

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

¹原田 登之 ¹樋口 一恵 ¹関谷 幸江 ²Jim Rothel
³木藤 孝 ¹森 亨

要旨：〔目的〕新規結核菌感染診断法である全血インターフェロン・ガンマ (IFN- γ) 応答測定法 QuantiFERON[®]TB-2G の最適カットオフ値設定を中心とし、その基礎的な特性を検討した。〔対象〕健康常人群：結核菌暴露のリスク要因が確認されない若年健康常人 220 人。結核患者群：結核菌培養陽性の活動性結核患者 118 人。接触者群：ある接触者健診でツベルクリン反応 (ツ反) 発赤径が 30 mm 以上あった若年健康常者 75 人。〔方法〕被験者の全血を結核菌抗原で刺激培養後、血漿成分中の IFN- γ 産生量を QuantiFERON[®]-CMI により測定した。測定結果は、ROC 曲線と陽性・陰性の誤分類による損失の検討を行い、カットオフ値を設定した。〔結果〕カットオフ値は ESAT-6, CFP-10 双方に対して 0.35 IU/ml と設定し、その感度は 89.0%、特異度は 98.1% であった。〔考察〕未感染健康常者において、全血 IFN- γ 応答測定法は BCG 接種に全く影響されなかった。また、2 種の結核抗原に対する IFN- γ 応答の相関は弱く、判定には両者を独立に用いる必要があった。さらに、既感染率が高い集団に本法を適用する際、カットオフ値はより低いレベルに設定し、陽性的中率をあまり下げずに見落としを減らすべきであると考えられる。

キーワード：結核感染、診断法、ESAT-6、CFP-10、IFN- γ 、ELISA

緒 言

現在全世界人口の 3 分の 1 が結核菌に感染していると見積もられ、その中から年間 880 万人の結核患者が発生し、いまだに微増傾向にある¹⁾。結核が世界最大級の感染症といわれるゆえんである。この結核対策の有力な方策として、とくに先進国では既感染者の化学予防があげられる²⁾。そのために必要な結核感染の診断に、現在まで用いられている唯一の方法はツ反である。ツ反は結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の培養濾過液から精製したタンパク (Purified Protein Derivative, PPD) を皮内に注射し、その PPD に対する宿主の遅延型アレルギー反応として注射部位に出現する発赤等を測定する *in vivo* の皮膚反応検査である。この PPD は数百種類にもものぼる結核菌抗原を含んでおり、その多くが結核ワクチンに用いる *Mycobacterium bovis*, subsp. BCG, あるいは環境中の

非結核性抗酸菌の抗原と高い類似性を持つ。このため、結核感染を受けていない者が BCG 接種を受けただけで、あるいは非結核性抗酸菌の感染を受けただけでもツ反が陽性となることがあるため³⁾、真の結核感染とこれらを区別することは実際的にはきわめて困難である。

近年分子生物学的手法を用いた研究により、結核菌の遺伝子配列中において BCG には完全に欠落している領域が同定された⁴⁾。その領域内には、一度結核に感染した動物の記憶 T 細胞に作用し、IFN- γ 産生を強く誘導する蛋白 ESAT-6⁵⁾⁶⁾ および CFP-10⁷⁾ をコードする遺伝子の存在が認められた。そしてこれらの蛋白を刺激抗原として用いることにより特異性の高い結核感染診断が可能であることが示された⁸⁾。さらに、最近全血を PPD などの抗原で刺激し、産生される IFN- γ を測定する *in vitro* 結核菌感染診断キット (QuantiFERON[®]-TB, Cellestis 社) が開発され、ツ反に代わるヒトの結核感染診断用に

¹結核予防会結核研究所, ²Cellestis Ltd, Melbourne, Australia, ³株式会社ニチレイ

連絡先：原田登之, 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター免疫検査科, 〒204-8533 東京都清瀬市松山 3-1-24 (E-mail: harada@jata.or.jp)

(Received 29 Sep. 2004/ Accepted 18 Nov. 2004)

用いられるようになった⁹⁾。これに引き続き、先に発見された特異蛋白 (ESAT-6およびCFP-10) を抗原として使用するシステムが QuantiFERON[®]TB-2G (Cellestis社, オーストラリア; 以下単に QFT と呼ぶ) として開発された。これにより結核感染を BCG 接種の影響を受けずに判定できる可能性が考えられる。最近われわれは結核患者と BCG 接種歴のある健常者の 2 群にこの検査を試み、この方法の特異的結核感染診断法としての有用性を示した¹⁰⁾¹¹⁾。本論文においては、この検査方法における最適カットオフ値の設定を中心としてその基礎的な特性について検討する。

研究対象および方法

(1) 対象者

研究対象は既に報告されているが¹⁰⁾¹¹⁾、以下 3 群に分けて簡略に示す。

第 1 群 (健常人群) : 結核菌暴露のリスク要因が確認されない若年健常人 220 人。

第 2 群 (結核患者群) : 結核菌培養陽性の活動性結核患者 118 人。治療による免疫能への影響を考慮して、採血時において 1 週間以上は治療されていないことを条件とした。明らかな免疫抑制状態にある者は含まれていない。

第 3 群 (接触者群) : ある集団での患者発生において接触者健診の対象となり、ツ反で発赤径が 30 mm 以上であった若年健常人 75 人。この群は初発患者との接触がとくに濃厚だった群 (33 人) とそれ以外の群 (42 人) に二分される。大半は BCG 既接種である。

これら各群の被験者に対しては文書による同意書を得て検査を実施した。

(2) ツ反検査および問診

各群の被験者には問診 (第 1, 第 2 群には質問紙を使用, 第 3 群は面接) を行い、感染のリスクや既往歴などを調べた。続いてツ反検査および QFT 検査を行った。

(3) QFT の測定方法

IFN- γ 産生量の測定は既に報告した方法に従って行った¹⁰⁾。簡潔に述べると、各症例からツ反検査実施前および実施後 2 週間以上経過した時点で採血を行った。被験者から全血 (ヘパリン加全血) を採取後、24 ウエルの培養プレートに採血から 12 時間以内の血液検体を 1 ml/ウエル分注し、それぞれのウエルに刺激抗原 ESAT-6, CFP-10, 陰性コントロール (生理食塩水) および陽性コントロール (PHA) を 100~125 μ l 添加攪拌し (抗原最終濃度: 各ペプチド 1 μ g/ml, PHA: 最終濃度 5 μ g/ml), 37°C で 16~24 時間静置培養 (5% CO₂) 後、検体の上澄みの血漿標本を採取した。採取した標本は測定時まで -85°C で保存した。IFN- γ 産生量は、QFT を用い規定の使用法に基づく操作方法により測定した。

