

第83回総会ミニシンポジウム

I. ワクチン研究の現在と将来

座長 ¹小林 和夫 ²菅原 勇

キーワード：改良 BCG, 弱毒結核菌, 成分ワクチン, DNA ワクチン, 感染曝露前（予防）ワクチン, 感染曝露後（治療）ワクチン

発表者：

1. 新しい結核 DNA ワクチン

岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
臨床研究センター）

2. BCG vaccine trials in South Africa

Gregory HUSSEY (South African Tuberculosis Vaccine
Initiative, University of Cape Town, Cape Town, South
Africa)

3. Present and future of TB vaccine development research

Peter ANDERSEN (Statens Serum Institute, Copenha-
gen, Denmark)

4. Comments and directions in research and development of TB vaccines

Jerald C. SADOFF (Aeras Global TB Vaccine Founda-
tion, Bethesda, Maryland, USA)

全世界で約20億人（全人口の3分の1）が結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）に既感染、すなわち、無症候性潜伏感染し、毎年920万人が結核を発病、170万人（後天性免疫不全症候群合併23万人を含む）が死亡している（<http://www.who.int/tb/en/>）。今後10年間に、少なくとも8000万人が結核を発病、2000万人が死亡することが推定されている。

日本（2006年）では年間2.6万人（罹患率人口10万対：20.6）が結核を発病し、2.3千人（死亡率：1.8）が死亡し、日本においても結核対策は重要な課題である。Robert Kochが1882年に「結核菌」を発見、爾来、120年余が経過した現在でも、国内外を問わず、結核は人類に甚大な

健康被害を提供し続けている。

結核対策における世界的課題として、①薬剤耐性結核菌の出現や蔓延および②HIV-結核菌の重複感染がきわめて重要である。これらの課題を克服する科学的戦略は「安全で有効な結核ワクチン」である。現行結核ワクチンである bacillus Calmette-Guérin (BCG) は乳幼児結核に有効であるが、潜在性結核菌感染を基盤とした多くの成人肺結核や内因性再燃結核に対する BCG 接種の有効性は疑問視されている。

世界保健機関 (WHO) は2015年までに現行 BCG を凌駕する新規結核ワクチンの開発を目指している。新規結核ワクチンの開発戦略は「予防・治療：感染曝露前（予防的）や感染曝露後（治療的）ワクチン」、「ワクチン製剤：改良型 BCG, 弱毒結核菌, 成分ワクチンや DNA など遺伝子ワクチン」、「接種方法：Prime や Prime-boost ワクチン」などの視点から進捗しており、前臨床試験、さらに、第1相など臨床試験で評価され、有望なワクチン候補が開発されつつある。

第83回日本結核病学会総会（石川信克会長）において、ミニシンポジウム「ワクチン研究の現在と将来」を企画し、世界の第一線で活躍されている気鋭の結核ワクチン研究者が結核ワクチン開発の現況や将来展望を発表した。ミニシンポジウム「ワクチン研究の現在と将来」が会員諸氏に有用な情報を提供、そして、研究室から臨床に迅速・効率的に“橋渡し (Translation)”し、究極的に人類に甚大な健康被害を提供し続けている結核の制圧に寄与することを祈念している。

¹国立感染症研究所免疫部、²結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター

連絡先：小林和夫, 国立感染症研究所免疫部, 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 (E-mail: kobayak@nih.go.jp)
(Received 16 Jul. 2008)

1. 新しい結核 DNA ワクチン

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター 岡田 全司

1998年、アメリカ合衆国疾病対策予防センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) および Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET) は新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した。しかしながら、BCG ワクチンに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。結核ワクチンは、DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチン、サブユニットワクチンに大別される。DNA ワクチンは予防ワクチン効果の切れ味ではほかより優れていることが多く、安定性・経済的にも優れている。われわれは BCG ワクチンをはるかに凌駕する 1 万倍強力な結核予防ワクチン効果を示す新しい DNA ワクチン (HVJ-エンベロープ/HSP 65+IL-12 DNA ワクチン) を開発した。

〔マウス〕の結核感染系では BCG ワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない。われわれはプライム・ブースター法を用い、HSP 65 DNA+IL-12 DNA (HVJ-エンベロープベクター) のワクチンは BCG ワクチンよりも 1 万倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。このワクチンは、結核菌由来の HSP 65 蛋白抗原特異的な、CD8 陽性キラー T 細胞および interferon: IFN- γ 産生 T 細胞の分化も増強した。肺の結核病理像の改善効果も示した。さらに生体内において、CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞の両者がこの結核予防ワクチンに必要であることを明らかにした。

〔治療ワクチン〕さらに、このワクチンは治療結核ワクチン効果も示した。すなわち結核菌をあらかじめ投与したマウスにおいて HVJ-エンベロープ/HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンを 3 回治療投与すると、コントロール群に比較して有意差をもって肺・肝・脾の結核菌数の減少を認めた。多剤耐性結核菌や超薬剤耐性結核 (XDR-TB) に対しても治療ワクチン効果を示した。欧米では治療ワクチンは未開発である。モルモット (結核菌吸入感染系) の系でもこのワクチンは BCG より有効であった。〔新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu〕を用いてもワクチン効果を示した。

さらに、〔ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザル〕 (Nature Med. 1996) を用い、HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの強力な有効性を得た。カニクイザルに 3 回ワクチン接種後 4 週間後にヒト結核菌を経気道投与し、1 年以上経過観察した。リンパ球増殖反応・サイトカイン (IFN- γ , IL-2 等) 産生の増強および胸部 X

線所見・血沈、体重の改善効果が認められた。さらに、生存率改善・延命効果も認められた。DNA ワクチン投与群は 50% の生存率であり、コントロール群は生存率 0% であった。さらに、サルでプライム-ブースター法を用いて、より強力なワクチン開発を行った。その結果、BCG ワクチン・プライム-DNA ワクチン・ブースター法を用いた群は 100% の生存率を示した。一方、BCG ワクチン単独群は 33% の生存率であった。成人に対して切れ味の鋭い強力な新しい結核ワクチンが切望されているが、BCG ワクチンは乳幼児でほぼ全員に実施されていることより HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンが強力な成人ワクチンとなることが示唆された。WHO STOP TB VACCINE Meeting でこのワクチンはきわめて高い評価を受けた。さらに、このワクチンを鼻粘膜または気道内ワクチンとして投与を試みつつある。さらに、カニクイザルの系で治療ワクチン効果およびプライムとブースターの期間を長期間とって、プライム-ブースター法を研究中である。(共同研究者: 当臨床研究センター 喜多, 井上, 坂谷 各博士, 金丸, 橋元, 西田, 仲谷, 高尾, 栖原, 岸上 各研究員, R. Gelber 博士, B. Tan 博士, 中島俊洋博士, 長澤鉄二博士, 吉田栄人博士, 松本真博士, 金田安史博士, D. McMurray 博士, 厚生労働科学研究費補助金の支援による)

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine; a combination of the DNA vaccines expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP 65) and interleukin 12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-envelope and -liposome (HSP 65+IL-12/HVJ). This vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse and guinea pig models compared to the BCG vaccine on the basis of C.F.U of number of TB, survival, an induction of the CD8 positive CTL activity and improvement of the histopathological tuberculosis lesions. This vaccine provided therapeutic efficacy against multi-drug resistant TB (MDR-TB) and extensively drug resistant TB (XDR-TB) (prolongation of survival time and the decrease in the number of TB in the lung) as well as protective efficacy in murine models. Furthermore, we extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. This novel vaccine provided a higher level of the protective efficacy than BCG based upon the assessment of mortality, the ESR, body weight, chest X-ray findings and immune responses (IFN- γ , IL-2, IL-6 produc-

tion, and lymphocyte proliferation of cynomolgus monkey). All monkeys in the control group (saline) died within 8 months, while 50% of monkeys in the HSP 65+IL-12/HVJ group survived more than 14 months post-infection (the termination period of the experiment). Furthermore, the combination of HSP 65+IL-12/HVJ and BCG by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). In contrast, 33% of monkeys from BCG Tokyo alone group were alive (33% survival). Furthermore, this vaccine exerted therapeutic efficacy in the TB-infected monkeys. These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against *Mycobacterium tuberculosis* for human clinical trials.

References

- 1) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP 65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine*. 2007 ; 25 : 2990–3.
- 2) Nakano H, Nagata T, Suda T, et al.: Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to an epitope on antigen 85A. *Vaccine*. 2006 ; 24 : 2110–9.
- 3) Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, et al.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine*. 2006 ; 24 : 1191–204.
- 4) Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005 ; 23 : 2132–5.
- 5) Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al.: Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect Immun*. 2004 ; 72 : 2014–21.

2. BCG vaccine trials in South Africa

South African Tuberculosis Vaccine Initiative, University of Cape Town Gregory HUSSEY

The South African Tuberculosis Vaccine Initiative, located within the University of Cape Town, has been involved in a number of BCG vaccine trials over the last few years and in this presentation I will highlight results from some of our studies.

