

結核診断用クオンティフェロン®TBゴールド検査 における血液検体の保存時間の検討

福島喜代康 久保 亨 金子 祐子 江原 尚美
松竹 豊司

要旨：〔目的〕4℃ 32時間保存後の血液検体でのクオンティフェロン® TBゴールド (QFT-3G) を検討した。〔対象と方法〕ヘパリンリチウム (LiHep) 採血管で採血後、室温でQFT-3G用採血管に分注し対照とし、4℃ 32時間保存後にQFT-3G用採血管に分注し検討対象とし、27例のQFT-3Gを比較した。〔結果〕検討群のインターフェロン- γ 値 (y) と対照群 (x) 間の相関性は $y=0.979x-0.166$ ($n=27$, $r=0.982$) と有意に強い相関を認めた ($p<0.01$)。両群間の判定に関する全体一致率は88.9% (24/27)、陽性一致率88.2% (15/17)、陰性一致率90.0% (9/10)。3例の乖離例は全てがカットオフ値付近でバラツキ範囲内であった。Bland-Altman解析では全体としては大きな系統誤差は認めなかった。〔結論〕QFT-3Gの採血法と血液保存のオプションとしてLiHep採血管での1本採血後、QFT-3G用採血管分注前に4℃で32時間まで保存した血液検体でも有意な反応性低下は認めず、QFT-3G判定結果への影響は軽微で臨床的な有用性が示唆された。

キーワード：結核, クオンティフェロン, 温度, 血液検体安定性

緒 言

結核感染の補助診断法であるインターフェロン- γ (IFN- γ) 遊離試験法 (Interferon Gamma Release Assay : IGRA) は細胞性免疫を応用した免疫学的診断法で、Tリンパ球の反応性の観点から新鮮な血液検体を用いて測定することが肝要である。そのため、クオンティフェロン® TBゴールド (QFT-3G) 用採血管で3本 (各1 mL) 採血された血液検体は速やかに37℃で培養を開始することが推奨され、室温 (22±5℃) での保存は採血後16時間まで、という条件である。2016年にQFT用の採血法と血液保存のオプションとして、ヘパリンリチウム (LiHep) 採血管による1本採血後、2~8℃で32時間まで保存が可能である方法が追加承認された。これは、今までの全血採血後の検体に関する取扱方法と考え方も異なるため、QFT-3Gの使用者にとって混乱を招いている。今回、この追加承認された方法を検証し、その結果を考察し報告する。

対象と方法

本研究プロトコルは、日本赤十字社長崎原爆諫早病院の倫理委員会で承認され、ヘルシンキ宣言に準拠して2016年8月2日から2016年12月16日に実施した。インフォームドコンセントが得られた健常人10例 (男6例, 女4例) で平均年齢49.5歳 (23~63歳) と、活動性結核で治療中および治療後の患者17例 (男7例, 女10例) で平均年齢57.8歳 (22~91歳) が本研究に登録された。

QFT-3G用採血管を用いた直接採血は、本研究では操作の煩雑さにより誤差が生じやすいと考えられたため、同一被験者より市販のLiHep採血管 (4 mL, ベクトン・ディッキンソン社) を用いて複数本採血し、対照群用と検討群用に用いた。

対照群の検体は、そのうちの1本を転倒攪拌して血液を均一にした後、5 mL用滅菌注射器 (テルモ) を用いて1 mLずつQFT-3G用採血管に分注し、5秒間10回上下に振って混和後、37℃に設定した培養器に直ちに入れ、20

時間培養した。なお、採血から1 mL分注までの血液検体の室温における保存時間は全て3時間以内であった。一方、検討対象（検討群）として、その他の1本を、当施設の検査室が通常業務で使用している薬品保存用ショーケース型の冷蔵庫（4℃設定, Sanyo MPR-311D (H), 日本）の中に試験管立てに立て32時間保存した。その後、室温に戻し対照と同様の操作後37℃に設定した培養器で20時間培養した。対照群、検討群のいずれも培養後の全血は遠心分離して、得られた血漿検体をマイクロサンプルチューブに移し替え、ELISA (Thermo Scientific Multiskan FC, フィンランド) を用いて測定するまで4℃で保存した。