(4) 判定方法

以下に示すように、刺激抗原 ESAT-6 または CFP-10 により産生誘導された IFN- γ 値より陰性コントロール (Nil) の IFN- γ 産生値を差し引いた値を算出した。

$$\text{ESAT-6 での値 (IU/ml)} = \text{IFN-}\gamma \text{ ESAT-6} - \text{IFN-}\gamma \text{ Nil}$$

$$\text{CFP-10 での値 (IU/ml)} = \text{IFN-}\gamma \text{ CFP-10} - \text{IFN-}\gamma \text{ Nil}$$

この値に基づき、分布の吟味やカットオフの設定、特異度および感度の分析などを行った。

(5) 統計解析およびカットオフ値の設定・分析

IFN- γ 産生量の測定値は対数正規分布に従うことから、この測定値に基づいた主要な分析には、測定値を対数変換したものをを用いた。解析の大半は Excel[®] (Microsoft[™]) スプレッドシート上で実行した。検定等は Epi-Info2000 (CDC), SPSS-J for Windows (SPSS Inc, USA) を用いた。

カットオフ値の設定には Receiver-Operating Characteristics (ROC) 分析のうえ、設定するカットオフによる誤分類 (偽陽性, 偽陰性) に起因する損失を最小限度にするための理論を用いた。その詳細は成書¹²⁾に譲るが、以下に要点を記す。

カットオフ値を x とし、それ以上を陽性、未満を陰性とする。これによって有病者 (既感染者) について偽の陰性 (FN), また健常人 (未感染者) について偽の陽性 (FP) という誤分類がそれぞれ生じうる。それらの個々について臨床的結末 (死亡や苦痛) や関係する経費 (医療費や検査代), すなわち損失が発生する。単位当たり誤分類の臨床的・経済的負担を仮に 1 つの尺度 L (FN), L (FP) で表しうるものとし、カットオフ x に対応するそれらの和 (Penalty と名づける) を最小にする x を求めることが命題となる。Penalty は検査対象となる集団の有病率によって左右される。すなわち、

$$\text{Penalty} = L(\text{FN}) \cdot \text{FP} \cdot P + L(\text{FP}) \cdot \text{FN} \cdot (1 - P)$$

である。ここで、 $L(\text{FN}) = w \cdot L(\text{FP})$ とする。つまり 1 件の偽陰性は、1 件の偽陽性の w 倍の損失に相当するものとする。単位を無視すれば、Penalty = $w \cdot \text{FP} \cdot P + \text{FN} \cdot (1 - P)$ となる。有病率 P は一般に未知なので、このような事象は生起・不生起が等確率であるとする原理に基づき (ラプラス原理) ツベルクリン反応検査について行われるように¹³⁾, $P = 0.5$ を想定する。このとき、単位を無視すれば、Penalty = $w \cdot \text{FP} + \text{FN}$ となる。これを最小にする x を求めればよい。

このように「最善のカットオフ値」は有病率 50% という状況で、また仮定的な w (2 通りの損失の比) によって決められているが、前者についてはさまざまな水準の有病率に対してその有効性を検討する。この有効性は、陽性的中率 (このカットオフで陽性とされたもののうち真に有病者である確率), 陰性的中率 (同様に陰性とさ

Table 1 Characteristics of the groups of subjects

Group	No.	Sex		Age (years)	
		Male	Female	Range	Mean
1. Healthy subjects, nursing students	220	16	204	18–33	20
2. Tuberculosis patients, untreated	118	79	39	13–86	54
3. Contacts of a TB patient, college students	Close	33	11	19–24	20
	Less close	42	11	18–24	19

れた者のうち真に健常者である確率)によって評価する。これらは感度 Se , 特異度 Sp , 有病率 P のとき以下の式で計算される。

$$\text{陽性的中率} = P \cdot Se / (P \cdot Se + (1 - Sp) \cdot (1 - P))$$

$$\text{陰性的中率} = 1 - P \cdot (1 - Se) / (P \cdot (1 - Se) + Sp \cdot (1 - P))$$

結 果

被験者各群の背景

対象者計 3 群の背景要因を Table 1 に要約する。

第 1 群は看護学生で、問診から 85% で BCG 既接種を確認したが、実際の既接種率はさらに高いと考えられる。特定の結核感染の機会を申告したものはなかった。ツ反は結果が知られた 219 人中、発赤径 10mm 以上が 83%, 30 mm 以上が 26% であった。

第 2 群のうち結核菌塗抹所見の知られた患者のうち 87% が塗抹陽性であった。明らかな免疫抑制要因を持っているものはなかった。

第 3 群は全員 BCG 既接種であり、濃厚、非濃厚群の中から 1 人ずつ活動性結核と診断されたものが発生した。上述のようにこれらは全員ツ反発赤径が 30 mm 以上である。

(1) ESAT-6 および CFP-10 刺激に対する IFN- γ 応答の定量, 分布

健常人群 (第 1 群) の ESAT-6 と CFP-10 刺激により産生された IFN- γ 量 (対数変換値) の分布を Fig. 1 に示した。これら IFN- γ 産生量の分布は、最小値域 (測定不可域) に集中する指数関数に類似した分布に従い、その (幾何) 平均はそれぞれ 0.0070 IU/ml, 0.0078 IU/ml であった。

患者群における ESAT-6 および CFP-10 刺激による IFN- γ 産生量は、Fig. 2 のように観察数が小さいため不規則ではあるが、正規分布に類似した分布に従い、その (幾何) 平均値 \pm 標準偏差はそれぞれ 1.36 ± 7.65 IU/ml, $0.672 \pm 0.11.15$ IU/ml であった。なお Fig. 2 にはこれら IFN- γ 応答の年齢 (13 ~ 34 歳, 35 ~ 59 歳, 60 歳以上) との関連も見た。34 歳以下では分布の形は定型的な正規分布を示すが、35 歳以上では歪みが目立つ。これら 3 群の年齢群間における IFN- γ 産生量の平均値間に有意

