

第80回総会ミニシンポジウム

I. インターフェロン γ の未来

座長 森 亨

キーワード：結核感染，クオンティフェロン，インターフェロン γ ，ツベルクリン反応

シンポジスト：

1. QuantiFERON[®]TB 第二世代の基礎的特性
原田登之，樋口一恵，森 亨（結核予防会結核研究所）
2. QuantiFERON[®]TB 第二世代の臨床・疫学的応用
鈴木公典（ちば県民保健予防財団），原田登之，森 亨（結核予防会結核研究所）
3. 結核症の病態におけるインターフェロン γ の意義
高嶋哲也（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター結核内科）

BCG接種の影響を受けない結核感染診断技術の開発は，ことに日本のようにBCG接種に熱心に取り組んできた国で結核専門家にとっては共通の強い願望であり，長年の夢であった。結核感染の正確な診断は，結核予防や診療には被感染者に対する化学予防の実施や鑑別診断上重要であり，また疫学的にも集団の感染危険の評価のための最も基本的なことである。これに対して，日本でも世界的にも行われてきたのは状況証拠（患者接触歴などから見た感染リスクの評価やBCG接種歴，過去のツベルクリン反応など）とツベルクリン反応検査成績に基づく便宜的な感染の蓋然性の評価であった。ことに近年患者接触者への健診とそれに基づく被感染者に対する化学予防がますます重視されるようになってからは，ツベルクリン反応検査に基づくこの便宜的な判定が，信頼性に問題があると考えられつつも広く行われている。院内感染にさらされる医療職員の結核管理における二段階ツベルクリン反応検査も同様である。ATS声明のように，BCG歴を無視してツ反陽性者には化学予防を勧告してきた例もある。人口集団の結核感染に関する疫学的研究

においても，最近の進歩といえばツベルクリン反応検査の数学的解釈（混合分布モデル）という，やはり便宜的なアプローチが試みられるようになったにすぎない。いずれにせよ，結核感染診断に関してはコッホ，ピルケー以後基本的には進歩はなかったと言わざるを得ない。

だが，ここに至って医学生物学の多くの領域での技術革新と並行して，この分野にもようやく実質的なブレイクスルーが訪れた。QuantiFERON[®]TB-2nd Generation (QFT2G)として商品化された全血インターフェロン γ アッセイ法の開発がそれで，ポイントは特異抗原の発見とそれを用いた細胞免疫応答の定量（インターフェロン γ のELISA原理による簡易アッセイ）にある。

この技術の実用化にあたっては治験を通して日本も一定の貢献を果たしている。本シンポジウムでは，この診断技術の開発に基礎，臨床，疫学の各分野で携わり，その知見の集積に努めてきた専門家にそれぞれの立場からこの技術の批判的検討をお願いした。

まず基礎の立場から原田博士は，結核菌感染による免疫機構とツベルクリン反応の機序について概説し，BCGの影響を受けずに特異的にこの免疫応答を引き出すQFT-2Gの可能性について説明された。さらにこの技術のさらなる向上の可能性に関して，とくにQFT-3Gについて，およびこれと相前後して発表されたもう一方の細胞免疫検査技術であるT-Spot[®]についても言及された。

高嶋博士は臨床免疫の立場から様々な結核あるいは関連疾患の臨床的スペクトルとQFT-2Gの関連を検討され，QFT-2G所見が単なる結核感染の有無の判定を越えた，奥の深い結核感染症の動態の反映であることを示唆された。

主として結核管理の立場から鈴木博士はQFT-2Gの実

際的応用に関して、これまでの種々の実践に基づいて検討し、今後の使用方法に関する提案をされた。

各演者が指摘されたこの技術の利点、欠点の十分な認識のもとにこれが多方面で応用され、結核対策、臨床

サービスに裨益することが望まれる。同時にこれが発展途上にある技術であることに鑑みて、次のそしてさらにその先の技術の開発につながるような研究の継続発展を望みたい。

1. QuantiFERON[®]TB 第二世代の基礎的特性

財団法人結核予防会結核研究所 原田 登之, 樋口 一恵, 森 亨

はじめに

現在有効な結核対策の一つとして、潜在結核感染者を見出し、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。従来、潜在結核感染の診断に用いられる方法は、唯一ツベルクリン反応検査(ツ反)だけであったが、BCG接種が広範に実施されている日本においてはツ反の低特異性のため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、現在結核菌等の遺伝子解析が進んだ結果、ツ反の持つ欠点を克服する新たな感染診断法 QuantiFERON[®]TB 第二世代(QFT-2G)が開発されるに至った。本ミニシンポジウムでは、QFT-2Gについて、その基礎的特性およびわれわれがこれまでに蓄積した結果を述べる。

ツ反とその欠点

ツ反による結核感染診断は、精製ツベルクリン(PPD)と呼ばれる加熱滅菌した結核菌培養濾液から部分精製した結核菌抗原の混合物を皮内に投与し、48時間後に投与部位における発赤、硬結等により診断するものである。ツ反はこれまでこれを上回る良い診断法が開発されなかったため、約1世紀にわたり全世界で広範に使用されてきた。しかし、ツ反は優れた診断感度をもつものの、特異性の点では重大な欠点をもっている。その原因は、ツ反に用いるPPDが数百種類もの異なった結核菌抗原を含み、そのほとんどのものがBCGや非結核性抗酸菌抗原と高い類似性をもつため、抗原として高い交差性を示すためである。BCG既接種者あるいは非結核性抗酸菌感染者においては、T細胞は既にこれらの抗原に感作されており、このようなT細胞からも生理活性因子の速やかな産生・分泌を誘導する。従って、結核未感染の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。

このため、BCG接種が広範に行われている日本では、ツ反による正確な結核感染診断はきわめて困難である。これがツ反のもつ最大の欠点であるが、これ以外にも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、ツ反測定のための再受診の必要性等の弱点をもつ。これらツ反のもつ欠点を克服するには、結核菌特異的の刺激抗原を用い、生体外で何らかの反応を測定することが考えられる。