A randomized trial comparing the efficacy of percutaneous versus intradermal BCG in the prevention of tuberculosis disease in infants and young children

Intradermal BCG vaccine is currently recommended by the World Health Organization (WHO). Prior to this study, no randomized trial comparing the relative incidence of tuberculosis following intradermal as opposed to percutaneous BCG vaccination had been conducted. 11680 South African newborns were randomized to receive Tokyo 172 BCG vaccine via either the percutaneous (n=5775) or the intradermal (n=5905) route within 24 hours of birth and then followed up for 2 years to document and investigate adverse events and suspected tuberculosis (TB) disease. The cumulative incidence of tuberculosis over two years of follow up was 6.13% [95.5%CI: 5.52–6.79%] in the intradermal group and 6.49% [5.86–7.18%] in the percutaneous group. No significant differences were found between the routes in the cumulative incidence of adverse events. Our results suggest that the WHO should consider revising its policy of preferential intradermal vaccination to allow national immunization programs to

choose percutaneous vaccination if that is more practical.

Determining BCG-induced immune correlates of protection against childhood tuberculosis disease

This study aims to determine what we can measure in the blood of a BCG-vaccinated baby to tell us whether that infant has either been protected, or not protected, against future tuberculosis disease. Defining these “immune correlates” is critical for studies of new tuberculosis vaccines. 5675 infants, routinely vaccinated with BCG at birth were enrolled. Blood was collected, processed and cryopreserved at 10 weeks of age, and the infants were followed for at least 2 years. 45 infants developed culture-positive lung tuberculosis over this period (i.e., not protected by BCG). 91 infants did not develop tuberculosis disease despite exposure to adults with tuberculosis in the households (i.e., protected by BCG). We are now in the process of retrieving blood products stored at 10 weeks of age, to compare BCG-induced immunity in the 2 groups. Our comprehensive approach to analysis includes: determining cytokine levels in plasma, evaluating cytokine expression and the memory phenotype of specific T cells, determining specific T cell proliferative and cytokine-producing capacity, assessing the pattern of mRNA expression, and determining whether BCG-induced antibody production patterns may correlate with protection. Results will be presented.

The effect of BCG strain and route of administration on the immune responses caused by the vaccine in infants

At present, we do not know whether BCG strain or route of administration determine efficacy. We evaluated antigen-specific immunity after percutaneous or intradermal administration of Japanese BCG or intradermal administration of Danish BCG. Ten weeks after vaccination of neonates, percutaneous Japanese BCG had induced significantly higher frequencies of BCG-specific IFN- γ (-producing CD4+ and CD8+ T cells in BCG-stimulated whole blood; significantly greater secretion of the T helper 1-type cytokines IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL) 2; and significantly lower secretion of the T helper 2-type cytokine IL-4; and greater CD4+ and CD8+ T cell proliferation than did intradermal Danish BCG. Thus, BCG strain and route of vaccination confer different levels of immune activation, which may affect the efficacy of the vaccine.

Immune response to BCG vaccination in HIV-infected newborns

We have evaluated the risks and benefits of BCG vaccination in HIV-infected infants. However, we do not know whether BCG does protect HIV-infected children against the disease; rather BCG may itself cause disease in this population. Sequential BCG-induced immune responses were determined in 22 HIV-positive infants compared with that in 25 healthy infants born to mothers not infected with HIV and in 25 HIV-negative infants born to HIV-positive mothers. Results will be presented in the near future.

References

- 1) Hawkrigde T, Scriba TJ, Gelderbloem S, et al.: Safety and

immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis.* 2008; 198: 544–52.

- 2) Soares AP, Scriba TJ, Joseph S, et al.: *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles. *J Immunol.* 2008; 180: 3569–77.
- 3) Hussey G, Hawkrigde T, Hanekom W: Childhood tuberculosis: old and new vaccines. *Paediatr Respir Rev.* 2007; 8: 148–54.
- 4) Moyo S, Hawkrigde T, Mahomed H, et al.: Determining causes of mortality in children enrolled in a vaccine field trial in a rural area in the Western Cape Province of South Africa. *J Paediatr Child Health.* 2007; 43: 178–83.
- 5) Hatherill M, Hawkrigde T, Whitelaw A, et al.: Isolation of non-tuberculous mycobacteria in children investigated for pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE.* 2006; 1: e21.
- 6) Mahomed H, Kibel M, Hawkrigde T, et al.: The impact of a change in bacille Calmette-Guérin vaccine policy on tuberculosis incidence in children in Cape Town, South Africa. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25: 1167–72.
- 7) Murray RA, Mansoor N, Harbacheuski R, et al.: *Bacillus Calmette Guérin* vaccination of human newborns induces a specific, functional CD8+ T cell response. *J Immunol.* 2006; 177: 5647–51.
- 8) Davids V, Hanekom WA, Mansoor N, et al.: The effect of bacille Calmette-Guérin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. *J Infect Dis.* 2006; 193: 531–6.

3. Present and future of TB vaccine development research

Department of Infectious Disease Immunology and the SSI Centre for Vaccine Research, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark

Peter ANDERSEN

Tuberculosis (TB) kills 2–3 million people every year. The current tuberculosis (TB) vaccine *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the most widely used vaccine worldwide, but it does not prevent the establishment of latent TB or reactivation of pulmonary disease in adults. The development of subunit vaccines has now reached the point where single antigens as well as poly-protein fusion molecules have been evaluated in animal models and found to provide efficient protection against tuberculosis. The most advanced of these vaccines such as the fusion between ESAT6/TB 10.4 and Ag85B are now in clinical trials. Currently the focus is on evaluating the influence of different adjuvants, live delivery systems, routes and prime-boost

regimes for optimal expression of immunity in the lung, boosting of BCG and maintenance of immunological memory. Subunit vaccines can be used to boost BCG immunity either administered together (Tandem administration), shortly after BCG (early boost) or in adolescence when BCG immunity starts to wane (Late boost). A late BCG boost would frequently be administered post-exposure to latently infected individuals and ongoing efforts are focused on understanding the impact this would have on existing vaccines and for the design of efficient booster vaccines.

References

- 1) Dietrich J, Billeskov R, Doherty TM, et al.: Synergistic

- effect of bacillus Calmette-Guérin and a tuberculosis subunit vaccine in cationic liposomes: increased immunogenicity and protection. *J Immunol.* 2007 ; 178 : 3721–30.
- 2) Andersen P: Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. *Trends Microbiol.* 2007 ; 15 : 7–13.
 - 3) Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, et al.: Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guérin immunity. *J Immunol.* 2006 ; 177 : 6353–60.
 - 4) Dietrich J, Lundberg CV, Andersen P: TB vaccine strategies — what is needed to solve a complex problem? *Tuberculosis (Edinb.)*. 2006 ; 86 : 163–8.
 - 5) Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, et al.: Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine.* 2006 ; 24 : 5452–60.
 - 6) Doherty TM, Andersen P: Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev.* 2005 ; 18 : 687–702.
 - 7) Andersen P, Doherty TM: The success and failure of BCG. Implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2005 ; 3 : 656–62.
 - 8) Andersen P, Doherty TM: TB subunit vaccines — putting the pieces together. *Microbes Infect.* 2005 ; 7 : 911–21.
 - 9) Dietrich J, Aagaard C, Leah R, et al.: Exchanging ESAT6 with TB 10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol.* 2005 ; 174 : 6332–9.

4. Comments and directions in research and development of TB vaccines

Aeras Global TB Vaccine Foundation, Bethesda, Maryland, USA Jerald C. SADOFF

———— The 83rd Annual Meeting Mini-symposium ————

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST TUBERCULOSIS

Chairpersons: ¹Kazuo KOBAYASHI and ²Isamu SUGAWARA

Speakers:

1. Novel DNA vaccines against tuberculosis: Masaji OKADA (Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center)
2. BCG vaccine trials in South Africa: Gregory HUSSEY (South African Tuberculosis Vaccine Initiative, University of Cape Town, Cape Town, South Africa)
3. Present and future of TB vaccine development research: Peter ANDERSEN (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark)
4. Comments and directions in research and development of TB vaccines: Jerald C. SADOFF (Aeras Global TB Vaccine Foundation, Bethesda, Maryland, USA)

Mycobacterium tuberculosis is one of the most successful bacterial parasites of humans, infecting over one-third of the population of the world as latent infection without clinical manifestations. Over 9.2 million new cases and nearly 1.7 million deaths by tuberculosis (TB) occur annually (<http://www.who.int/tb/en/>). TB poses a significant health threat to the world population. Global tuberculosis control is facing major challenges today. In general, much effort is still required

to make quality care accessible without barriers of gender, age, type of disease, social setting, and ability to pay. Coinfection with *M. tuberculosis* and human immunodeficiency virus (TB/HIV), and multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR)-TB in all regions, make control activities more complex and demanding. Treating and preventing TB is challenging, even in developed countries where there is a modern health care system and infrastructure. Current treatment regimens last six to nine months, and erratic or inconsistent treatment breeds MDR (490,000 new cases/year) and even XDR-TB (40,000 new cases/year), which means that this pandemic could become even more difficult to control throughout the world. TB is a leading cause of death among people who are also infected with HIV, according to the World Health Organization. One-third of the 33.2 million people living with HIV also suffer from TB. The coinfection causes 230,000 deaths annually worldwide. Without proper treatment, approximately 90 percent of people living with HIV die within two to three months of contracting TB (http://www.stoptb.org/wg/tb_hiv/default.asp). The goal of this symposium is to understand the current situation of research and development of novel TB vaccines and the future perspective.