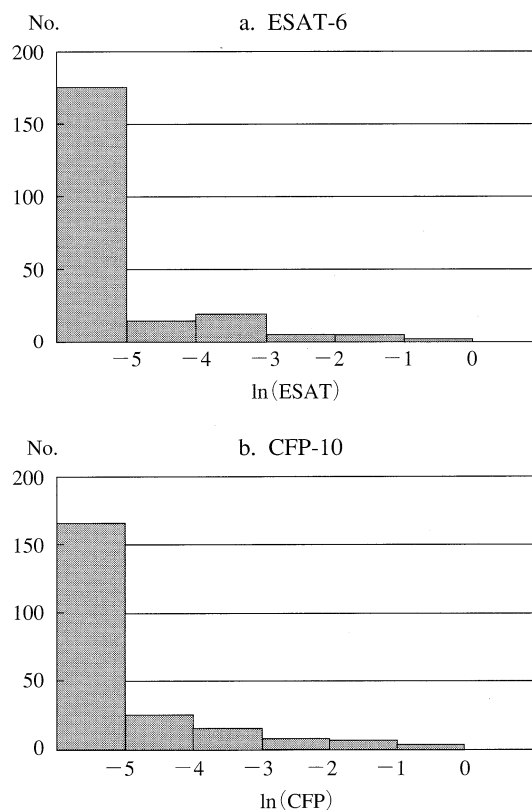


Fig. 1 Distribution of healthy subjects according to IFN- γ response (ESAT-6 above, and CFP-10 below). The horizontal axes [ln (ESAT) and ln (CFP)] indicate log-transformed value of IFN- γ amount induced by stimulation of ESAT-6 and CFP-10, respectively.

の差は見られなかった [一元配置分散分析 (自由度対は 2,107), ESAT-6 では $F = 0.614$, $p = 0.540$; CFP-10 では $F = 0.346$, $p = 0.708$]. また結果 (4) で決定されるカットオフに基づく陽性率は Table 2 のとおりであった。60 歳以上の群で陽性率が低いように見えるが、3 つの年齢間のばらつきは有意ではなかった。

患者濃厚接触者群における IFN- γ 産生量の分布は Fig. 3 に示すとおり、上記の 2 種の分布の組み合わせと見ることができる。2 種の分布とはつまり、未感染者を代表する最小値域にピークをもつ指数型の分布と、既感染者を代表すると考えられる右方の正規型の分布とである。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った¹¹⁾。これら 3 群におい

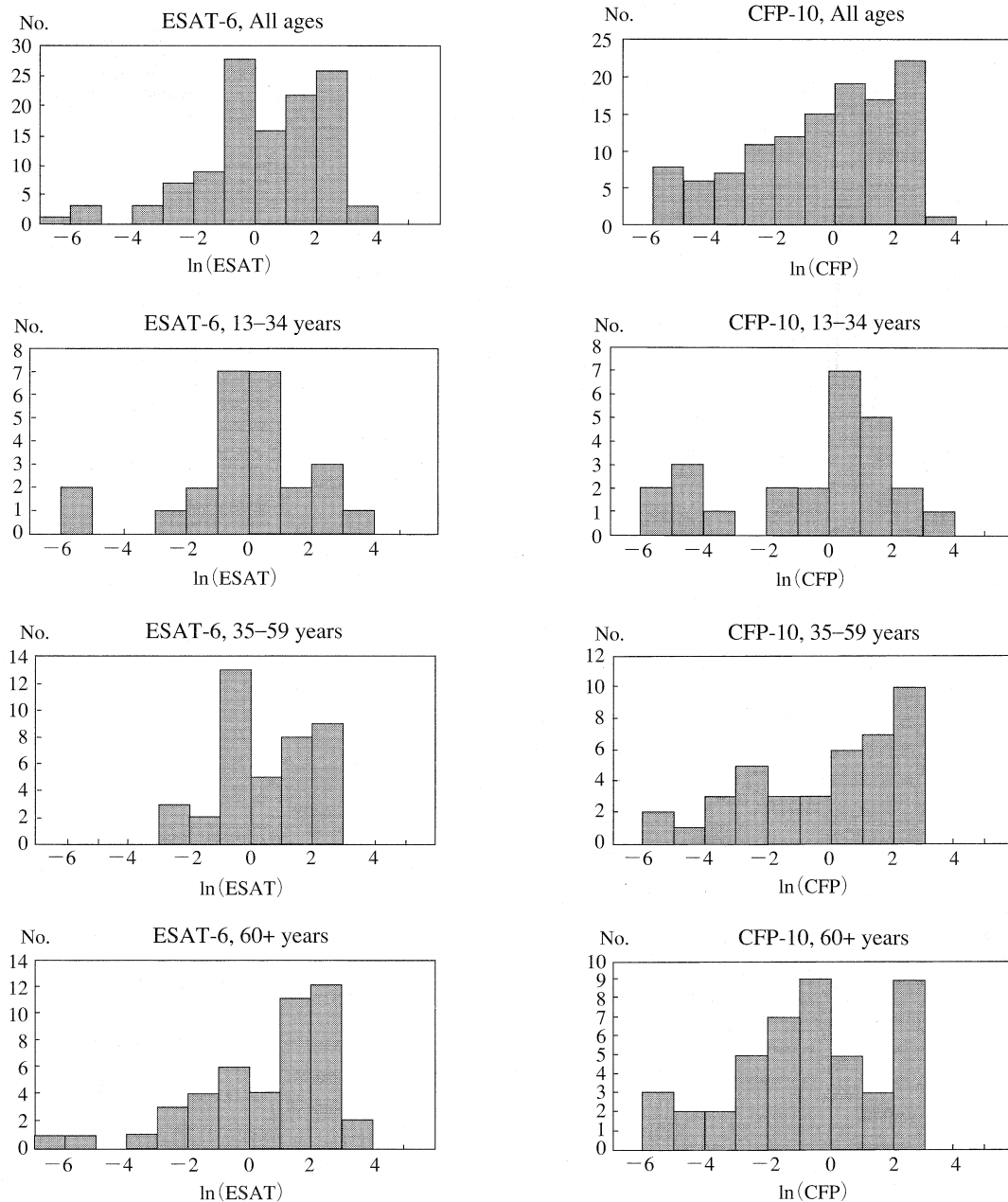


Fig. 2 Age-specific distributions of TB patients according to IFN- γ response to ESAT-6 or CFP-10.