全ての測定操作は、QFT-3Gの添付文書¹⁾に準じて測定した。

なお、相関検討のための統計解析はStatView ver. 5.0を使用した。

結 果

(1) 相関性検討

検討群の4℃（2～8℃）で32時間保存した全血検体のIFN- γ 値（y）と対照群（x）間の相関性を検討した（Fig. 1）。 $y=0.979x-0.166$ （ $n=27$, $r=0.982$ ）と有意な高い相関を認めた（ $p<0.01$ ）。対照群では陽性17例、陰性10例であったが、判定保留（0.1～0.35 IU/mL）はなかった。検討群では、陽性15例、陰性9例、判定保留3例であった。両群間の全体一致率は88.9%（24/27）、陽性一致率88.2%（15/17）、陰性一致率90.0%（9/10）であった。乖離例は3例あり、具体的には対照の陽性検体0.40 IU/mL→判定保留0.13 IU/mL、陽性検体0.37 IU/mL→判定保留0.34 IU/mL、陰性検体0.01 IU/mL→判定保留0.14 IU/mLであり、その全てがQFT-3Gのカットオフ値（0.35 IU/

mL）付近であった。さらに判定保留を陰性とみなすと、両群間の全体一致率は92.6%（25/27）、陽性一致率88.2%（15/17）、陰性一致率100.0%（10/10）と一致率は向上した。

(2) Bland-Altman解析²⁾³⁾

4℃（2～8℃）で32時間保存した検討群と対照群について、縦軸は検討と対照の個々のIFN- γ 値の差を、横軸は検討と対照の個々のIFN- γ 値平均をBland-Altmanプロットした（Fig. 2）。縦軸である両群の個々の差の平均は-0.23 IU/mLで標準偏差は0.705 IU/mL、95%信頼区間は-1.63～1.15でありやや負方向であった。保存検体の反応性は低下方向にややシフトしている。x軸の2.0 IU/mL付近で95%信頼区間下限を逸脱したのは2点のみあり系統誤差と認められたが、それより高値領域では目立った系統誤差は認められなかった。そして全体としては大きな系統誤差は認めなかった。

考 察

採血後に室温（22±5℃）で保存された全血中のTリンパ球の免疫活性は時間経過と共に低下していることが認められている。QFT-3Gは被験者の結核感染の有無を検出する定性検査であるが、検体のIFN- γ 値が定量値として算出するので敢えて定量的な比較を実施した。定量的な相関性検討では対照群と検討群間がきわめて高い相関性を認めた。また定性的な比較における3例の乖離例が全てカットオフ値付近のバラツキのある領域であり、実質的には4℃（2～8℃）で32時間血液検体保存でもTリンパ球の免疫活性が維持されていることを示している。また、Bland-Altman解析でもやや反応性低下の方向にあるものの、全体としては大きな系統誤差は認めなかったことから4℃、32時間保存でもTリンパ球の免疫活