Interferon- γ 誘導性結核菌抗原

1995年、デンマーク国立血清研究所のAndersenらのグループにより、結核感染させたマウス由来の記憶T細胞から高いInterferon- γ (IFN- γ)産生を誘導するESAT-6(The early secretory antigenic target 6 kDa protein)と呼ばれる結核菌抗原が、結核菌培養濾液から精製・同定され、さらにその遺伝子もクローニングされた。翌1996年MahairasらのグループがBCGと*M. bovis*の相違を遺伝子レベルで解析した結果、BCGにはRDと呼ばれる遺伝子領域が3カ所欠落しており、先のESAT-6遺伝子がBCGでは欠落しているRD-1に存在していることが報告された。さらにその後の解析の結果、ESAT-6はすべての*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。また、ESAT-6と同様に高いIFN- γ 産生を誘導する結核菌抗原CFP-10を発現する遺伝子が、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。これらの発見を基に、BCGには存在しないこれらの抗原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。

ESAT-6/CFP-10を用いた新規結核感染診断法

QFT-2Gの検査法を簡単に述べる。まずヘパリン採血した全血1mlを採血後12時間以内に抗原ESAT-6およびCFP-10で刺激し、37°Cで16~24時間培養する。次に培養後、血漿中に産生されたIFN- γ 量をELISAにより測定するものである(Fig. 1)。QFT-2Gでは、採血した翌日に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もなく、さらにツ反のように医療機関への再訪も必要としない。このように、QFT-2G は前述したツ反のもつすべての問題点を一挙に克服しうる診断法であると言える。

日本における QFT-2G の治験

われわれはいくつかの施設と協力し QFT-2G の治験を行った結果、治療開始前の塗抹陽性結核患者の大多数においては ESAT-6 か CFP-10 のいずれかの刺激に反応し、高い IFN- γ 産生が誘導されることが明らかになった。一方、BCG 既接種健康常者群は大部分が反応を示さなかつ

た (Fig. 2) 1)。これらの結果から、各抗原特異的 IFN- γ 産生量を算出し、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、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。本治験結果より、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。

本治験で得られたカットオフ値は、結核感染率の低い集団において感染のスクリーニングをすることを目的として設定された値であり、異なる集団に QFT-2G を用いる際のカットオフ値については議論の余地は残されている。既感染率が高い集団を対象にした場合、カットオフ

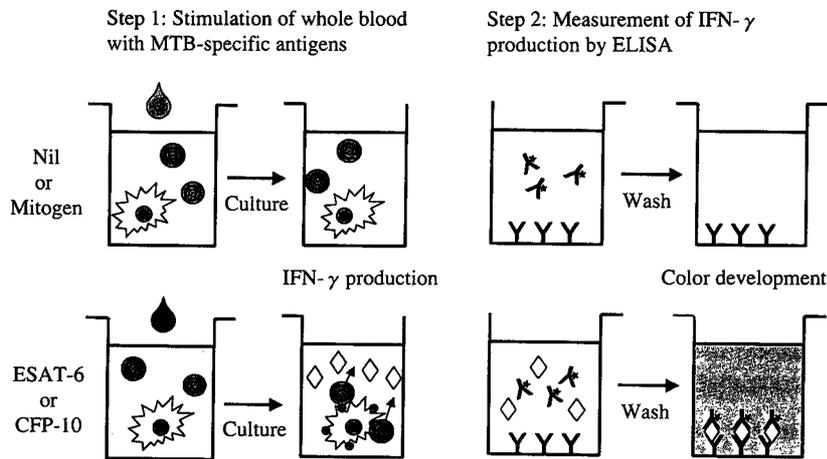


Fig. 1 Assay system of QuantiFERON[®] TB-2G

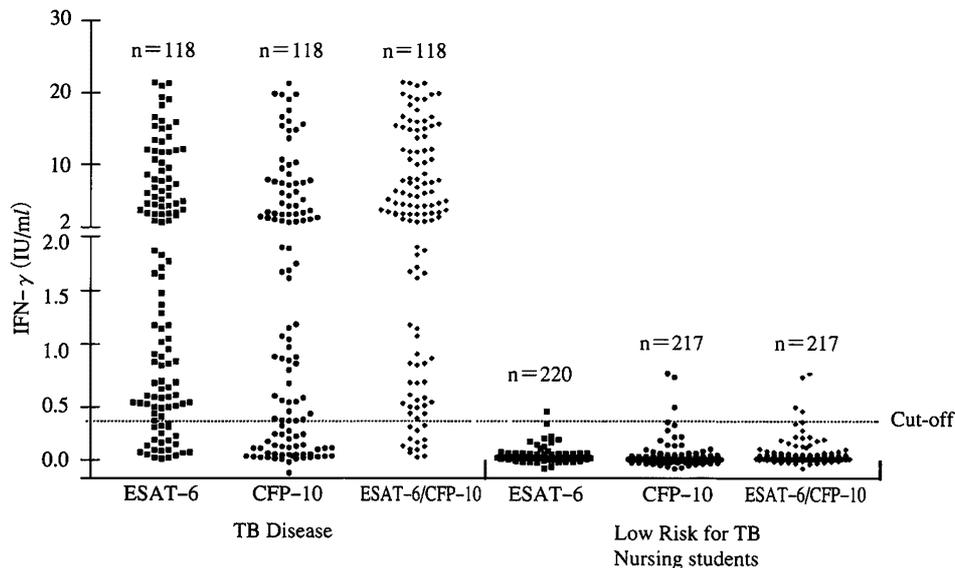


Fig. 2 Responses to ESAT-6 and CFP-10 for 118 culture-positive patients with tuberculosis (TB), and 213 subjects with a low risk for TB exposure. For ESAT-6/CFP-10, the data for the antigen (ESAT-6 or CFP-10) giving the highest response is shown. The dashed line represents the cut-off of 0.35 IU/ml for IFN- γ .

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

	Close contacts			Less close contacts			Comparison*	
	Tested	Positive	(%)	Tested	Positive	(%)	OR	p-value
ESAT-6	} 33	12	36.4	} 42	1	2.4	24.0	0.000
CFP-10		9	27.3		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.