て陽性コントロールに対する反応の弱い者が見られなかったことから、免疫不全状態の者は含まれていないと考えられた。

(2) ESAT-6応答とCFP-10応答の関連

結核患者118人の抗原刺激によるIFN- γ 応答について、ESAT-6に対するものとCFP-10に対するものの関連を、IFN- γ 産生量(対数変換値)の相関で見たのがFig. 4である。相関係数は0.303で(無相関の検定の $p = 0.001$)、弱い有意の相関が認められる。

感受性の一致性という観点から、結果(4)で見る両者のカットオフ値を用いた陽性・陰性の分類の一致性を

見ると、Table 3のようになっていた。一致性の指標として、全体一致率(両法による陽性、陰性の判定が一致した例数の割合)は $(68 + 13) / 118 = 68.6\%$ であった。偶然の一致を排除するために κ 係数を見ると、 $\kappa = 0.225$ で、検定では $z = 2.659$, $p < 0.001$ となり、 κ 値は0よりは有意に大きいとはいえ、その絶対値は小さく一致率は高くはない。

なお、BCG既接種の未感染者(第1群)においても、ESAT-6とCFP-10の間の相関は $r = 0.170$ で無相関検定の p 値は0.011と、ごく弱い有意の相関が認められる。

(3) ツベルクリン反応とIFN- γ 応答の関連

Table 2 Comparison of positive rates and means of IFN- γ response among age-groups of TB patients.

		No.	"Positive"		Log-transformed		Original value	
			No.	(%)	ln (Mean)	ln (SD)	Means [†]	SD [†]
ESAT-6	13-34 yrs	25	21	(84.0)	-0.042	2.111	0.9587	8.2587
	35-59 yrs	40	35	(87.5)	0.447	1.572	1.5630	4.8172
	60+ yrs	45	35	(77.8)	0.486	2.300	1.6256	9.9739
	Total*	118	96	(81.4)	0.311	2.034	1.3641	7.6451
	Test	Exact p=0.492		F-test; F (d.f. = 2,107) = 0.620, p = 0.540				
CFP-10	13-34 yrs	25	17	(68.0)	-0.478	2.577	0.6198	13.1558
	35-59 yrs	40	26	(65.0)	-0.125	2.433	0.8827	11.3963
	60+ yrs	45	29	(64.4)	-0.541	2.278	0.5823	9.7577
	Total*	118	77	(65.3)	-0.398	2.412	0.6715	11.1543
	Test	Exact p=0.967		F-test; F (d.f. = 2,107) = 0.346, p = 0.708				
Either	13-34 yrs	25	23	(92.0)				
	35-59 yrs	40	38	(95.0)				
	60+ yrs	45	38	(84.4)				
	Total*	118	105	(89.0)				
	Test	Exact p=0.273						

*including 8 cases of unknown age.

[†] Mean and SD are based on log-transformed measurement values.

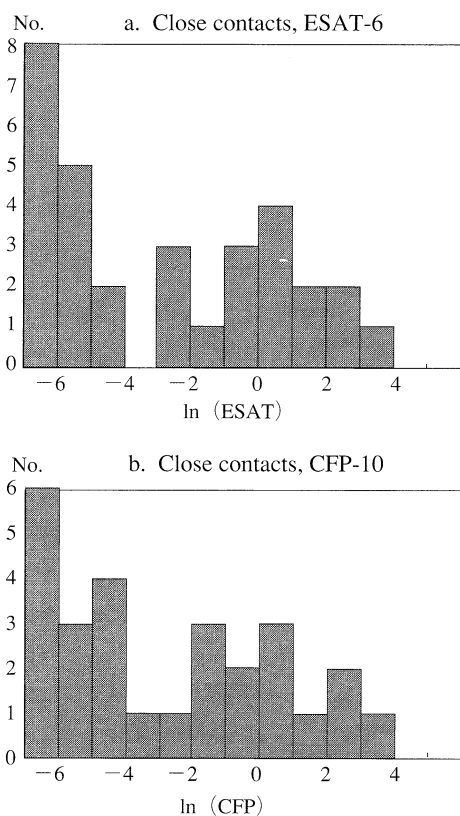


Fig. 3 Distribution of close contacts of a tuberculosis patient according to IFN- γ response (ESAT-6 above, and CFP-10 below). The horizontal axes [ln (ESAT) and ln (CFP)] indicate log-transformed value of IFN- γ amount induced by stimulation of ESAT-6 and CFP-10, respectively.

Note; The most left columns exceed the vertical axes.

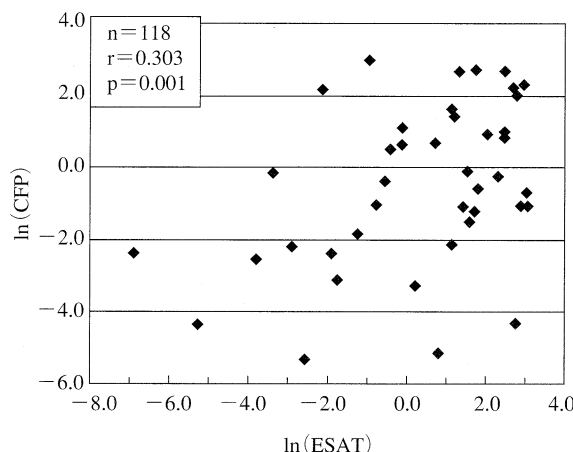


Fig. 4 Correlation between ESAT-6 and CFP-10 measurements in TB patients. ln (ESAT) and ln (CFP) indicate log-transformed value of IFN- γ amount induced by stimulation of ESAT-6 and CFP-10, respectively.

Table 3 Contingency between IFN- γ responses to ESAT-6 and CFP-10 in tuberculosis patients

	CFP-10			
	*Positive	*Negative	Total	
ESAT-6	*Positive	68	28	96
	*Negative	9	13	22
	Total	77	41	118

Over-all agreement = 0.686, Kappa coefficient = 0.225

*Positive and negative were determined based on the cut-off value (0.35 IU/ml) obtained from data analysis.