To win the fight against TB, a comprehensive approach is needed that includes new and more effective vaccines as well as improved diagnostics and treatment. The bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine, created in 1921, is the only existing vaccine against TB. Unfortunately, it is only partially effective. It provides some protection against severe forms of pediatric TB, namely disseminated and meningeal tuberculosis occurring in the first year of life, but is unreliable against adult pulmonary TB, which accounts for most of the disease burden worldwide. Although BCG is the most widely administered vaccine in the world, there have never been as many cases of TB on the planet. There is therefore an urgent need for a modern, safe and effective vaccine that would prevent all forms of TB, including the drug-resistant strains, in all age groups and among people with human immunodeficiency virus (HIV).

Strategies for the research and development (R&D) are included 1) pre-exposure (prophylactic) and 2) post-exposure (therapeutic) vaccines. Based on the preparation, there are 4 types, such as 1) improved BCG, 2) attenuated *M. tuberculosis*, 3) subunit/component vaccines, and 4) DNA vaccines. Speakers have presented and discussed "R&D of novel vaccines against TB" better than current BCG.

To control TB and overcome the issues, such as drug-resistant TB and HIV-TB coinfection, we hope the presentation in the Mini-symposium promotes a more adventurous

approach to develop a novel, effective and safe TB vaccine.

References

- 1) Kaufmann SHE: Robert Koch, the Nobel prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med.* 2005 ; 353 : 2423-6.
- 2) Young DB, Perkins MD, Barry CE III: Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J Clin Invest.* 2008 ; 118 : 1255-65.
- 3) Skeiky YAW, Sadoff JC: Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2006 ; 4 : 469-76.

Key words : Improved BCG, Attenuated *Mycobacterium tuberculosis*, Subunit/component vaccines, DNA vaccines, Pre-exposure (prophylactic) vaccines, Post-exposure (therapeutic) vaccines

¹Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, ²Mycobacterial Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Kazuo Kobayashi, Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan.
(E mail: kobayak@nih.go.jp)

第83回総会ミニシンポジウム

Ⅱ. 新しい感染診断法を使った研究の展開

座長 ¹有賀 晴之 ²原田 登之

キーワード：結核感染診断，潜在性結核感染，結核菌特異抗原，IGRAs

シンポジスト：

1. Interferon-Gamma Release Assays (IGRA) and antigens for detection of latent infection and prediction of disease

Peter ANDERSEN (Department of Infectious Disease Immunology and the SSI Centre for Vaccine Research, Statens Serum Institut, Denmark)

2. 結核菌抗原特異的細胞性免疫応答～末梢血と炎症局所有賀晴之（国立病院機構東京病院）

3. 結核感染免疫診断法が有するいくつかの問題点

樋口一恵（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）

近年，結核菌を含む抗酸菌のゲノム解析が進展した結果，免疫反応（インターフェロン- γ 産生誘導）を惹起する結核菌特異抗原 ESAT-6 と CFP-10 が発見され，間もなくそれらを用いた結核感染診断法が開発された。ESAT-6 と CFP-10 は BCG や大部分の非結核性抗酸菌には存在しない抗原であるため，両抗原を用いた診断法はツベルクリン反応と異なり BCG 接種や大部分の非結核性抗酸菌感染の影響を受けない。これらの診断法は，Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs) と呼ばれ，現在市販されているものは ELISA 法を用いる QuantiFERON[®]-TB Gold（日本における商品名：クオンティフェロン[®]-TB-2G，以下 QFT-2G）と，ELISPOT 法を基盤にした T-SPOT[®]. TB がある。日本では QFT-2G のみが診断薬として承認されているが，一般的に QFT-2G よりも T-SPOT[®]. TB のほうが高感度であると報告されており，今後の承認が待たれる。

しかし一方では，IGRAs 検査の歴史は浅いため，今後解決すべき問題点，課題点も多数存在する。これらの課

題点を集約した論文が昨年発表されており，参考になるであろう¹⁾。

このような現状において本ミニシンポジウムでは，ESAT-6，CFP-10 を含む多くの結核菌抗原の研究に従事し IGRAs の産みの親とも呼ぶべきデンマーク国立血清研究所の Andersen 先生から，結核菌特異抗原の同定から IGRAs 検査法開発に至る経緯と，現在の IGRAs 検査法では区別できない潜在性感染と活動性結核を判別する診断法の可能性，および IGRAs による結核発病予測に関するご講演を頂いた。なお演者都合により，原田が講演内容をレポートとしてまとめた。国立病院機構東京病院の有賀晴之は，血液以外の検体を用いる QFT-2G 検査の応用技術，さらには QFT-2G 検査における反応細胞の解析結果等の講演を行った。最後に結核予防会結核研究所の樋口一恵先生より，小児，HIV 感染者等の免疫脆弱者における QFT-2G 検査の適応，結核治療が QFT-2G 検査に及ぼす影響，QFT-2G 検査による結核発病予測，次世代の QFT 検査，現行の QFT-2G 検査における諸問題を網羅的にまとめた多岐にわたる内容のご講演を頂いた。

現在，IGRAs は急速に広まっているが，特性・問題点を正しく認識することは非常に重要である。本ミニシンポジウムが，日本における IGRAs に関する認識をさらに深めることに寄与することを期待する。

文 献

- 1) Pai M, Dheda K, Cunningham J, et al.: T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. *Lancet Infect Dis.* 2007 ; 7 : 428-438.

¹国立病院機構東京病院，²結核予防会結核研究所連絡先：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 15 Jul. 2008)

1. Interferon-Gamma Release Assays (IGRA) and antigens for detection of latent infection and prediction of disease

Department of Infectious Disease Immunology and the SSI Centre for Vaccine Research, Statens Serum Institut, Denmark

Peter ANDERSEN

はじめに

全世界的な結核対策を考えるうえで、最も重要な課題の一つは潜在性結核感染の診断と治療である。これまで結核感染を診断する方法として使用されていたツベルクリン反応（ツ反）は、細胞性免疫反応の一つである遅延型過敏反応を見ており、ツ反により結核発病以前の潜在性感染時期においても感染の検出が可能である。しかし、ツ反に用いる PPD は多数の結核菌抗原の混合物であり、その大部分の抗原は BCG や非結核性抗酸菌のもつ抗原と共通しているため、ツ反の対象者が BCG 接種や非結核性抗酸菌に感染していた場合、ツ反の特異度は低下する。従って、PPD に代わりうる結核菌特異抗原の同定は、主要な国際的研究上の優先事項であった。演者らは、BCG ワクチン株やほとんどの非結核性抗酸菌において欠落している結核菌抗原について、感染診断に使える可能性を検討してきた。BCG では欠落している遺伝子座 RD1 の欠落は、BCG の親株である *M. bovis* の継代培養期間中の出来事であるため、その後樹立されたすべての BCG 亜株においても RD1 は欠落している。結核菌は 4,000 個の遺伝子を持ち、そのうち 104 個の遺伝子が BCG には存在せず（すべての BCG 株ではない）、40 個が他の抗酸菌には存在せず、さらにこのうち 8~10 個の遺伝子産物が強い免疫源性をもっている。しかし、これら結核菌特異抗原のいくつかがもつ一部のエпитープが、BCG 抗原と共通しているため、純粋に結核菌に特異的な抗原は ESAT-6, CFP-10, および TB7.7 のみである。このように、演者らは診断に使える可能性のある主要な 3 つの抗原を同定した。現在これらの抗原は、感作 T 細胞からのインターフェロン- γ (IFN- γ) を測定することにより、現在の感染を診断する QuantiFERON®-TB のような IGRAs (Interferon-Gamma Release Assays) 検査に使用されている。欧州、米国あるいは日本においてこれらの検査法が導入された結果、IGRAs 検査を接触者検診に使用する価値が急速に明らかになってきた。IGRAs 検査は高感度・高特異度を持ち、結核症のみならず結核感染も検出することについて、10 年後には疑念はもはやなくなるであろう。なお、IGRAs 検査には、全血培養、ELISPOT 法、あるいは Flow cytometry を用いる方法がある。

潜在性結核感染

ESAT-6 は、感染のどの時期を検出するのであろうか。通常、結核感染後の発病は最初の 1 年目が約 3%、2 年目が約 2%、3 年目が約 1% でそれ以降の年間発病率は 1% 以下と言われており、感染後 3 年目以降が本当の潜在性感染の状態と考えられる。潜在性結核感染では、結核菌を貪食した肺胞マクロファージの周辺部に CD4⁺、あるいは CD8⁺ の T 細胞が動員され肉芽腫となり、結核菌を封じ込める防御機構が働く。この際に一部の結核菌は、低酸素、栄養不足、酸化窒素、低 PH で特徴づけられる細胞内環境において、分裂を伴わない休眠状態となり生存すると考えられている。従って、潜在性感染では分裂菌と非分裂菌の混在している状態にあり、活動性結核とは異なった結核菌の遺伝子発現があると考えられる。低酸素や低濃度の酸化窒素により誘導される休眠状態では DosR 遺伝子群が発現し、その時期に特徴的な抗原、いわば「休眠抗原」が発現される。このような抗原について IFN- γ 産生誘導活性を検討した結果、数種類の抗原が活動性結核よりも潜在性結核感染をよりよく検出することが報告されている¹⁾²⁾。このように、ESAT-6, CFP-10, および TB 7.7 は分裂菌が分泌する抗原であり、結核感染に対する特異的で感度のよい診断法に適しているが、潜在性に関連した休眠抗原を用いることにより宿主が結核菌を抑制した状態である真の潜在性を検出できる可能性が示唆された。このような潜在性状態に特異的な抗原と、ESAT-6, CFP-10, TB7.7 を組み合わせることにより、「結核菌抑制者」と「発病進行者」を区別できる可能性や、さらには結核菌の状態に依存せず感染を検出できるため高感度な診断法として用いられる可能性も考えられる。しかし一方では、潜在状態に関連した多くの抗原は、結核菌に特異的でないという問題点も含まれている。