値をより低く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と考え、現在われわれはIFN- γ 産生量0.1 IU/ml以上0.35 IU/ml未満の者を「疑陽性」に区分し、QFT-2G陽性者が高頻度で発生している濃厚接触集団においては疑陽性者に対しても化学予防を推奨している²⁾。もちろん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うえでの妥協的な対応を考えることも重要であろう。

接触者健診における QFT-2G 検査の パフォーマンス

前項で述べた治験で得られた QFT-2G の感度・特異度は、活動性結核患者を結核既感染者の代用モデルとして得られた結果であり、潜在結核感染の診断についてのではない。実際には潜在結核感染の絶対的基準が存在しないため、これを診断する方法の感度・特異度を検討することは不可能であるが、これまでにわれわれが数多くの接触者健診に際して QFT-2G を試行した結果、QFT-2G による潜在結核感染の診断も可能であるということが示唆されている。すなわち、結核患者との接触度合いと QFT-2G 陽性率が相関するという結果をいくつか得ており、次に紹介する。

このような事例の中で最も典型的なものは、専門学校男性講師が初発患者であった事例である³⁾。講師は2002年11月初旬より風邪様症状を発症していたが、12月24日受診し結核(ガフキー9号、学会病型bⅢ2)と診断された。専門学校における接触者は学生300人(年齢18歳~25歳)、職員38人であったが、特に学生のうち73人は2002年11月30日から12月5日にかけて講師と共に海外への修学旅行に参加し、現地でバスの移動等で濃厚な接触をしていた。本事例の接触者健診(ツ反およびX線検査、およびツ反歴)において、化学予防適応の基準であるツ反赤発30 mm以上の反応を示した者に対して QFT-2G 検査を実施した。その際、接触度海外修学旅行に参加した集団を濃厚接触群、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 (Table)。この事例の他にもいくつかの集団感染で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。このような事例から QFT-2G 検査を用いることにより潜在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。現在、当研究所抗酸菌レファレンスセンター免疫検査科の QFT-2G 検査依頼検体は、多くの場合接触者健診対象者であるが、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70%程度の者が QFT で陰性であったことから、これまでは過剰な予防内服を行っていた可能性が示唆されてきた。一方、ツ反30 mm以下の者においても少なからず QFT-2G 陽性者は存在しており、今後接触者健診に際しツ反に代わり 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げることができ、さらにツ反で見落とされていた感染者を見出すこともできるため、より効率の良い結核対策ができるであろう。

QFT-2G に関する今後の解決すべき課題

QFT-2G は最近開発された診断法であるため、今後解決されるべきいくつかの課題をもつ。その一つは、結核菌に感染した後、QFT-2G が陽性となるまでの期間についてである。現在 QFT-2G は接触者健診に多く用いられているが、この際通常の接触者健診を行いツ反発赤径により QFT-2G 検査対象者を決定する場合がほとんどである。従って、患者登録2カ月後程度に QFT-2G 検査を実施することになるが、この検査時期が感染後陽性となるのに十分であるか否かという問題である。これについては、個人の免疫能の強弱や感染結核菌の増殖能などにより陽性になる時期は一定しない可能性も考えられるが、ある集団感染事例を経時的に QFT-2G でフォローした結果では、QFT-2G 検査数カ月後に陽性化した例がある。一方、われわれは現在までに接触者健診対象者について数千例の検査を行っており、検査時点で QFT-2G が陰性であった者から発病したケースはこれまで4例のみであることから、概ね患者報告2カ月後程度で大部分の感染者は QFT-2G 陽性になると考えられる。現在、接触

者健診で QFT-2G を行った事例における 2 年後の状況を集計中であり、今後さらにデータが積み重ねられることが期待される。

第 2 の課題は、本検査法の幼児・新生児等への適応可能性である。現在のところ、QFT-2G の感度・特異度は成人を対象として得られた数値であるため、幼児・新生児等における QFT-2G の感度・特異度は不明である。この点について、まず現行の検査法では血液が 4 ml 必要であるが幼児・新生児でこの血液量の採取は困難を伴うため、半量で行う系を検討中である。

第 3 の課題は、QFT-2G 偽陰性を減らす、つまり感度を高めることである。これについては、QFT-2G の次世代の検査法 (QFT-3G) が一つ考えられる。QFT-3G は、採血管に抗原が予め添加されているため、採血直後から培養が開始でき、さらに ESAT-6/CFP-10 に加え新たな結核菌特異抗原も添加されているため、感度はさらに高くなる可能性がある。

もう一つの可能性として、T SPOT-TB と呼ばれる診断法がある。これは、対象者の血液より精製された末梢血単核球を ESAT-6/CFP-10 で刺激し、IFN- γ 産生 T 細胞数を ELISPOT 法により計測するものである。T SPOT-TB は一定数の精製末梢血単核球を刺激培養するため、特に HIV 感染者で T 細胞数が減少しているような者に対する感度の良い結核感染診断が期待できる。われわれは、現在 QFT-2G と T SPOT-TB 両者の感度・特異度を比較検討しており、T SPOT-TB が高感度であるという結果を得ている。ただし、T SPOT-TB は QFT-2G より手技が煩雑

であるため、多検体を一度に処理するには不向きであろう。

第 4 の課題は、化学治療および予防内服が QFT-2G 検査結果に及ぼす影響であるが、この点について検討し、終了直後では両者の群で依然として陽性率が高いという結果を得ている。QFT-2G 陽性というのは、現在体内に抗原提示が可能な程度の結核菌が存在していることを反映すると考えられるが、一方 ESAT-6/CFP-10 に特異的な記憶 T 細胞の寿命の問題も考えられることから、これに関する結論を得るには長期的な観察が必要であると思われる。この他にもいくつかの課題が考えられるが、いずれにせよ、さらなる知見を重ね、新規免疫学的結核感染診断法のより適切な使用法を提供することにより、結核対策に大きな貢献ができるものと確信している。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 原田登之, 森 亨, 穴戸眞司, 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.