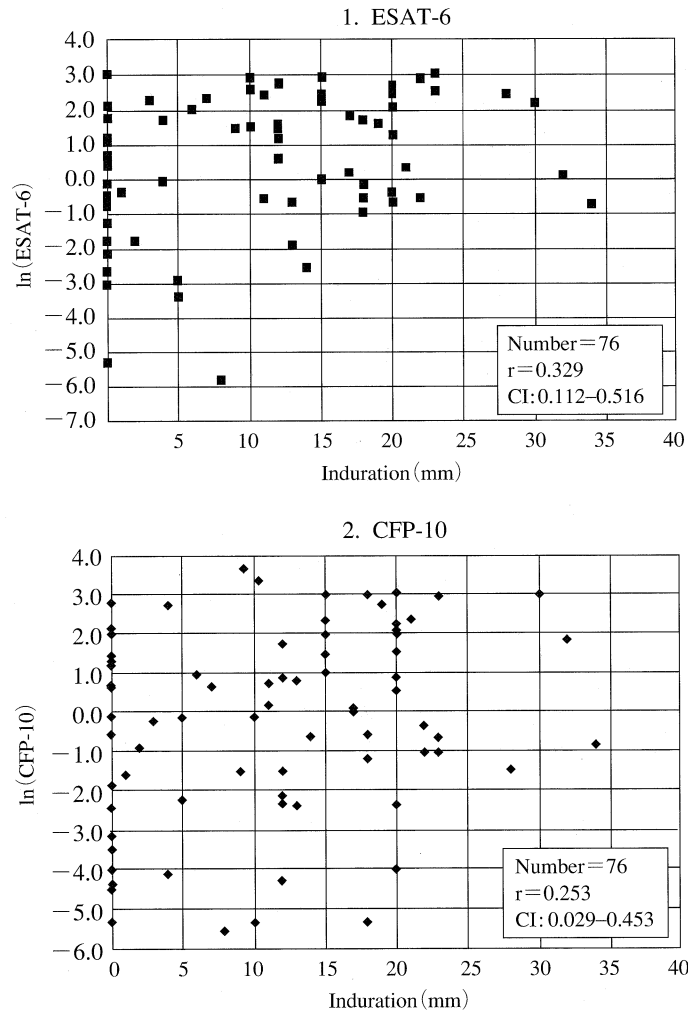


Fig. 5 Correlation between Mantoux test and IFN- γ response in TB patients. ln (ESAT) and ln (CFP) indicate log-transformed value of IFN- γ amount induced by stimulation of ESAT-6 and CFP-10, respectively.

Note; r: Correlation coefficient, CI: 95% confidence interval.

まず、BCG既接種健常者についてツ反応径とIFN- γ 応答の相関を検討した。ツ反発赤および硬結の分布はともに正規型（硬結では左方に偏位し、歪んでいるが）であるのに対し、IFN- γ 応答（ESAT-6およびCFP-10刺激によるIFN- γ 産生量、対数変換値）はFig. 1に見たような指数型の分布に従っていた。ツ反およびIFN- γ 応答の分布はこのように全く異なっており、両者間の関連の低さを示唆している。相関係数は、発赤とESAT-6、CFP-10の間でそれぞれ $r=0.128$, $r=0.047$ で無相関の検定の p はそれぞれ0.059, 0.493, また硬結との間ではそれぞれ $r=0.047$, $r=0.042$ (p 値はそれぞれ0.693, 0.625)であり、いずれも相関はないことが確認された。つまりIFN- γ 値は、BCG接種後のツ反の強さと無関係である。次に結核患者について同様の観察を行う。ツ反の成績が知られた菌陽性結核患者76人のツ反硬結径とIFN- γ 応答（対数変換値、その分布はFig. 2）の散布図

はFig. 5のとおりであった。ESAT-6, CFP-10について相関係数はそれぞれ0.329, 0.253で、無相関検定では p 値はそれぞれ0.0037, 0.0275で、ともに弱い有意の相関が認められる。

(4) カットオフ値の決定

診断については、上の分析からESAT-6とCFP-10のかなりの独立性から、両者を同時に用いることが有用と考えられるので、後者の診断方式は重要である。Fig. 6にESAT-6, CFP-10およびその組み合わせ（いずれかより大きい値の方で）による診断に関するROC曲線を示す。AUC（曲線下面積）は、0.987（95%信頼区間は0.977～0.999）, 0.981（同0.967～0.996）, 0.937（同0.907～0.969）である。CFP-10に比してESAT-6のほうが診断上有用であり、両者を同時に用いるとさらに有用になることが示されている。

方法（5）で記述した方式により最小Penaltyを与える

ESAT-6, CFP-10のカットオフ値を決定する。2種の誤分類による損失の比 w を10と設定し解析した結果, Fig. 7のように, ESAT-6は0.35 IU/ml付近で最小 Penaltyを与え, CFP-10も同様であった。両者が共通のカットオフになることの利便性からも, この値を最良カットオフとする。このとき感度はESAT-6, CFP-10でそれぞれ81.4%, 65.3%, 特異度はそれぞれ99.5%, 98.6%である。また両者どちらかがこの値を超える者を陽性とする, 感度, 特異度はそれぞれ89.0% (95%信頼区間82.1%~93.4%), 98.1% (95.4%~99.3%)となる。カットオフ値を0.35 IU/mlの前後で変化させて感度, 特異度がどのように変化するかを見た結果, 0.12 IU/mlで感度, 特異度は交差したが, 0.2~0.4 IU/mlの範囲では感度, 特異度が比較的安定した範囲にあることが知られた。

さらに対象集団の有病率(既感染率)の水準によって陽性的中率, 陰性的中率がどのように変わるかを見た。Fig. 8のように陽性的中率は, カットオフが0.3 IU/ml以上であれば有病率が1%~50%の範囲にわたりほぼ100%であるが, 0.2 IU/mlに下げると, 有病率の影響が大きくなり, たとえば, 1%になると陽性とされた者のうち真の有病者は60%に下がる。これに対して, 陰性的中率は有病率が高いほど低くなり, 有病率50%では0.3 IU/ml前後における陰性的中率は90%に下がる(陰性とされた者の10%が有病者)。

考 察

この研究では「潜在結核感染」の診断のための方法論を問題にしているが, 潜在結核感染の Gold standard (絶対基準), つまり規範となる診断法が確立されていないので, この研究では結核菌が培養証明されており, ほぼ未治療の活動性結核をもっていることを結核感染の代理指標とし, また健康若年者(平均年齢20歳)は結核未感染と仮定してこの解析を行った。前者の仮定で問題になるのは, 感染後活動性結核になった者と, 感染して発病しない状態とでこの検査のパフォーマンスがどのように違うかである。同様に治療や感染後の時間経過の影響も問題になる。この検査がとくに有効性を期待されるのは, 感染後間もない潜在感染状態で発病予防治療(化学予防)の適応を決定するためであるが, このような状態では一般にはIFN- γ 応答は発病後よりも強いとする知見^{14)~16)}が多い。もしそうであれば, 患者を代理指標とする本研究で得られた感度の水準は真の潜在感染に関しては過小評価の可能性もある。また健常者を未感染としたが, 最近の日本では20歳では1%前後が既感染と推定されている¹⁷⁾ので, この研究で得られた特異度はその分だけ過小評価になっている可能性がある。さらに, この研究で用いられている抗原は, *Mycobacterium kansasii*や