結核発病の予測

ESAT-6 により誘導される IFN- γ 産生応答は、防御的免疫応答が可能な宿主、特にワクチン接種された動物で感染前に免疫 T 細胞が存在するような宿主において防御的である。一方、進行性の感染を受けた感受性の宿主においては、免疫応答は直接細菌の増殖により刺激され増

殖に伴い応答も上昇するが、この時点において ESAT-6 により誘導される IFN- γ 産生応答は、感染を抑制するには十分ではないと考えられる。実際に、種々のワクチンを接種されたマウスと未接種マウスにおける ESAT-6 誘導性 IFN- γ 産生応答は、肺内結核菌数と相関性が見られている³⁾。すなわち肺内結核菌数が多いほど IFN- γ 産生応答が強いことより、人間においても IGRAs 検査により結核発病予測の可能性が考えられる。まず、ツ反陽性で QFT 陰性の者が、その後発症しないという結果は報告されている⁴⁾。また、接触者検診において、QFT 陽性がツ反と比較し、より正確にその後の発病を予測することも示されている⁵⁾。しかし、結核高蔓延国においては全結核感染者に予防内服をすることは、経済的にも現実的にも不可能であるため、感染性の結核患者か、あるいは近い将来感染性の結核患者になるであろう集団に絞って予防内服を行うべきであると考えられる。演者らは、ワクチン接種と未接種の動物において ESAT-6 と CFP-10 を用いた遅延型過敏反応を検討し、ESAT-6 あるいは CFP-10 に対する皮膚反応の大きさと生存率との間に逆相関が見られるが、PPD を用いた場合は相関性がないことを報告しており、このような方法による将来の発病予測の可能性が示唆された⁶⁾。また、ESAT-6 で誘導される IFN- γ 産生応答の強さが、後の結核発病と関連している結果も示された^{7,8)}。さらに、ESAT-6 誘導性 IFN- γ 産生応答を用いた発病予測に関して、3 つの結核感染モデルが考えられる。1 つめは、感染初期の菌増殖を抑制できた集団では ESAT-6 に対する反応は陰性であり、2 つめは感染初期の菌増殖を抑制できなかったが最終的に感染を抑制できた集団は、ESAT-6 に対する反応は陽性を示す潜在的感染となる。第 3 の集団は菌増殖を抑制できなかった集団であり、ESAT-6 に対する反応は強陽性となり後に発病へと至る。この第 3 の集団において、潜在性感染と発病初期を区別する IFN- γ 産生応答の新たな基準値の設定が考えられる。すなわち、現在の基準値は感染を示すものであり、今後発病予測のための基準値設定が重要であると考えられる。

おわりに

このように、IGRAs による結核発病予測の重要性は、各国の結核蔓延の程度により異なると考えられる。低・

中蔓延国において QFT は、ツ反より正確に発病を予測することが示された。すなわち、QFT を用いることにより、従来のツ反を用いた場合の潜在性結核感染症の治療対象者数を減少させることが可能となった。一方、高蔓延国における IGRAs の重要性は、QFT 陽性者の中で発病する危険性の最も高い者を見つけることができるような新たな基準値の確立に依存していると考えられる。あるいは、今後 ESAT-6 や CFP-10 のような初期抗原と休眠抗原に対する T 細胞応答のバランスを調べることが重要と思われる。

文 献

- 1) Leyten EM, Lin MY, Franken KL, et al.: Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 2006 ; 8 : 2052–2060.
- 2) Demissie A, Leyten EM, Abebe M, et al.: Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 ; 13 : 179–186.
- 3) Dietrich J, Aagaard C, Leah R, et al.: Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol.* 2005 ; 174 : 6332–6339.
- 4) Higuchi K, Harada N, Mori T, et al.: Use of QuantiFERON-TB Gold to investigate tuberculosis contacts in a high school. *Respirology.* 2007 ; 12 : 88–92.
- 5) Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, et al.: Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 ; 177 : 1164–1170.
- 6) Weldingh K, Andersen P: ESAT-6/CFP10 skin test predicts disease in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *PLoS ONE.* 2008 ; 3 : e1978.
- 7) Doherty TM, Demissie A, Olobo J, et al.: Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 704–706.
- 8) Higuchi K, Harada N, Fukazawa K, et al.: Relationship between whole-blood interferon-gamma responses and the risk of active tuberculosis. *Tuberculosis.* 2008 ; 88 : 244–248.

2. 結核菌抗原特異的細胞性免疫応答～末梢血と炎症局所

国立病院機構東京病院 有賀 晴之

はじめに

結核菌感染症に対する生体防御反応は、個体間で異なり、同一個体内でも時間的、空間的にダイナミックに変動する。結核感染発病後、抗結核治療により生体内の結核菌が減少するとともに、結核菌抗原に対する獲得免疫応答も減弱していく。結核治療により排菌が停止しても、内因性再燃や外来性再感染などの結核再発により再び増強する。また、漿膜腔や髄腔などの閉鎖空間に炎症が起ると、ケモカイン産生により免疫担当細胞が遊走し、抗原特異的エフェクターT細胞がclonal expansionを起こし、集積するという点で、炎症局所と末梢血とは様相が異なる。末梢血を用いたInterferon- γ release assays (IGRAs) は、BCG接種に影響されない結核感染免疫診断法として、近年、世界的に普及している。今回、胸水や腹水、心嚢水、髄液などの体腔液検体を用いて、結核性漿膜炎（胸膜炎、腹膜炎、心膜炎）、結核性髄膜炎を診断する新規の方法論を確立した。また、結核菌抗原特異的T細胞のphenotype解析による既感染と活動性結核の鑑別診断の可能性についても言及する。

1. 体腔液を用いたIGRA

〔背景〕

胸膜炎、心膜炎、腹膜炎、髄膜炎などの活動性結核性漿膜炎の確定診断は、体腔液または漿膜生検組織からの結核菌の培養、遺伝子同定によるが、一般的にその感度は低い。また体腔液の抗酸菌検査の培養が陽性となるまでに長期間を要し、確定診断を得ることなく臨床的判断により抗結核薬治療の開始を余儀なくされる場合がある。日本では、胸水上清中のadenosine deaminase (ADA)の測定が保険診療で用いられているが、結核以外の胸膜疾患でも上昇する場合があります、長期間にわたる不要な抗結核薬治療が行われてしまう可能性もある。胸水上清中のIFN- γ 測定は感度が高く、結核性胸膜炎における診断的意義が高いとの報告もあるが、診断マーカーとして結核菌感染特異性はない。胸腔鏡や腹腔鏡を用いた内視鏡による生検は、他疾患との鑑別診断に有用であるが、侵襲的検査であり、全身状態が不良の場合などには不向きである。体腔液貯留量が少ない場合も困難であり、また可能な施設も限られる。活動性結核性胸膜炎は、胸腔内の炎症局所において結核菌抗原に対する特異的獲得免疫応答が成立し、抗原特異的T細胞が集積している。こ

の抗原特異的エフェクターT細胞の炎症局所での存在が、胸膜炎の特異的診断根拠となる可能性がある。そこで、結核性漿膜炎患者の体腔液から得られた細胞を、BCGおよび大多数の非結核性抗酸菌ゲノムには存在しない結核菌特異的分泌蛋白抗原early secretory antigenic target 6 (ESAT-6), culture filtrate protein-10 (CFP-10)により、*in vitro*で刺激した場合、末梢血と同等か、それ以上にIFN- γ 産生応答が増強すると仮説をたて、新規assay系の確立を試みた。また、従来の体腔液上清中ADAおよびIFN- γ , QuantiFERON®TB-2G (以下、全血QFT-2G)と比較し、診断能について解析した。