2. QuantiFERON[®]TB 第二世代の臨床・疫学的応用

ちば県民保健予防財団 鈴木 公典
結核予防会結核研究所 原田 登之, 森 亨

はじめに

結核予防法の一部改正が平成 17 年 4 月より施行され、新しい結核対策が行われるようになった。新しい結核対策を効果的に行うためにも技術革新が必要で、なかでも新しい結核感染診断が求められ、感染診断のための免疫学的診断、特異抗原に対する全血インターフェロ γ 応答測定法 (QuantiFERON[®]TB 第二世代, 以下 QFT と略) が有力と考えられる。

新しい結核対策の患者発見の中でも接触者健診がより一層強化されることになり、QFT は対象者の中から感染者を発見し、化学予防に導き、発病を防ぐのに有用であり、医療従事者の健診にも応用が考えられる。本ミニシ

ンポジウムでは今までの発表例と自験例から接触者健診、医療従事者の定期健診、その他等についてまとめ、また今後の応用を述べる。

接触者健診

初発患者¹⁾は 17 歳の高校 2 年生、運動部所属、喀痰よりガフキー 7 号であった。高校は単位制のため学籍クラスでの授業は週 2 回のみで、毎日のホームルームは 10 分程度で、同一学年の他クラスの生徒と一緒に授業が多く、有症状時に授業・部活動で接した先生と生徒・親しい友人もあり、接触者健診の対象者は 185 名となった。2 カ月後にツベルクリン反応 (以下、ツ反) を実施し、その結果、全体のヒストグラムは一峰性で、30 mm 以上

の者で過去のツ反応と比べ20 mm以上大きくなったのは31名、あるいは10 mm以上大きくなった者は61名で、化学予防の決定は困難であった。このためツ反応に基づく50名以上の化学予防予定者に、二段階に分けてQFTを行い、その結果、疑陽性を含む陽性者は13名で、この13名に化学予防を行った。ツ反の大きいグループに比較的QFT陽性者(疑陽性含む)が多いが、30 mm台にも陽性者がおり、また接触状況との相関は明確ではなかった。

本事例では化学予防の選定にあたっては、ツ反の結果や接触状況のみではなく、QFTの結果を参考にすることにより適切な化学予防の実施が可能となった。すなわち化学予防者を絞り込むことができ、不必要な化学予防者がなくなった。またより正確な結核感染の診断を可能にし、感染範囲の特定に有用で、不必要に精検範囲を広げることがなくなり、健診を行うほうも健診を受けるほうも負担が軽減された。

若年者集団の事例²⁾で、某専門学校講師が初発患者で、講師が接触者健診対象学生の一部と海外研修に参加しており、研修参加グループを濃厚接触群73名、不参加グループを非濃厚接触群197名とすると、ツ反応は両群よく似ているが、濃厚接触群のほうが右方の裾が厚くみえ、かすかながら二峰性とみることもできた。ツ反応30 mm以上の者に行ったQFTでは、感染源との接触度の濃さの違いに応じた明確な陽性率の差が認められた。ただここでツ反応30 mm以上の者にQFTを行っているので、見落としのこともありカットオフ値を下げるとか、ツ反応20 mm以上の者にはQFTを行うことも考えられた。

塗抹陽性患者の発生があった小中高校の接触者健診³⁾

において、QFT陽性と判定されたのは193名中10名(陽性率5.2%)で、QFT検査対象外を未感染者(QFT-2G陰性)と仮定すると、全対象の陽性率は1.2%(10/869)であり、学童・生徒におけるツ反応強陽性は、95%までがBCG接種の影響であることを示唆していた。

また院内感染事例において⁴⁾前回と今回のツ反応発赤径の差が20 mm以上でもQFTは陰性のことがあり、逆に発赤径が20 mm台のものにもQFT陽性がいた。つまり従来では前者は感染とされ化学予防の対象になり、また後者は感染が否定され化学予防からもれることになる。

対象として最濃厚、濃厚接触群が数十名、外来受診者その他接触群が数千名のように数が多い事例⁵⁾では、BCG既接種者でツ反応10 mm以上の最濃厚、濃厚接触者には全例QFTを行うことにより、根拠をもって健診範囲の決定ができ、化学予防者の選定に有用であった。最終的に3名に化学予防を行い、2年経過した現在新たな発病者は出ていない。

以上の事例から今後の接触者健診の際、基本的には「保健所における結核対策強化の手引きとその解説」⁶⁾における接触者健診の対象、時期および内容(感染源追求のための措置について)の表でツ反応と記載された箇所をQFTに置き換えればよいと考える。

接触者健診におけるQFTの応用では、人数に応じて2つに分け、まず家族健診等人数が少ない時では、QFTを原則的に最初から用い、医療従事者はQFTあるいは二段階ツ反応のベースラインの有無に応じて用いる。次に対象人数が多い時では、濃厚接触者にツ反応をまず行い、ツ反応20 mm以上にQFTを実施し、濃厚接触者の感染状況をみて非濃厚接触者に健診の範囲を拡大してい

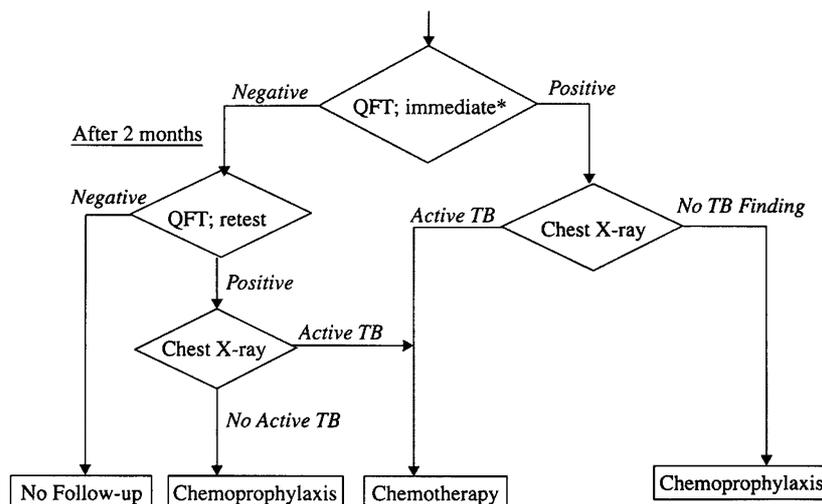


Fig. 1 Actions on QFT results in contact examination
(*Within 2 months of the last contact with index case)