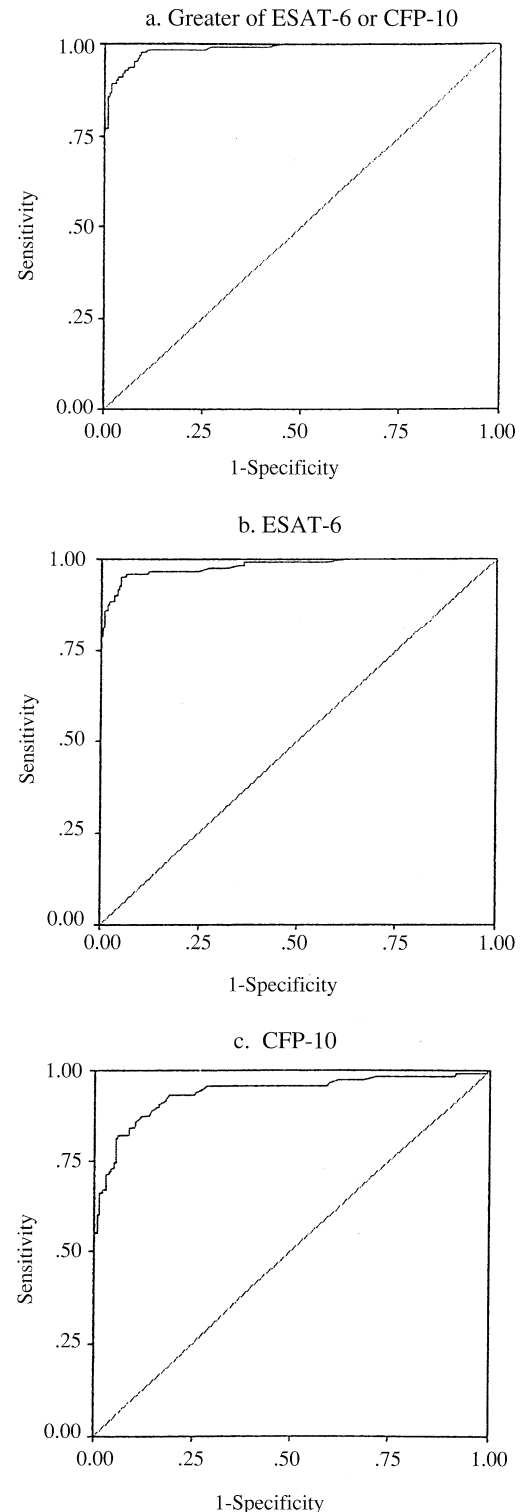


Fig. 6 Receiver-operating characteristics curve for IFN- γ response in classifying the tested to either tuberculosis patients or healthy subjects.

*M. szulgai*にも存在するので健常者でこれらの菌の感染を受けている者があるとするれば, それによる過小評価も考えなければならないが, 観察された特異度は98%なので, これらはあってもほとんど問題にならない。

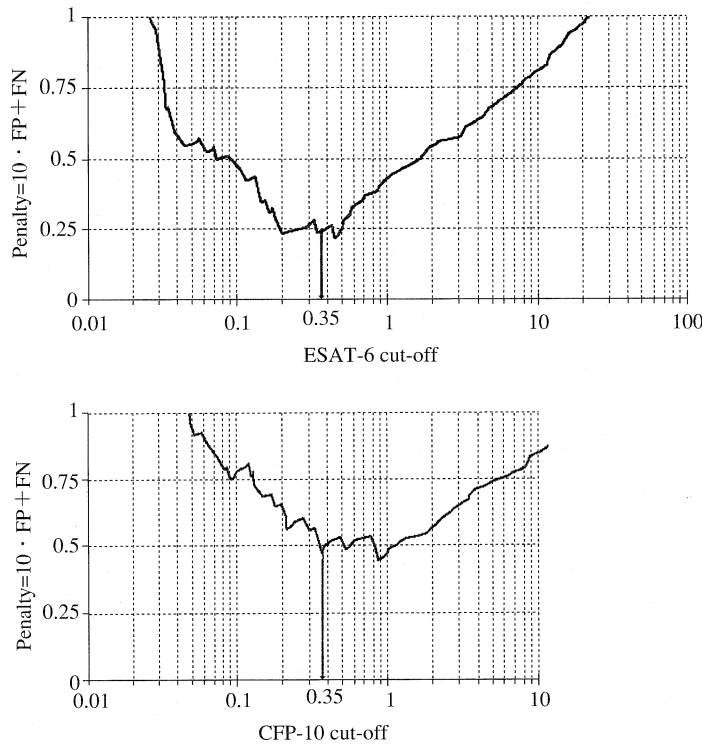


Fig. 7 Analysis for determination of the optimal cut-off value. Penalty values were plotted for each ESAT-6 (top) or CFP-10 (bottom) cut-off values. The optimal cut-off values were chosen when penalty value becomes minimum.

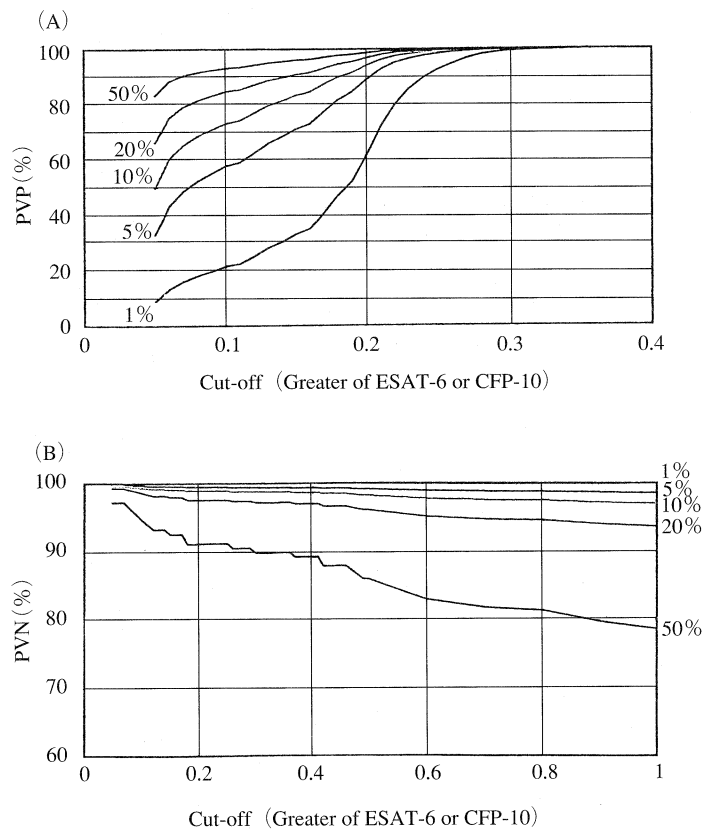


Fig. 8 Predictive value of positive (A) or negative (B) by cut-offs for selected levels of prevalence.