〔対象と方法〕

体腔穿刺（胸腔、腹腔、心嚢腔、髄腔）または胸腔鏡、腹腔鏡による生検を施行し、確定診断が得られた79名（すべてHIV陰性）を対象とした。結核群：体腔液、髄液または漿膜組織から結核菌が細菌学的に同定された、活動性結核性漿膜炎（胸膜炎26名、腹膜炎1名、心膜炎1名）および結核性髄膜炎2名、計30名（男性26名、女性4名、平均年齢61.5歳、22～89歳）。非結核群：計49名（平均年齢72.1歳、46～91歳）、非結核性胸水45名（癌性胸膜炎24名、細菌性胸膜炎12名、心不全5名、*Mycobacterium avium*による胸膜炎1名、外傷性血胸1名、良性石棉胸水1名、甲状腺機能低下による胸水1名）、癌性腹膜炎1名、癌性心膜炎1名、非結核性髄膜炎2名。穿刺または胸腔鏡により体腔液を採取し、20～50 ml（髄液約6～10 ml）を測定に用いた。遠心し、上清を分離し、細胞分画中の有核細胞数をカウントした。体腔液中の細胞を、本人の体腔液上清にて $2.5 \sim 5 \times 10^6$ /well（髄液は $2.5 \sim 5 \times 10^5$ /well）に調整し、24穴プレート1 ml/well（髄液は96穴プレート0.2 ml/well）に分注した。陰性コントロール（生理食塩水）、陽性コントロールmitogen (phytohemagglutinin 5 μ g/ml)、抗原（全血QFT-2G添付の結核菌抗原ペプチド、ESAT-6、CFP-10最終濃度1 μ g/ml)を添加し、37℃、5%CO₂インキュベーターにて16～18時間培養し、QuantiFERON-TB 2G CMIにて培養上清中のIFN- γ を測定した。体腔液の陰性コントロールIFN- γ が検出限界以上の場合、血漿またはAIM-V (GIBCO)を培地として使用した。同時に、対象患者に、全血QFT-2G、上清中のADAの測定を施行した。統計的解析には単変量解析 (paired *t* test, Mann-Whitney *U* test) および多変量解析 (ロジスティック回帰) を用いた。解析はStata Ver.9 (Stata)を使用した。なお、本研

究は当院の臨床研究倫理審査委員会によって承認されたうえで行われた。

〔結果〕

体腔液抗原刺激測定の結果、結核群では、陰性バックグラウンド IFN- γ 値に比べ、抗原刺激での IFN- γ 値は、統計学的に有意に高値であったが ($p < 0.001$)、非結核群では有意差はなかった ($p = 0.07$) (Fig. 1)¹⁾。全血 QFT-2G (抗原刺激値－陰性バックグラウンド IFN- γ , ESAT-6, CFP-10のいずれか高値の値)、ADA、陰性バックグラウンド IFN- γ (体腔液を陰性コントロールと共に培養した上清中の IFN- γ)、体腔液抗原刺激 IFN- γ 応答 (抗原刺激値－陰性バックグラウンド, ESAT-6, CFP-10のいずれか高値の値) について、結核群と、非結核群と比較したところ、単変量解析ではすべてにおいて有意差を認めた ($p < 0.001$)。同様に、上記の4因子について、Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を作成し、Area Under the Curve (AUROC) を解析した。体腔液抗原応答が最も高値であり (0.996)、陰性バックグラウンド IFN- γ (0.975)、ADA (0.882)、全血 IFN- γ (0.719) の順であった。陰性バックグラウンド IFN- γ と、体腔液抗原刺激 IFN- γ 応答の AUROC の比較では有意差を認めなかった。しかし、陰性バックグラウンド IFN- γ と体腔液抗原刺激 IFN- γ 応答の多変量ロジスティック回帰分析による解析では、体腔液抗原刺激 IFN- γ 応答が有意であった ($p < 0.005$, OR = 1.2, 95%CI = 1.03~1.42)。ROC 曲線より算出した cut-off (2.4 IU/ml) を用いると、体腔液抗原刺激 IFN- γ 応答は、感度 96.5%、特異度 97.8% であり、全血 QFT-2G (感度 78%、特異度 70%)、ADA (cut-off: 40, 感度 82%、特異度 91%) に比べ、結核性漿膜炎の診断能力において優れていると考えられた。

〔考察〕

結核群では、結核菌特異的抗原 (ESAT-6/CFP-10) 刺激により、陰性バックグラウンドに比べ、IFN- γ 産生が有意に増強した。体腔内に集積した結核菌抗原特異的 T 細胞が *in vitro* での抗原刺激により反応し、IFN- γ を産生した結果であると考えられる。活動性結核性胸膜炎が臨床的に強く疑われた症例 30 例 (喀痰より結核菌が証明された肺結核に合併した同側胸水貯留患者、胸水から結核菌が証明されなかったが、抗結核薬による治療により胸水が消退した症例) においても全く同様の結果であった。

一方、非結核群 49 例では、結核菌特異的抗原で刺激した場合、陰性バックグラウンドに比べ、IFN- γ は統計学的に有意に上昇しなかった。陰性バックグラウンドの IFN- γ が 1 (IU/ml) 以上の比較的高値であった非結核性群においても、IFN- γ は上昇しなかった。非結核群ではほとんどの症例において、陰性バックグラウンド IFN-

γ は低値であり、特異抗原刺激で IFN- γ が上昇しないのが特徴である。陰性バックグラウンド IFN- γ が活動性結核群と同程度に高値の少数の非結核症例でも、同様に抗原刺激で IFN- γ が上昇しない。

非結核群のうち、肺結核の既往のある患者において、陰性コントロールと比較し、特異抗原刺激にて IFN- γ が上昇する症例を認めた。このような症例では、全血 QFT-2G も抗原刺激で反応を認め、判定は陽性であった。他の原因により体腔液貯留をきたした結核既往患者や潜在性結核感染者が、末梢血中に結核菌抗原特異的 T 細胞が一定数以上存在する場合、それらの細胞が体腔液中に

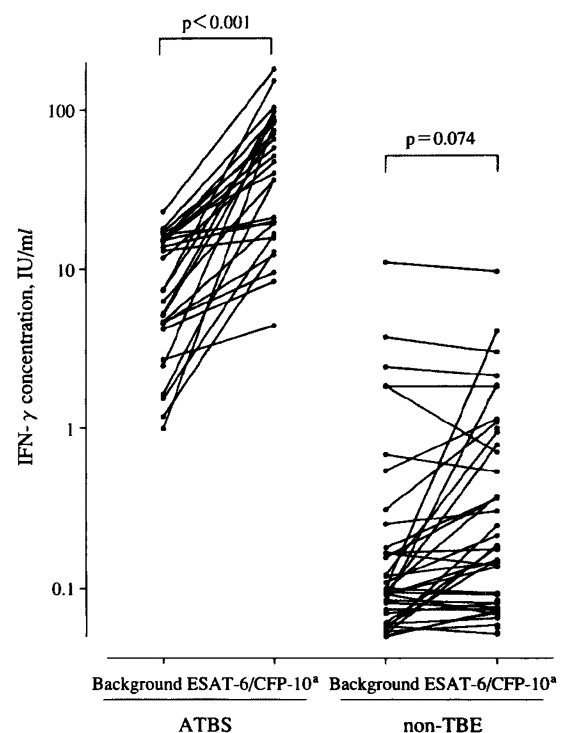


Fig. 1 IFN- γ production in response to stimulation with *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen.

Cavity fluid cells obtained from patients with active tuberculous serositis (ATBS) or nontuberculous effusion (non-TBE) were harvested and suspended in the individual supernatant of the effusion at 1–5 million cells/ml, stimulated with saline or *M. tuberculosis*-specific antigens, and incubated for 18 h, after which IFN- γ concentrations in the culture supernatant were measured by ELISA. IFN- γ concentrations in each patient, which were expressed as background control IFN- γ concentrations and concentrations after stimulation with specific antigens (early secretory antigenic target 6 [ESAT-6] and culture filtrate protein 10 [CFP-10]), are shown as closed circles connected with lines. Student's *t* test was used for differences between the ATBS and non-TBE groups. IFN- γ values after antigen stimulation are the measured values, not values subtracted from the corresponding background control values.

^aThe higher IFN- γ concentrations after stimulation with either antigenic peptides ESAT-6 or CFP-10 are represented.

も出現し、*in vitro*での抗原刺激でIFN- γ を産生する機序が推測される。特異抗原刺激IFN- γ から陰性バックグラウンドIFN- γ を差し引いた応答値のみによって評価すると、結核既感染者に合併した他の胸水貯留疾患においても、見かけ上抗原応答を認め、全血QFT-2Gのような判定基準を適用すると“陽性”となってしまうケースがある。体腔液を用い、ELISPOT assayの系を行っても同様な結果であった。このような問題は、陰性コントロールが低値であることにより、活動性結核性胸膜炎と鑑別できると考えられる。結核性漿膜炎では、閉鎖された炎症局所空間における現在進行中の活発な細胞性免疫応答を反映し、陰性コントロールにおけるIFN- γ が高値となると推測される。以前より、活動性結核性胸膜炎において、胸水上清中のIFN- γ が高値を示すとの報告がある。しかし、悪性疾患による胸膜炎などの非結核性疾患における胸水においても高値を示す場合があることも指摘されている。今回の体腔液を用いたIGRAの系において、陰性バックグラウンド（胸水上清を培地として胸水中の細胞をCO₂インキュベーターで18時間培養した上清中）のIFN- γ は、非結核群に比べ、結核群で有意に高値を示した。しかし、非結核群の一部の症例（*M. avium*による胸膜炎、細菌性胸膜炎、癌性胸膜炎）においてバックグラウンドIFN- γ が結核群と同程度に高値を示した。つまり、従来の体腔液上清IFN- γ 濃度測定のみによる診断では、このような偽陽性となる症例を除外することが困難である。体腔液IGRAでは、原則として、細胞培養に本人の体腔液上清を使用した。これにより、抗原特異的IFN- γ 応答とバックグラウンドIFN- γ を同時に測定可能である。つまり、結核菌抗原特異的細胞の存在と、結核炎症局所の活動性を一度に評価できる。しかしながら、体腔液中の結核菌量がきわめて多い場合、分泌蛋白であるESAT-6/CFP-10の体腔液中濃度も高くなると推測される。そのような場合は*in vitro*でESAT-6/CFP-10を刺激抗原として加えても、IFN- γ 産生が増強せず、抗原刺激応答としてIFN- γ 上昇が見られなくなる可能性が推測される。また、稀ではあるが、体腔液上清中のIFN- γ が、すでにELISAの測定限界以上に高く、特異抗原を加えても、IFN- γ 産生応答が測定できない症例も経