くことが考えられる。

接触者健診において感染危険度指数が最重要の場合、例えば成人 (Fig. 1) では登録直後にはまず QFT を行い、QFT 陽性であれば X 線陰影の有無に応じて治療か化学予防となる。QFT 陰性であれば 2 カ月後に再 QFT 検査とする。登録直後に QFT が陰性だった者が 2 カ月後に QFT 陽性であれば、X 線陰影の有無に応じて治療か化学予防となり、QFT 陰性であれば終了とする。ただし、特に登録直後の場合には化学予防の実施は年齢、接触状況等から総合的に判断する。

定期健診

QFT は医療従事者の定期健診、雇入れ時などにおける応用である。結核病床がある病院の職員 332 名 (平均年齢 41 歳) に QFT を行い⁷⁾、陽性率は 9.9% で対象者の年齢構成から推定される既感染率 10.8% とほぼ一致し、外来勤務歴あるもの、結核病棟勤務歴があるもの、年齢が高いほど陽性率が高かった。またツ反応発赤径が 80 mm 以上あるものでも陽性率は 35% であった。

別の結核病床がある病院の職員 129 名 (同 37 歳)⁸⁾では、陽性率は 5.4%、ツ反応陽性中では 14.8% (4/27) であった。二段階ツ反応でベースラインが 37 mm から 60 mm に増大した例でも QFT は陰性であった。

医療系学校における定期健診時では陽性率は 2.1% (4/188) で、高齢者施設の職員 164 名 (同 36 歳) では陽性率は 1.8% であった。

高齢者施設の入所者 167 名 (同 85 歳) では 18.6%、別の施設入所者 68 名 (同 80 歳) では 26.5% で、ツ反応から推定される既感染率よりかなり低かった。

以上の事例から結核感染危険率が低下し、BCG 接種が普及している現在の日本では、二段階ツ反応を含めてツ反応の大きさから感染を判断するのは困難なことが多いと考えられる。今後は医療従事者の雇入れ時 (Fig. 2) には、QFT 陰性であれば経過観察とし、QFT 陽性であれば X 線陰影の有無に応じて措置する。次に定期健診時 (Fig. 3) には結核専門病院、一般病院にかかわらず一度全職員に QFT を検査し、ベースラインをもっておくことが勧められる。結核病棟の勤務者等でリスクがある者

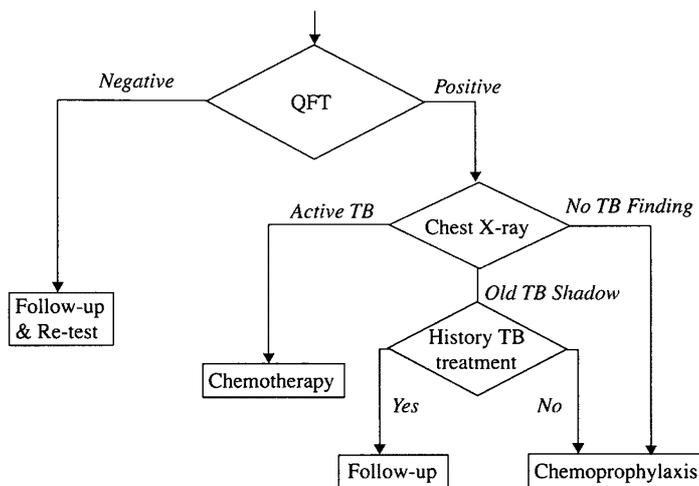


Fig. 2 Use of QFT at the employment of healthcare workers

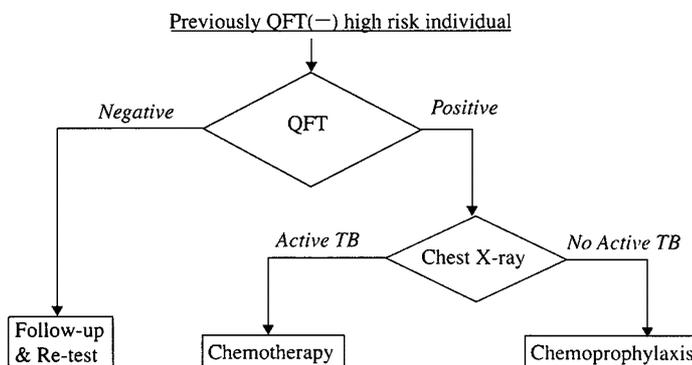


Fig. 3 Actions on high risk individuals with previously negative QFT

にはQFT検査を毎年行うことが考えられるし、一般病院等の勤務者でリスクがそれほどない者には毎年行う必要はない。

リスクがある場合にはQFTのベースライン値が陰性の者にQFTを実施し、再び陰性であれば翌年の定期健診時に行うこととする。陽性であればX線陰影の有無に応じて措置するが、これは多くは前回のQFT検査から今回の検査の間に感染したと考えられる。

ハイリスク者

ハイリスク者の化学予防においてもQFTが応用できる。日本結核病学会予防委員会、有限責任中間法人日本リウマチ学会の「さらに積極的な化学予防の実施について」¹⁰⁾の中で、例えば副腎皮質ステロイド薬(1日に10mg以上のプレドニゾロンと同等量)の投与を1カ月以上予定している場合、慢性関節リウマチ等でTNF α 阻害剤を用いる予定の者、糖尿病患者で陈旧性陰影のある者ではツ反応検査の代わりにQFTを用い、陽性者には化学予防が考えられる。ただし、既に細胞免疫が抑制されている場合には、既感染であっても陰性となることがあるので注意すべきである。また古い結核感染の場合にも陰性に出ると考えられるので、化学予防の適応とされる線維化巣をもつ者がQFT陰性のこともある。

有用性と問題点

QFTの有用性は、BCG接種の影響を受けずに感染を診断でき、1回の採血(受診)で結果が翌日わかり、繰り返し行えることである。これらのことにより対象者の中から容易に感染者を診断し、化学予防へ導くことが可能になったといえる。問題点は、採血後12時間以内に抗原刺激が必要で、感染から陽性になるまでの期間や偽陰性、見落としの点である。また小児では採血量等を含めた問題や、高齢者では陽性率がツ反応により推定される既感染率に比べかなり低い点がある。さらにこの検査が普及していくには、価格的に求めやすく、身近なところで検査できることが必要である。

