement Committee on Latent Tuberculosis Infection: Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR* 2000/49 (RR06); 1-54, 2000 (邦訳 資料と展望. 2001; 36: 25-68).

← Original Article →

USEFULNESS OF A NOVEL DIAGNOSTIC METHOD OF TUBERCULOSIS INFECTION, QuantiFERON[®]TB-2G, IN AN OUTBREAK OF TUBERCULOSIS

Nobuyuki HARADA, Toru MORI, Shinji SHISHIDO, Kazue HIGUCHI, and Yukie SEKIYA

Abstract [Objective] The purpose of this study was to evaluate QuantiFERON[®]TB-2G (QFT), a novel method of detecting tuberculosis infection among contacts of a tuberculosis patient by determining the whole-blood interferon-gamma response to the specific antigens.

[Subjects and Methods] A teacher of a college who had been coughing for the preceding two months was diagnosed with smear-positive tuberculosis. About 270 students of the college were considered to have been exposed to tuberculosis infection, of whom 73 were in closer contact with the index case because they participated in a one-week group excursion attended by the teacher. Two of the contact students developed active tuberculosis shortly thereafter. Tuberculin tests were conducted to almost all students, and QFT was performed for only those with tuberculin reactions having erythema diameters of 30 mm or larger.

[Results] Tuberculin tests of students, all of whom had been vaccinated with BCG at least once, revealed that the distribution of the close contact group was slightly shifted to right (larger side) than those with less close contacts. The QFT positive rate for close contacts was 45.5%, while that for less close contacts was only 7.1%, which obviously indicates that QFT is hardly affected by the tuberculin allergy due to past BCG vaccination. The distribution of interferon-gamma measurements (log-transformed) of the close contacts showed typical bimodality, one mode representing the infected, another the non-infected. This was not clear for the less close

contacts. The correlation of interferon-gamma measurements (log-transformed) with tuberculin reaction erythema size was weak, if not non-significant.

[Conclusion] It was concluded that QFT was a useful method for diagnosing tuberculosis infection and was unaffected by the BCG-caused tuberculin allergy. In the case of the outbreak mentioned above, QFT greatly reduced the indication of chemoprophylaxis, from 28% of all the contacts solely based on tuberculin test to only 7%.

Although there remains some problems to be overcome for QFT to be widely used with high confidence, this technology will provide a high possibility for wider and more accurate indication of chemoprophylaxis and will be one of the essential tools of tuberculosis control of the 21st century in Japan.

Key words: Tuberculosis outbreak, Latent tuberculosis infection, Tuberculin skin test, Whole blood interferon-gamma assay, Chemoprophylaxis

Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

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