験した。そのような場合、血漿やAIM-V等、他の培地を用いることで、体腔液上清のIFN- γ レベルを低下させることにより、抗原特異的なIFN- γ 応答を確認することが可能であった。

結核性髄膜炎の細菌学的診断はPCR、培養とも感度が低く、診断上決定打を欠くことが多い。髄液PCR結核菌陽性の髄膜炎2症例で、結核性漿膜炎と同様の抗原特異的IFN- γ 応答を認めた。急性期の細胞数の多い髄液検体が得られればELISAで測定可能であり、本法は結核性髄膜炎の新規の診断法として期待できる。当院では、これまで約400検体の体腔液で測定を行っており、それらのデータに基づいた活動性結核性漿膜炎、髄膜炎の診断基準をTableに示す。

2. Intracellular cytokine staining法による 結核既感染と活動性結核の鑑別の可能性

血液を用いたIGRAsは、結核性漿膜炎のような肺外結核の診断にも有用であると考えられる。しかし、今回の体腔液IGRAの検討では、全血QFT-2Gは、結核群で感度78%、非結核群で特異度70%であった。ESAT-6/CFP-10を用いた血液IGRAsは、結核“感染”診断であり、既往と鑑別できない場合があり、陽性であっても活動性結核発病診断にはならない。今回の報告の体腔液貯留患者において、全血QFT-2Gを行うと、非結核群49例中“陽性”が14名存在した。非結核群は、癌性胸膜炎などの比較的高齢者が多く、また結核病床を有する当院の性格上、過去の結核既感染を反映している可能性が考えられる。当院において、結核菌の証明された治療開始7日以内の活動性結核92名（男性59名、平均年齢47歳、19～95歳）を対象に、標準的な抗結核治療の前後で全血QFT-2G変化を前向きに観察したところ、陽性率は、治療開始時94.6%、治療開始後45日目64.5%、治療開始後90日目46.8%、180日目37.5%、1年目39.5%、2年目41.2%、2～3年の間では39%（*n*=41）であった。結核治療により、生体内から結核菌が駆逐されていくと、生体防御反応としての獲得免疫応答も終息に向かい、抗原特異的T細胞が末梢血中から減少し、*in vitro*での全血QFT-2Gも低下し、陽性率が低下すると推測される。一方で、

Table Diagnostic criteria of cavity fluid interferon-gamma release assay

1. Active tuberculous serositis, active tuberculous meningitis Nil $\geq$ 0.9 IU/ml and [ESAT-6—Nil and/or CFP-10—Nil $\geq$ 1 IU/ml]
2. non-tuberculous effusion any Nil and [ESAT-6—Nil and CFP-10—Nil < 0.5 IU/ml]
3. non-tuberculous effusion with history of tuberculosis or latent tuberculous infection Nil < 0.5 IU/ml and [ESAT-6—Nil and/or CFP-10—Nil $\geq$ 0.4 IU/ml]

排菌が停止し、臨床的に結核が明らかに治癒し、発病後2年経過しても、全血 QFT-2G 陽性者が約40%存在する。このような QFT-2G 陽性の結核既感染者や、潜在性結核患者と、結核発病を鑑別できれば、臨床的意義は大きい。一般的に、感染初期は CD27 (−), CD45RA (−) の effector memory phenotype の T 細胞が出現し、感染症の治癒とともに減少、消失する。CD27 (+), CD45RA (−) の central memory T cell は感染により分化し、長期的に生存し、二次感染において生体防御に関与する。そこで、全血 QFT-2G 陽性の結核既往者および活動性結核患者において、抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の phenotype に違いがあると仮説を立て、pilot study を行った。結核菌が証明された活動性肺結核患者（治療開始前）および、結核治療歴の明らかで、治療開始から3年以上経過しており、現在結核を発病していない全血 QFT-2G 陽性の結核既往者を対象とした。末梢血より PBMC を分離し、陰性コントロール、ESAT-6、CFP-10 抗原ペプチドとともに、16時間培養後、細胞を回収した。APC 抗 CD4 抗体、PE 抗 CD27 抗体、PECy5 抗 CD45RA 抗体で細胞表面マーカーを染色した。次に、FITC 抗 IFN- γ 抗体にて細胞内染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。IFN- γ (+), CD4 (+) T 細胞群を選択し、CD27 と CD45RA で展開し、細胞の phenotype を解析した。結果、治療開始前の活動性肺結核患者では、抗原特異的 IFN- γ (+), CD4 (+) T 細胞のほとんどが、CD27 (−), CD45RA (−) の effector memory phenotype を示していた (Fig. 2A)。一方、対照的に、結核既往者では抗原特異

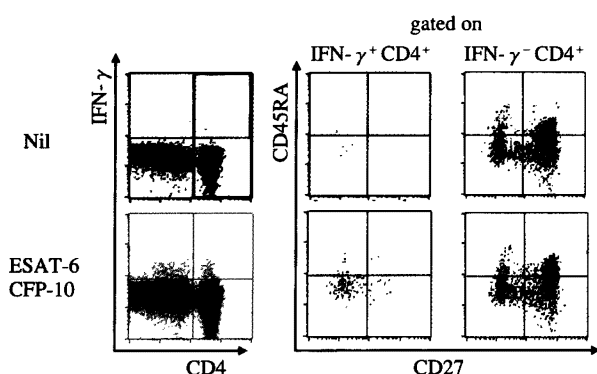


Fig. 2A PBMCs obtained from patient with active pulmonary tuberculosis before antituberculous chemotherapy were harvested and stimulated with saline (Nil) or *M. tuberculosis*-specific antigens (ESAT-6 and CFP-10), and incubated for 18 h, after which cells were stained for CD4, CD27, CD45RA and fixed, permeabilized and stained for cytoplasmic IFN- γ . The cells stained were gated on CD4 positive, IFN- γ positive (middle) or CD4 positive, IFN- γ negative (right) and analyzed on fluorescence-activated cell sorting.

的 IFN- γ 産生 CD4⁺ T 細胞は、CD27 (+), CD45RA (−) の central memory cell が大多数を占めていた (Fig. 2B)。ELISA や ELISPOT 法に比べ、細胞内染色法は、IFN- γ 産生細胞の検出感度が低く、手技が煩雑である。しかし、フローサイトメトリーにより IFN- γ 産生細胞の解析が可能であり、全血 QFT-2G 陽性例において、結核既感染と活動性結核を鑑別できる可能性が示唆された。今後、接触者などの潜在性結核の発病予測を視野に入れ、多数の症例で検討し臨床的意義を確かめる必要がある。

おわりに

生物の進化の歴史は、感染症との戦いの歴史でもある。ヒトは、生体防御系として、自然免疫のみならず、高度な獲得免疫系を備え、さらに脳神経系は抗結核薬を発明した。しかし、多剤耐性結核を含め、結核感染症は人類にとって未だに脅威である。感染症の診断には様々な方法があるが、抗原特異的細胞性免疫反応を原理として用いた診断法は少なく、IGRAs はポストゲノム時代ならではのユニークな方法である。様々な課題や問題が山積しているが、生体内で起きている免疫動態を多様な視点でとらえ、結核感染症の病態を的確に理解することで、科学的根拠に基づいた適切な治療につながる事が望まれる。

文 献

- 1) Ariga H, Kawabe Y, Nagai H, et al.: Diagnosis of active tuberculous serositis by antigen-specific interferon-gamma

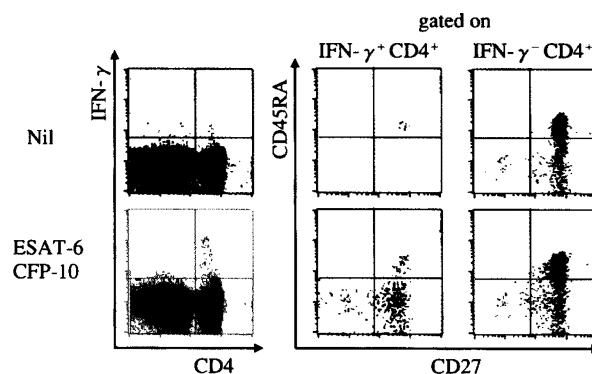


Fig. 2B PBMCs obtained from the patient with old pulmonary tuberculosis that antituberculous chemotherapy ended three years ago were harvested and stimulated with saline (Nil) or *M. tuberculosis*-specific antigens (ESAT-6 and CFP-10), and incubated for 18 h, after which cells were stained for CD4, CD27, CD45RA and fixed, permeabilized and stained for cytoplasmic IFN- γ . The cells stained were gated on CD4 positive, IFN- γ positive (middle) or CD4 positive, IFN- γ negative (right) and analyzed on fluorescence-activated cell sorting.

response of cavity fluid cells. Clin Infect Dis. 2007; 45 :

1559-1567.