3. 結核症の病態におけるインターフェロン γ の意義

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 高嶋 哲也

はじめに

インターフェロン γ (IFN- γ)は分子量が40kDaから70kDaの糖タンパクで、種々の刺激によってCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞およびNK細胞等から産生される。

ま と め

QFTはいくつかの解決すべき問題点もあるが、結核感染診断において有用性がある。今後接触者健診、医療従事者の雇入れ時や定期健診、ハイリスク者の化学予防に用いられ、さらに乳幼児や小学校の定期健診、高齢者施設の入所時や定期健診にも応用される可能性があると考えられる。

文 献

- 1) 大場有功, 金田美恵, 大橋里恵子, 他: クオンティフェロンTB検査を利用した結核定期外健診(集団)について. 第43回千葉県公衆衛生学会演題抄録集. 2005. 55.
- 2) 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.
- 3) 原田登之, 樋口一恵, 関谷幸江, 他: 新規結核感染診断法による学校における結核集団感染の解析. 結核. 2004; 79: 198.
- 4) 福永 肇, 江田良輔, 竹山博泰, 他: 病院内接触者検診における新規結核感染診断法による解析. 結核. 2004; 79: 199.
- 5) 宮下裕文, 原田登之, 樋口一恵, 他: 接触者検診におけるQFT-2Gの応用可能性について. 結核. 2004; 79: 200.
- 6) 森 亨編: 「保健所における結核対策強化の手引きとその解説」, 結核予防会, 東京, 2000, 31.
- 7) 中島由槻, 原田登之, 樋口一恵, 他: 結核診療施設職員における結核感染の状況—QuantiFERON-Goldによる感染診断の試み—. 結核. 2004; 79: 197.
- 8) 小川賢二, 多賀 取, 山田憲隆, 他: 当院職員におけるQFT-2G(ESAT6, CFP10)とツベルクリン反応の比較. 結核. 2004; 79: 198.
- 9) 鈴木公典, 小野崎郁史, 志村昭光, 他: 高齢者におけるQuantiFERON-TB第二世代の検討. 結核. 2004; 79: 200.
- 10) 日本結核病学会予防委員会, 有限責任中間法人日本リウマチ学会: さらに積極的な化学予防の実施について. 結核. 2004; 79: 747-748.

BCGあるいは結核菌を感染させたIFN- γ 遺伝子ノックアウトマウスでは感染臓器での肉芽腫形成や遅延型過敏反応を認めるが菌の増殖を抑制できず早期に死亡する。ヒトでもIFN- γ シグナル伝達系遺伝子に変異がある個体での播種性非結核性抗酸菌症による死亡例が数多く報

告されている。そして、マウスのマクロファージを用いた *in vitro* の感染実験では IFN- γ は TNF- α と共に酸化窒素 (NO) 産生系を介して結核菌の殺菌に直接関与することが示されており、IFN- γ は抗結核免疫において不可欠なサイトカインである。

近年、末梢血液での IFN- γ 産生を指標とする新しい結核感染診断法として QuantiFERON[®]TB 第二世代検査 (以下、QFT-2G 検査) が開発された。本検査に用いる ESAT-6 と CFP-10 は非結核性抗酸菌症の大部分を占める *M. avium* や *M. intracellulare* あるいは結核の予防接種に用いる BCG には発現されていないことから、QFT-2G 検査は結核菌感染と非結核性抗酸菌感染の鑑別や BCG 接種歴のある個体での結核感染の診断に有用であると報告されている。しかし、感染免疫の発現は病期や重症度などによって異なるので、免疫反応を指標とする検査には一定の限界がある。われわれは活動性肺結核患者の胸部 X 線所見や排菌量などの臨床状態の QFT-2G 検査への影響や、抗結核治療によって菌陰性化した患者での ESAT-6 と CFP-10 に対する反応性について検討したので報告する。

活動性肺結核の診断における QFT-2G 検査の有用性

臨床症状ならびに胸部 X 線所見から活動性肺結核が強く疑われる未治療例を対象に、活動性肺結核の診断における QFT-2G 検査の有用性を検討した。被験者に本研究の主旨を説明し、文書で研究参加への同意を得た。検体採取は抗結核治療開始前あるいは治療開始後 1 週間以内とし、ツベルクリン皮内反応検査の実施前もしくは実施 4 日目以降に静脈血液 5 ml をヘパリン採血した。採血後 6 時間以内に抗原刺激を行い、16~20 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の IFN- γ は QFT-2G 検査キットを用いて測定した。判定は ESAT-6 および CFP-10 による IFN- γ 値から生理食塩水の陰性対照の値を差し

引き、ESAT-6 あるいは CFP-10 のいずれかの値が 0.35 IU/ml 以上を陽性とした。

対象中の活動性肺結核は 62 例であった。うち、喀痰培養陽性 55 例中の ESAT-6 陽性は 49 例 (89.1%)、CFP-10 陽性は 39 例 (70.9%)、いずれか陽性は 52 例 (94.5%) であった。喀痰培養陰性 7 例中の ESAT-6 陽性は 5 例 (71.4%)、CFP-10 陽性は 6 例 (85.7%)、いずれか陽性は 7 例 (100%) であった。肺 *M. kansasii* 症の 5 例中 2 例と肺 MAC 症の 5 例中 1 例は ESAT-6 と CFP-10 の両方に陽性であった。肺 MAC 症の陽性例は肺結核の既往歴があった。一方、肺炎 5 例はすべて陰性であった (Table 1)。