特異抗原に対する IFN- γ 応答の定量的分析は、すべて測定値に対数変換を施して行った。これによって、患者においては正規型の、また未感染者においては指数型の分布が観察され、接触者においては両者の混合体としての複合分布が見られた。これらはツベルクリン反応の反応径と全く同様である。

患者における IFN- γ 応答には、ツベルクリン反応の場合¹⁸⁾と違って有意の年齢差は見られなかった。年齢のほか病状との関連などは冒頭に述べた他の条件との関連と同様、今後の研究課題である。

ESAT-6 と CFP-10 に対する IFN- γ の関連を結核患者について見ると、0.303 という弱い正の相関が見られる。これに関しては、ESAT-6 と CFP-10 は同じ遺伝子ファミリーに属し、低いながらも類似性を持つこと⁷⁾が関係している可能性が考えられるが、いずれにせよ、この低い相関からして、設定したカットオフによる陽性区分は ESAT-6 と CFP-10 で一致性は偶然以上のものでないという結果となり、両者への反応を組み合わせて診断に用いることの有効性が出てくることになった。なお、BCG 既接種者においても両者の間にはごく弱い相関が見られた。本来ならばここでは無相関のはずであるが、このようなことになった原因としては、わずかにあったかもしれない結核菌や抗酸菌感染など非特異的な反応要因の影響が考えられる。

未感染健常者においてツベルクリン反応と IFN- γ 応答の関連については、ツベルクリン反応発赤・硬結径の分布と IFN- γ 応答の分布が全く異なることから、無相関は自明である。事実ピアソン相関もそれを裏付けていた。このようにこの抗原が BCG 接種によって作られた細胞免疫ないしツベルクリン・アレルギーとはほぼ完全に独立していることが確認されるのである。

結核感染によるツベルクリン反応と IFN- γ 応答の間には、結核患者における観察から、弱いがある相関があることが知られる。しかしその弱さからツベルクリン反応には IFN- γ だけでない多くの要因が絡んで反応の強弱が決定されることを改めて知らされる。

カットオフ設定の問題は、ツベルクリン反応を含む多くの意思決定問題とまったく同様に損失関数と事前確率の処理に帰する。これを一般的に解決することは不可能なので、多くの実用的なケースにならって、便宜的な仮定と戦略を採り、その上でそのカットオフの有用性を検討した。このようにしてカットオフは ESAT-6、CFP-10 双方に対して 0.35 IU/ml と設定し、実際的にはそのいずれかに対してこの値を超える応答が見られたケースを陽性とする事とした。(仮定的)絶対基準に照らして、その感度は 89.0%、特異度は 98.1%であったが、このパフォーマンスはカットオフ値を 0.2~0.4 IU/ml 程度の範

囲で変化させても大きくは変わらない。

これに対して、別の患者集団にこれを適用した経験から 0.35 IU/ml の感度は結核菌塗抹陽性肺結核患者において 73% と低く、たとえば、0.2 IU/ml (感度は 87%) 0.1 IU/ml (同 93%) 程度にしてはどうかという意見¹⁹⁾もあった。このような観察されたパフォーマンスの差については研究に参加した患者の免疫能に影響する要因の分布の違いも考えなければならないが、感度を上げるためにカットオフ値を下げるのが有効なことは言うまでもない。しかし同時にそれは特異度を下げるという trade-off を考えなければならない。ちなみに、カットオフを 0.1 IU/ml に下げることで感度は 95% に上げられるが、特異度は 92% にまで低下する。この特異度の低下は、Fig. 8 で見るように、有病率の低い集団にこの検査を適用した場合に深刻な影響を及ぼす。たとえば有病率が 1% の集団では、カットオフが 0.35 IU/ml ならば陽性的中率はほぼ 100% だが、0.1 IU/ml になると 21% に下がる。つまりこの判定基準で「陽性」とされた者のうち真に感染を受けた者は 21% しかいないのである。同様に設定したカットオフ値が高い場合には、高い有病率 (既感染率) の場合に「陰性的中率」(陰性と判定された者のうち、真の未感染者の割合) に大きな影響を与える。

このように最善のカットオフの設定は方法で見たように対象集団の有病率水準に依存するので、ツベルクリン反応検査においては日本では濃厚接触者集団では発赤 10 mm、一般小児集団では 30 mm という「二重基準」を推奨している²⁰⁾。米国でも同様である²⁾。これにならって QFT においても、感染の危険の高い集団では 0.1 IU/ml を、一般の集団では 0.35 IU/ml をそれぞれ陽性の基準とするような戦略をとることも考えるべきである。この考え方に基づき、すでにわれわれ (結核研究所抗酸菌レファレンスセンター) は、濃厚接触があり、0.35 IU/ml で陽性者が高頻度で発生している集団においては 0.1 IU/ml ~ 0.35 IU/ml の者 (仮に「疑陽性者」と区分) に対しても化学予防を推奨している。もちろん上記「疑陽性者」に対しては感染に関する事前確率の推定のみによって化学予防の適否を決定するだけでなく、免疫能の関連要因、感染からの時間経過等も考慮するほか、再検査や追跡のような措置の上での妥協的な対応を考えることも意味がある。

実用的な立場から、われわれはもとの測定値のカットオフによる陽性・陰性の判定を行う方法をこの検査法の判定戦略とした。一方、数学的には判別関数を用いて 2 個の独立変量に重みづけを行い、これにより基準変量 (結核・健康) を判別する戦略も考えられる。試みにこれを行ってみると正準相関係数 (重みづけされた各測定値と診断 [結核 = 1, 健康 = 0] との間の相関係数) は 0.911

と高く、結核の事前確率を0.5とした場合の正しい判別率は96.4%となった(われわれの方法では93.5%)。しかしわれわれの簡便な方法の有用性はすでに十分に高いので、判別閾値もこれに代わるものではない。

カットオフ設定にあたってわれわれは偽陽性と偽陰性の損失を10:1と仮定した。前者には不必要な精密検査、薬剤投与、薬剤副作用、追跡検査、それに苦悩など、後者には結核発病とそれによる周囲への感染という損失がそれぞれある。これを10:1 ($w = 10$) と評価したことになるが、もちろん議論の余地は大いにある。ただし w 値を2~10の範囲で変化させても Penalty を最小にする x 値はあまり変化しなかったことから見て、設定そのものは無理な仮定ではなかったと考える。ただし損失についてはより精密な検討が必要であり、さらには検査の経費も含めた、検査体系全体の経費・効果分析が必要であろう(予備的な分析を森²¹⁾が行っている)。