3. 結核感染免疫診断法が有するいくつかの問題点

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 樋口 一恵

はじめに

結核菌特異的抗原刺激によりリンパ球から産生されるインターフェロン- γ を測定し結核感染を診断する方法は Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs) と呼ばれ、現在市販されているものにはクオンティフェロン®TB-2G (QFT-2G) と T-SPOT®. TB (T-SPOT) がある。両者は、BCG ワクチン接種およびほとんどの非結核性抗酸菌感染による影響を受けないため、従来のツベルクリン反応(ツ反)より正確に結核感染を診断することが可能である。QFT-2Gは診断薬として保険収載され、昨年改訂された接触者検診の新ガイドラインで最優先検査として推奨されたが、いくつかの課題も明らかになってきた。本稿では、主に QFT-2G 検査のもつ課題に関して、以下の項目に沿われわれがこれまでに得た知見を述べる。

1. 免疫機能脆弱集団(小児、HIV感染者等)における適応
2. 結核化学治療、あるいは潜在性結核感染症治療が QFT-2G 検査結果に与える影響
3. 検査結果に基づく結核発病予測の可能性
4. 採血から培養までの、時間と温度の影響および次世代の QFT 検査
5. 精度保証と精度管理
6. QFT-2G を使用するうえでの妨害物質
7. 不可解な検査結果

1. 免疫機能脆弱集団(小児、HIV感染者等)における適応

接触者検診新ガイドラインでは QFT-2G は年齢により適応範囲が規定されており、特に5歳以下には推奨されていない。これは乳幼児では免疫系が未熟なため QFT-2G 検査の反応が低いことが予想されるためであるが、実際0歳児における潜在性結核感染に対する検出感度は低い傾向にある。さらに、新生児では検査に必要な血液量が4mlという点も問題である。また、HIV感染等のため免疫能が脆弱化している集団についても、QFT-2Gの感度は低下することが報告されている。MandalakasらはHIV感染者におけるQFT-2GとT-SPOTの結核感染診断能を比較し、T-SPOTがより高感度であると結論づけた¹⁾。免疫機能が正常な集団でもT-SPOTはQFT-2Gより

りも感度が優れていることが多数報告されており²⁾、われわれもまたT-SPOTの高感度を確認している。さらに新生児でのT-SPOTに必要な血液量は2mlであり、これはQFT-2Gよりも有利な点である。

従って、このような免疫機能脆弱化集団の接触者検診においては、より感度の高いT-SPOTの導入が望まれるが、一方ではT-SPOTの特異度はQFT-2Gよりも劣ることも示唆されており、今後両検査法における陽性反応の免疫学的意味をより正確に理解するためには反応細胞の分子レベルでの比較検討と検査キットで使用されている抗原ペプチドの解析が必要である。

2. 結核化学治療、あるいは潜在性結核感染症治療が QFT-2G 検査結果に与える影響

予防内服、あるいは化学治療に伴う QFT-2G 反応の低下を観察することによる治療効果モニターの可能性を示唆する報告がいくつか出されている。しかしわれわれの研究においては、治療後における IFN- γ 値の低下は認められたが、低下率にバラツキがありまた陰性化の割合も低いため、QFT-2G 検査結果の陰性化を治療効果(治療成功)のモニターには使用できないことが示された(Fig. 1)³⁾。免疫学的に見ても IFN- γ 値の低下から体内の結核菌数や状態を判定することは困難である。QFT-2G における陽性反応の意味は、体内に免疫系に提示される結核菌数、あるいは抗原提示可能な ESAT-6 と CFP-10 のどちらか、あるいは両抗原が存在していると考えられる。前述のごとく多くの感染者が治療終了後にも陽性反応を示すことから、治療後も結核菌は体内に残存(化学殺菌作用を逃れて、宿主の免疫に増殖能を押え込まれた状態)している可能性が示唆され、IGRAs での陽性反応が、「最近の感染」と「過去の感染」を区別することのできない原因として、この静止状態の菌の残存が考えられる。

また、結核菌はほとんど活動をしない休眠状態になることがあると考えられており、この状態では抗原産生はなくなるため QFT-2G は陰性化する可能性があるが、休眠状態から活動期に入ると分泌タンパク(抗原)の産生が開始されることが予想される。このような休眠潜在性感染状態(抗原産生なし)から潜在性感染(抗原産生あり)における QFT-2G 反応の変動推移、および発病率を

長期的に観察していくことは高齢者結核対策を構築するうえではきわめて重要であろう。

3. 検査結果に基づく結核発病予測の可能性

Andersenらにより、結核特異抗原に対するエフェクターT細胞の応答 (IFN- γ 産生応答) の強さは体内の抗原量と相関すること、すなわち結核菌数と相関することから、IFN- γ 産生量が高いほど発病リスクが高いことが予想されるという仮説が提唱された⁴⁾。われわれは、多数の発病者を出したある結核集団感染事例において、発病者と潜在性感染者の QFT-2G 応答値を比較した結果、発病者の IFN- γ 産生量は潜在性感染者のそれよりも有意に高いことを示した (Fig. 2)⁵⁾。すなわち、QFT-2G 応答値が高いほど発病リスクは高いと考えられるが、しかし一方では各個人における応答のバラツキも大きいため、QFT-2G 応答値で発病リスクの基準値を設定することは困難であると思われる。結核発病は、宿主の遺伝・免疫学的な背景も関連するため、今後これらの背景も加味した発病予想の研究を行うことが重要であろう。

4. 採血から培養までの、時間と温度の影響および次世代の QFT 検査

最近、採血から培養までの許容時間について、従来の12時間より短時間を推奨する報告がされている。われわれもこの点を検討した結果、 $22 \pm 5^\circ\text{C}$ の範囲で保管さ

れた血液では、採血後12時間の抗原刺激開始でも採血直後のそれと比較し、結果への影響は少ないことが示された。しかし、抗原刺激を採血後短時間で開始しても、保管温度が結果に大きな影響を及ぼすことも明らかになり、血液の保管・搬送での温度設定を厳密に行うことが望まれる。これに対して、次世代の QFT では抗原刺激開始までの保管温度と時間制限において格段の進歩が見られ、さらに感度も上昇している⁶⁾。

5. 精度保証と精度管理

現在 QFT-2G は、多くの検査センターや病院の検査室で使用されているが、当然のことながら検査の技術的レベルが結果に影響する。実際、接触者検診において、いくつかの検査センターでは非濃厚接触者検診で非常に高い QFT-2G 陽性率を報告し、同一検体を他の検査センターに依頼して再検査したところ、陽性率が低減したケースもある。こうした QFT 検査のバラツキを解決するためには、定期的に中立的な上位検査機関が精度管理を行い技術レベルの評価と指導を行う必要がある。

われわれは、QFT-2G を使用している多くの検査機関に対し精度管理を行った。その結果、継続して検査を実施することに問題があると考えられる技術者が全体の約40%強にも達することが明らかになり、このような技術者に対しては QFT-2G 検査講習会の受講あるいは再受講、もしくは中立的な上位検査機関による現地での技術指

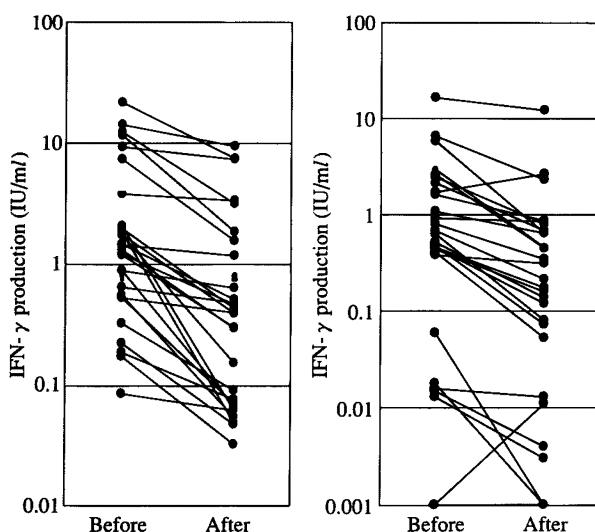


Fig. 1 IFN- γ responses before and after chemotherapy. IFN- γ levels measured before and immediately after chemotherapy by QFT-G for ESAT-6 (left panel) and CFP-10 (right panel) are plotted for each individual. IFN- γ responses to ESAT-6 and CFP-10 were significantly decreased after chemotherapy with the geometric mean for ESAT-6 decreasing from 1.398 to 0.362 ($p < 0.001$) and the geometric mean for CFP-10 decreasing from 0.312 to 0.120 ($p < 0.001$).

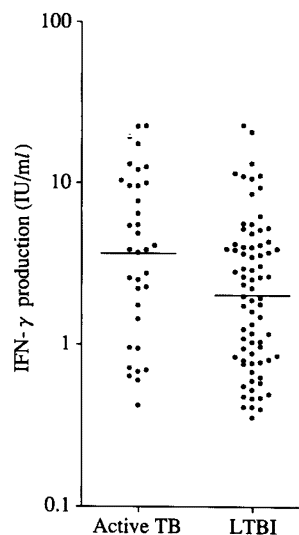


Fig. 2 Distribution of IFN- γ production levels. The geometric mean (as shown by a bar) and the higher IFN- γ production level in response either to ESAT-6 or CFP-10 of each individual in two groups are shown. Geometric mean $\pm$ SD for active TB was 3.65 ± 3.23 ($n = 35$), and for LTBI was 2.02 ± 2.80 ($n = 76$). P value of t -test for comparison of means = 0.013.