次に、肺結核初回治療 57 例を対象に臨床像と QFT-2G 検査成績との関連について検討した。胸部 X 線所見別では、学会分類の III 1, 2, 3 は 30 例中 29 例 (96.7%)、II 1, 2 は 21 例中 20 例 (95.2%)、I と II 3 は 6 例中 5 例 (83.3%) が QFT-2G 検査陽性であった。排菌状況別では、塗抹陰性は 25 例中 22 例 (88.0%)、塗抹 1+ は 22 例中 22 例 (100%)、塗抹 2+ は 6 例中 6 例 (100%)、塗抹 3+ は 4 例中 4 例 (100%) が陽性であった。培養成績別では、培養陰性は 7 例中 7 例 (100%)、培養 1+ (1~200 コロニーおよび MGIT 陽性) は 26 例中 23 例 (88.5%)、培養 2+ (201~500 コロニー) は 10 例中 10 例 (100%)、培養 3+ (501~200 コロニー) は 5 例中 5 例 (100%)、培養 4+ (2001 コロニー以上) は 9 例中 9 例 (100%) が陽性であった。培養 1+ の群に含めた MGIT のみ陽性 6 例は 5 例 (83.3%) が陽性であった。なお、QFT-2G 検査陰性の 3 例は、ツベルクリン皮内反応検査が陰性であった 14 歳女児、クローン病を合併した 32 歳男性および病巣広範例 (学会分類 bII 3) の 76 歳男性で、いずれも喀痰培養は陽性であった。

肺結核の病期と QFT-2G 検査成績

結核菌陽性の記録がある未治療、治療中および治療の肺結核患者を対象に、QFT-2G 検査の陽性率と PHA、

Table 1 Performance of cellular immune responses to ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of pulmonary tuberculosis*

Diseases	ESAT-6 (%)	CFP-10 (%)	Total (%)
Culture positive TB			
Newly diagnosed (n=50)	44 (88.0)	36 (72.0)	47 (94.0)
Previously treated (n=5)	5 (100.0)	3 (60.0)	5 (100.0)
Culture negative TB			
Newly diagnosed (n=7)**	5 (71.4)	6 (85.7)	7 (100.0)
<i>M. kansasii</i> (n=5)	2 (40.0)	2 (40.0)	3 (60.0)
MAC (n=5)***	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (20.0)
Pneumonia (n=5)	0	0	0

*Cut-off value of the ESAT-6 and CFP-10 antigens was 0.35 IU/ml.

**Two cases were sputum TB-PCR-positive.

***The positive case had been previously treated for pulmonary tuberculosis.

Table 2 Results of cellular immune responses to ESAT-6 and CFP-10 by clinical stages of pulmonary tuberculosis

Stages	ESAT-6 (%)	CFP-10 (%)	Total (%)
Drug-susceptible TB			
Before treatment			
Newly diagnosed (n=50)	44 (88.0)	36 (72.0)	47 (94.0)
Previously treated (n=4)	4 (100.0)	3 (75.0)	4 (100.0)
Cured (n=14)	8 (57.1)	4 (28.6)	9 (64.3)
MDR-TB			
Before treatment			
Previously treated (n=1)	1 (100.0)	0	1 (100.0)
Under treatment			
Culture positive (n=5)	4 (80.0)	2 (40.0)	4 (80.0)
Culture negative (n=6)	4 (66.7)	1 (16.7)	4 (66.7)
Cured (n=8)	6 (75.0)	3 (37.5)	7 (87.5)
Drug susceptibility unknown			
Cured (n=7)	5 (71.4)	3 (42.9)	5 (71.4)

Table 3 IFN- γ levels to PHA, ESAT-6 or CFP-10, before and after anti-tuberculosis chemotherapy

	PHA (IU/ml)	ESAT-6 (IU/ml)	CFP-10 (IU/ml)
Newly diagnosed (n=50)	14.3 \pm 6.2	6.4 \pm 6.6	4.4 \pm 6.0
Cured (n=14)*	21.2 \pm 7.6	0.8 \pm 0.9	0.9 \pm 1.8
Mann-Whitney U-test	p < 0.0085	p < 0.0006	p < 0.0034

*The average duration of sputum culture-negativity after anti-tuberculosis chemotherapy was 66 months (Range: 10-329)

ESAT-6およびCFP-10刺激によるIFN- γ 値を検討した。未治療は55例中52例(94.5%)、治療中・結核菌陽性は5例中4例(80.0%)、治療中・結核菌陰性は6例中4例(66.7%)、治癒は29例中21例(72.4%)がQFT-2G検査陽性であった。統計的有意差は見られなかったが、未治療群に比べ治癒群の陽性率が低かった(Table 2)。次にIFN- γ 値を菌陰性化後の月数でプロットし、抗結核化学療法による菌陰性化後のESAT-6とCFP-10に対する反応性の変化を検討した。PHA刺激によるIFN- γ は菌陰性化後に上昇し、ESAT-6およびCFP-10は低下する傾向にあった。しかし、多剤耐性結核や薬剤感受性成績が不明の症例の中には、所定の抗結核化学療法を終了して菌陰性化した後もESAT-6およびCFP-10によるIFN- γ 産生が高値の例が見られた。

次に、未治療の肺結核患者50例と、初期強化短期化学療法によって治癒した14例を対象に、PHA、ESAT-6およびCFP-10の刺激によるIFN- γ 産生値を比較検討した。なお、いずれもINH、RFP、SM、EBの一次薬に対する感受性は確認されている。治癒群の菌陰性月数は10~329月間、平均66月間であった。治癒群のPHAによるIFN- γ 値は未治療群に比べ有意に高値であったが(14.3 \pm 6.2 IU/ml, 21.2 \pm 7.6 IU/ml; p < 0.0085)、治癒群

のESAT-6 (6.4 \pm 6.6 IU/ml, 0.8 \pm 0.9 IU/ml; p < 0.0006)とCFP-10 (4.4 \pm 6.0 IU/ml, 0.9 \pm 1.8 IU/ml; p < 0.0034)に対する反応は未治療群に比べ有意に低値であった(Table 3)。同一症例での初期強化短期化学療法の前(2002年7月)と後(2005年3月)のPHAによるIFN- γ 値は19.4 IU/mlから31.3 IU/mlへ上昇していた。一方、ESAT-6およびCFP-10に対する反応はそれぞれ17.9 IU/mlから3.0 IU/ml, 0.35 IU/mlから0.06 IU/mlへ低下していた。