ま と め

①活動性結核患者、未感染健常者、患者接触者の3集団について、結核菌特異抗原に対する末梢血のIFN- γ 応答を定量し、それぞれにおいて結核感染を表す特徴的な分布を観察し得た。とくに未感染健常者においてはそのIFN- γ 応答はBCG接種に全く影響されなかった。

②上記の分布のROC曲線と陽性・陰性の誤分類による損失の検討から、IFN- γ 応答による結核感染の判定のためのカットオフ値を設定した。

③2種の特異抗原に対するIFN- γ 応答の間の相関は弱く、判定は両者を独立に用いることにより感度を上げることができた。

④ツベルクリン反応検査と同様に、適用する集団の既感染率が高い集団では、カットオフ値はより低いレベルに設定す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。

謝 辞

健常者、患者における知見は以下に掲げる研究者の協力の下に得られた。坂谷光則・岡田全司・鈴木克洋・井上義一・露口一成(独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター)、山岸文雄・佐々木結花(独立行政法人国立病院機構千葉東病院)、高嶋哲也・露口泉夫(大阪府立呼吸器・アレルギーセンター)、川辺芳子(独立行政法人国立病院機構東京病院)、長尾啓二(千葉大学医学部保健管理センター)、重藤えり子(独立行政法人国立病院機構東広島医療センター)、松本憲子(宮崎県立看護大学)、御手洗聡(結核予防会結核研究所)。接触者については関係保健所担当者諸氏の援助を受けた。統計処理については内村和広氏(結核予防会結核研究所)

の支援を受けた。心から感謝の念を捧げたい。

文 献

- 1) World Health Organization: Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2004. Geneva, Switzerland, 2004.
- 2) ATS/CDC Statement Committee on Latent Tuberculosis Infection: Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. MMWR 2000/49 (RR06) 2000: 1-54. (邦訳 資料と展望. 2001; 36: 25-68).
- 3) von Reyn CF, Horsburgh CR, Olivier KN, et al.: Skin test reactions to *Mycobacterium tuberculosis* purified protein derivative and *Mycobacterium avium* sensitin among health care workers and medical students in the United States. Int J Tuberc Lung Dis. 2001; 5: 1122-1128.
- 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, Andersen AB, Sorensen AL, et al.: Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J Immunol. 1995; 154: 3359-3372.
- 6) Sorensen AL, Nagai S, Houen G, et al.: Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1995; 63: 1710-1717.
- 7) 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: 3195-3203.
- 8) Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE, et al.: Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. J Infect Dis. 2000; 181: 1850-1854.
- 9) Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health. QuantiFERON[®]-TB-P010033 [Letter]. www.fda.gov/cdrh/pdf/P010033b.pdf. 2002, 5-13.
- 10) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al.: Detection of tuberculosis infection with an interferon-gamma based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med. 2004; 170: 59-64.
- 11) 原田登之, 森 亨, 宍戸真司, 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.
- 12) Weinstein MC, Fineberg HV: Clinical decision analysis. W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1980, 75-130.
- 13) 水野哲夫: 臨床・公衆衛生のための意思決定. 南光堂, 東京, 1968, 219-230.
- 14) 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.
- 15) Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, et al.: Direct ex

- vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol.* 2001; 167: 5217-5225.
- 16) 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.
- 17) 森 亨: 結核の現状と対策. 日本内科学会雑誌. 2001; 90: 111-115.
- 18) 森 亨: 「ツベルクリン反応検査」. 結核予防会, 東京, 1995, 34-36.
- 19) 川辺芳子, 鈴木純子, 益田公彦, 他: 新しい結核感染診断キット QuantiFERON[®]-TBの臨床評価—とくに判定基準の検討. 結核. 2004; 79: 201.
- 20) 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.
- 21) 森 亨: 新たな結核対策の技術と展望. 結核. 2004; 79: 587-604.

— Original Article —

BASIC CHARACTERISTICS OF A NOVEL DIAGNOSTIC METHOD
(QuantiFERON[®]TB-2G) OF LATENT TUBERCULOSIS INFECTION WITH A USE OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS-SPECIFIC ANTIGENS, ESAT-6 AND CFP-10

¹Nobuyuki HARADA, ¹Kazue HIGUCHI, ¹Yukie SEKIYA, ²Jim ROTHEL,
³Takashi KITO, and ¹Toru MORI

Abstract [Purposes] To determine the optimum cut-off level of a newly developed method for diagnosing tuberculosis infection based on whole-blood interferon-gamma measurement, and to study the basic characteristics of the method.

[Study Subjects] 1) A total of 220 young, healthy individuals having no apparent exposure to tuberculosis infection, most of whom have had a vaccination with BCG vaccine. 2) One hundred eighteen tuberculosis patients who were diagnosed by positive *Mycobacterium tuberculosis* on culture. 3) A group of 75 youngsters exposed to an infectious tuberculosis patient and who showed a strong tuberculin reaction (with erythema diameter of 30 mm or more).

[Method] Whole-blood specimens of donors were stimulated with antigens, i.e., ESAT-6 and CFP-10, and then cultured. Plasma concentrations of interferon-gamma discharged were then determined with QuantiFERON[®]-CMI. Correlation between interferon-gamma concentrations in response to ESAT-6 and CFP-10, and their correlation with Mantoux test results were analyzed for various categories of donors. The Receiver Operating Characteristics analysis was performed considering the loss due to misclassification.

[Results and Discussion] The optimum cut-off level was determined as 0.35 IU/ml for both ESAT-6 and CFP-10. This

gave the test a sensitivity of 89.0% and specificity of 98.1% in detecting tuberculosis infection. The correlation of interferon-gamma response with tuberculin tests among BCG-vaccinated individuals was low, which suggested that the test was not influenced by previous BCG vaccination. The low correlation between ESAT-6 and CFP-10 tests suggested that the simultaneous use of the two tests was beneficial. As in the case of clinical tests in general, the cut-off should be set at a lower level when the test is applied to high prevalence situation and vice versa.

Key words: Latent tuberculosis infection, Diagnostics, ESAT-6, CFP-10, IFN- γ , ELISA

¹Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), ²Cellestis Ltd, Melbourne, Australia, ³Nichirei Corporation

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)