導が必要と思われるが、実際こうした検査機関への指導については非常に難しい。今後優良検査機関をいかに公表するか、あるいは精度の低い検査機関を公表すべきか否かを慎重に議論すべきである。この問題に関しては結核病学会のような学術的なところが中心となって標準を作り、精度の高い検査を推進すべきだと思われる。

6. QFT-2Gを使用するうえでの妨害物質

取り扱い説明書には QFT-2G 検査妨害物質として以下が記されている。

- 乳糜血漿：濁度 1890 FTU まで影響なし
- ヘモグロビン：487 mg/dl (陽にかざして向こう側が見えない程度の赤み) まで影響なし
- フィブロンネクチン：(肉眼では確認できない。測定値としても決められていないため、検体は遠心して使用する)
- ビリルビン F (黄色)：19.7 mg/dl まで影響なし
- ビリルビン C (黄色)：21.8 mg/dl まで影響なし

一般的には、ヘモグロビンが抗原抗体反応を阻害することは経験的に分かっている。乳糜血漿、ビリルビン F、ビリルビン C 等の影響は数値的に明確な研究結果はないが、何らかの影響がある可能性は除外できない。従って、上記の物質が混在している時の QFT-2G 検査結果には、必ず検査した検体の状態を記載して依頼元に返すことが望ましいと考えられる。

7. 不可解な検査結果

QFT-2G 検査において、時として陰性コントロール値よりも抗原刺激による IFN- γ 産生量が低いという、結果の解釈上不可解な検査結果を得ることがある。また、陰性コントロール値が異常に高いケースもしばしば見られる。これらの結果を説明する仮説として、抗原特異的な抑制型 T 細胞の増加、高い heterophilic 抗体産生、刺激抗原中のチメロサルへの過敏反応性等が考えられて

いるが、明確な答えは得られていない。QFT-2G 検査結果を正確に判断するうえで、このような結果を生み出す原因を明らかにすることは重要であり、今後のさらなる研究が急がれる。

おわりに

このように IGRAs は新しく、かつ急速に進展している学問であり、現在世界中で広く使用され数多くの知見が蓄積しつつあるが、同時に解決すべき課題も明確になってきた。これらの課題については、多くの実際の検査結果から発見された事実をもとに、基礎的免疫学的な検証を行って解明し、IGRAs をさらに改良することが重要と思われる。

文 献

- 1) Mandalakas A, Hesselning A, Chegou N, et al.: High level of discordant IGRA results in HIV-infected adults and children. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008 ; 12 : 417-423.
- 2) Menzies D, Pai M, Comstock G: Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med.* 2007 ; 146 : 340-354.
- 3) Higuchi K, Harada N, Mori T: Effect of Isoniazid Chemotherapy for Latent Tuberculosis on Whole Blood Interferon- γ Responses. *Respirology.* 2008 ; 13 : 468-472.
- 4) Andersen P, Doherty TM, Pai M, et al.: The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol Med.* 2007 ; 13 : 175-182.
- 5) Higuchi K, Harada N, Fukazawa K, et al.: Relationship between whole blood interferon-gamma responses and the risk of active tuberculosis. *Tuberculosis.* 2008 ; 88 : 244-248.
- 6) Harada N, Higuchi K, Yoshiyama T, et al.: Comparison of two whole blood interferon- γ assays in tuberculosis patients and healthy controls. *J Infection.* 2008 ; 56 : 348-353.

The 83rd Annual Meeting Mini-symposium

EVOLUTION OF IGRA RESEARCHES

Chairpersons: ¹Haruyuki ARIGA and ²Nobuyuki HARADA

Abstract: The progress of genomic analysis in mycobacterium including *M. tuberculosis* (Mtb) allowed us to find Mtb-specific antigens, ESAT-6 and CFP-10, which induce strong interferon- γ from sensitized T cells. Shortly after discovery of these antigens, diagnostic tests for tuberculosis (TB) infection were developed using these antigens. Since ESAT-6 and CFP-10 are absent from all BCG substrains and most of non-tuberculous mycobacterium, these diagnostic tests are not confounded with BCG vaccination and infection of most of non-tuberculosis mycobacterium. These diagnostic tests are called as Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs), and currently there are two commercially available tests. One of them, QuantiFERON®-TB Gold (it is called QuantiFERON® TB-2G in Japan, QFT-2G) based on ELISA method has been approved in Japan, and the other is T-SPOT®. TB which is based on ELISPOT method and has not been approved in Japan yet. As in general T-SPOT®. TB has been shown to be more sensitive than QFT-2G, approval of T-SPOT®. TB in Japan would be expected.

However, there are many questions to be solved in IGRAs, since we have just started to use these tests. A paper which integrated these questions was published last year, and it would be helpful¹⁾

In this mini-symposium, Dr. Peter Andersen reported the progress of development of diagnostic tests for tuberculosis infection, the possibility to distinguish between active TB and latent TB infection (LTBI) which the current IGRAs do not, and the prognostic use of IGRAs (The Japanese content was reported by Chairpersons). Dr. Ariga reported the application of QFT-2G for specimens other than blood. He also reported the interesting data on which T cells responded in QFT-2G. Dr. Higuchi comprehensively reported data on several questions in the QFT-2G test.

Currently the use of IGRAs is expanding rapidly. Under this circumstance, it would be very important to properly understand the characteristics of IGRAs. We hope that this mini-symposium may help for understanding these issues.

1. Interferon-Gamma Release Assays (IGRA) and antigens for detection of latent infection and prediction of disease: Peter ANDERSEN (Department of Infectious Disease Immunology and the SSI Centre for Vaccine Research, Statens Serum Institut, Denmark)

One of the most important challenges in global tuberculosis control is the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. The currently used method for detection of latent tuberculosis infection, the tuberculin skin test, has low specificity. The identification of antigens specific for *Mycobacterium tuberculosis* to replace purified protein derivative

has therefore been a major international research priority. We have performed a rigorous assessment of the diagnostic potential of antigens that are lacking from the *M. bovis* bacille Calmette-Guérin vaccine strains, as well as from most non-tuberculous mycobacteria. We have identified three antigens with a major diagnostic potential: ESAT-6, CFP-10 and TB 7.7. These antigens are currently used in IGRA tests such as the QuantiFERON® that measure the production of interferon- γ from sensitized T lymphocytes, thereby signalling ongoing infection. In the EU, US and Japan, where these tests have entered the market, the value of this approach in contact tracing has rapidly become apparent. I will suggest that such tests can be modified to identify the individuals among the latently-infected, at most risk of developing active contagious TB. Targeted treatment of this part of the population offers the possibility of preventing TB before it becomes infectious, which would greatly contribute to the eventual control of this global epidemic.

2. Immune responses specific for *M. tuberculosis* antigen—peripheral blood and sites of inflammation: Haruyuki ARIGA (National Hospital Organization Tokyo National Hospital)

To develop a more accurate method for diagnosing active tuberculous pleuritis, as well as peritonitis, meningitis and pericarditis of tuberculous origin, we established an antigen-specific interferon- γ (IFN- γ) release assay using cavity fluid specimens. Study subjects were 30 patients with bacteriologically confirmed active tuberculous serositis and 49 patients with definitive nontuberculous etiology. Culture was performed for 18 h with fluid mononuclear cells in the supernatant of the effusion together with saline or *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigenic peptides, early secretory antigenic target 6 and culture filtrate protein 10. IFN- γ concentrations in the culture supernatants were measured by ELISA. In patients with active tuberculous serositis, antigen-specific IFN- γ responses of cavity fluid samples were significantly higher than those of nontuberculous effusion samples. Area under the receiver operating characteristic curve was significantly greater for cavity fluid IFN- γ response than for cavity fluid adenosine deaminase and whole-blood IFN- γ release assay. The cavity fluid IFN- γ release assay could be a non-invasive method for accurately and promptly diagnosing tuberculous serositis in patients in whom active tuberculosis in the cavity space is clinically suspected but for which no bacteriological evidence can be obtained.

3. Several questions in IGRAs: Kazue HIGUCHI (Research

Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

Although it has been recommended to use QFT-2G for contact investigations in the revised guideline for contact investigation last year, there are several questions in QFT-2G. In this mini-symposium, data on several questions in the QFT-2G test were presented. These included the application of QFT-2G to vulnerable individuals in immune system such as infants and HIV-positives, the effects of chemotherapy on the QFT-2G test, the prognosis of development of active TB by QFT-2G, the next generation of QFT-2G, quality assurance of the QFT-2G test, and some problems of the current QFT-2G test. It should be important to research these questions and improve IGRAs based on the basic immunology.

Reference

- 1) Pai M, Dheda K, Cunningham J, et al.: T-cell assays for

the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. *Lancet Infect Dis.* 2007 ; 7 : 428-438.

Key words : Diagnostic tests for tuberculosis infection, Latent tuberculosis infection, *M. tuberculosis*-specific antigens, IGRAs

¹National Hospital Organization Tokyo National Hospital,

²Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

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