まとめ

本検討では、活動性肺結核62例中59例(95.2%)がESAT-6あるいはCFP-10のいずれかに陽性であり、うち初回治療例は57例中54例(94.7%)、再治療は5例中5例(100%)が陽性であった。胸部X線所見別では学会分類のⅢ1, 2, 3は30例中29例(96.7%)、排菌状況別では喀痰塗抹陰性の25例中22例(88.0%)、喀痰培養陰性の7例中7例(100%)が陽性であった。QFT-2G検査は感度が高く、胸部X線所見の重症度や排菌量に影響されないことから、活動性肺結核の早期診断に有用である。なお、菌陽性肺結核であっても免疫低下がある個体では陰性となる可能性があり、注意が必要である。

ところで最近の RFLP 分析を用いた培養陽性結核患者の疫学研究によれば、喀痰塗抹陰性肺結核患者の感染指数は喀痰塗抹陽性肺結核患者の数分の 1 と報告されており、喀痰塗抹陰性肺結核の早期診断は感染の拡大防止に効果的である。本研究から QFT-2G 検査は喀痰塗抹陰性肺結核の早期診断に有用であり、その臨床応用は今後の結核対策に大きく寄与するものと期待される。

近年、高齢者において結核の外来性再感染が確認されるなど、抗結核感染免疫も終生免疫でないことは明らかである。この抗結核感染免疫は T 細胞が菌体成分を認識することによって成立・維持されるので、化学療法によって結核菌が体内から駆逐されれば抗結核感染免疫を担うメモリー T 細胞や IFN- γ を産生するエフェクター T 細胞が徐々に消失すると考えられる。QFT-2G 検査は結核菌分泌抗原である ESAT-6 および CFP-10 の刺激による T 細胞からの IFN- γ 産生を指標としているため、治癒例ではその反応性は低下もしくは陰性化することが

予想される。今回の検討では初期強化短期化学療法による治癒群の QFT-2G 検査の陽性率は未治療群に比べ低く、治癒群の ESAT-6 および CFP-10 による IFN- γ の産生も未治療群に比べ統計学的に有意に低値であった。同一症例での検討でも、化学療法によって菌陰性化した後の ESAT-6 あるいは CFP-10 に対する反応性は低下することが確認された。しかし、多剤耐性や薬剤感受性が不明の治癒例の中には ESAT-6 あるいは CFP-10 に強く反応する症例が認められた。今後、このような症例は臨床的には治癒であっても体内から結核菌を完全には駆逐できていない可能性がある。治療終了後も ESAT-6 あるいは CFP-10 に対する反応性が強く持続する症例の追跡調査を行うことによって、抗結核特異免疫の持続と再発リスクとの関連が明らかとなれば、抗結核特異免疫の動向から抗結核化学療法による治療の成否を予測できるようになるかもしれない。

————— The 80th Annual Meeting Mini-Symposium —————

THE INTERFERON- γ TEST IN PERSPECTIVE

Chairperson: Toru MORI

Abstract QuantiFERON[®]TB-2nd Generation, the whole blood interferon- γ assay using novel specific antigens, has opened a new way to the diagnosis of tuberculosis infection, unaffected by history of BCG vaccination. The symposium discussed this new diagnostic technique from basic, clinical and epidemiological points of view. It is clear that this technique is far superior to the tuberculin skin test, so that it will replace the latter classical procedure in various settings. However, further studies and experiences are needed to elucidate the performances of this diagnostic method, and to overcome its shortcomings in terms of the sensitivity and other practical conditions.

1. Basic characteristics of QuantiFERON[®]TB-2nd Generation: Nobuyuki HARADA, Kazue HIGUCHI, Toru MORI (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

QuantiFERON[®]TB-2G (QFT-2G) is a newly developed method for diagnosing tuberculosis infection based on whole-blood interferon-gamma measurement. By measuring cellular immune responses to ESAT-6 and CFP-10 which are *M. tuberculosis* antigens absent from all strains of BCG and from most non-tuberculous mycobacterial species, QFT-2G can diagnose tuberculosis infection with both high sensitivity and specificity in BCG vaccinated individuals. In this mini-symposium, we presented the basic characteristics of QFT-2G and our accumulated data on contact investigations. We also pointed out some problems of QFT-2G which should be solved in the near future.

2. Clinical epidemiological application of QuantiFERON[®]TB-2G: Kiminori SUZUKI (Chiba Foundation for Health Promotion and Disease Prevention), Nobuyuki HARADA, Toru MORI (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

Although some problems remain to be solved in its application, QuantiFERON[®]TB-2nd Generation (QFT), the whole blood interferon assay technique using novel antigens has been shown useful in the diagnosis of tuberculosis infection not influenced by the history of BCG vaccination. QFT can be

extensively used in the contacts examination, as well as in the tuberculosis prevention of health care workers in their examination on employment and periodic check-up. Also, it may be used in the clinical setting for the indication of treatment of latent tuberculosis infection in patients at any possible risk of tuberculosis development.

3. Cellular immune responses to ESAT-6 and CFP-10 in patients with *Mycobacterium tuberculosis* infection: Tetsuya TAKASHIMA (Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases)

We evaluated the cellular immune responses to PHA, ESAT-6 and CFP-10 in patients with pulmonary tuberculosis, before and after anti-tuberculosis chemotherapy. Of 50 newly diagnosed cases with sputum culture-positive results, 47 (94.0%) responded to either ESAT-6 or CFP-10. However, of 14 cured cases who had pulmonary tuberculosis caused by drug-susceptible organisms and had completed anti-tuberculosis chemotherapy with regimens including both INH and RFP, only 9 (64.3%) responded to those antigens. Mean IFN- γ level (IU/ml) to PHA was higher in cured cases than in newly diagnosed cases (21.2 ± 7.6 vs. 14.3 ± 6.2). However, those to ESAT-6 and CFP-10 were significantly lower in cured cases than in newly diagnosed cases (0.8 ± 0.9 vs. 6.4 ± 6.6 , and 0.9 ± 1.8 vs. 4.4 ± 6.0 , respectively). The cellular immune response to ESAT-6 or CFP-10 is a useful diagnostic tool for *Mycobacterium tuberculosis* infection. The decline of IFN- γ levels to ESAT-6 and CFP-10 after anti-tuberculosis chemotherapy might indicate the treatment success.

Key words: Tuberculosis infection, QuantiFERON, Interferon-gamma, Tuberculin test

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

Correspondence to: Toru Mori, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: tmori@jata.or.jp)