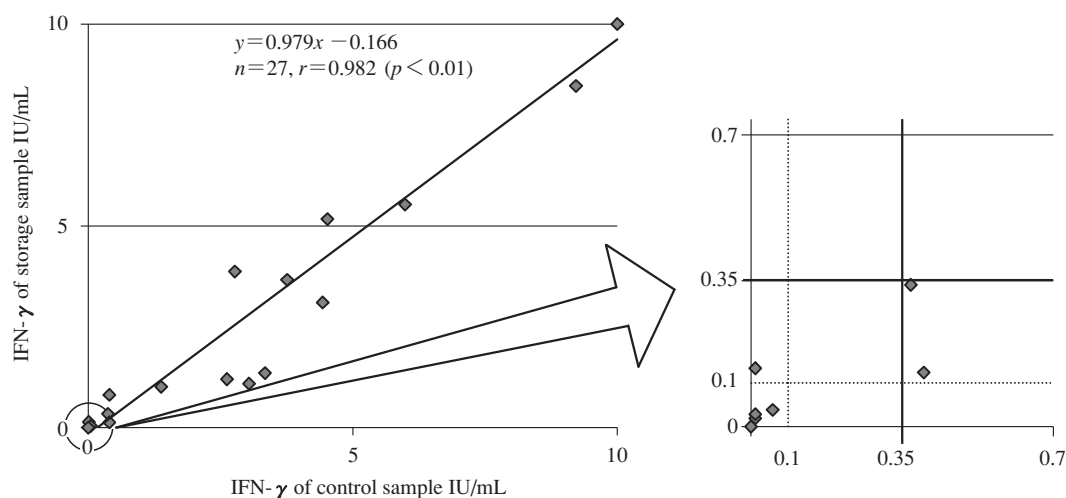


Fig. 1 Correlation of IFN- γ levels of blood samples between control and storage (32 hrs, 4°C).

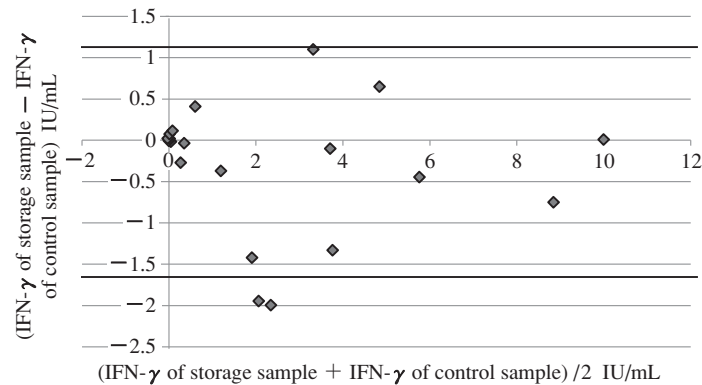


Fig. 2 Bland-Altman plot graphing the bias and the limits of agreement on the vertical against the average of the storage samples and control samples on the horizontal.

性の維持が確認された。乖離例は3例あったが、QFT測定値の変動係数は15%程度あるとされている。その変動要因として同一血液検体を用いても刺激抗原に対する細胞性免疫応答の違いによる変動、QFT検査の操作上の誤差として、例えばELISAでの洗浄などのテクニカルな誤差等による変動などが考えられる。QFT陰性例の臨床的判断としてQFT検査は結核診断の補助診断であり総合的に結核を強く疑う場合はQFTの再検査を推奨する。

今回、血液検体の保存に利用したショーケース型の冷蔵庫（4℃設定）は試験期間中でもスライド式の扉が数回開閉されたが、Tリンパ球の免疫活性の維持が認められた。この冷蔵庫とは別に、4℃設定のクールインキュベーター（KMH-50, AXEL）を使用して血液検体保存期間中に全く扉の開閉をしないように保存した検討群（ z ）と冷蔵庫保存検体群（ y ）の相関式は $z=1.06y+0.01$ （ $n=27$, $r=0.95$ ）と高い相関性を認めた。これらの結果は、冷蔵庫内温度の一時的上昇は短時間のために血液検体自体への温度変化とはならないことが予想され、短時間の開閉の影響も軽微であると考えられた。このような一般的な検査室の冷蔵庫でのQFT-3G用血液検体の保存がより実用的でもある。

またQFT-3G検査は、通常室温保存は採血後16時間までという条件があるが、LiHep採血管による1本採血後4℃で32時間まで保存した血液検体を用いても、QFT判定結果への影響は軽微であった。すなわち、日常診療で結核を疑った場合、地理的な問題（僻地、離島あるいは災害後など）や夜間・休日採血の場合などでも4℃で32時間まで保存でのQFT判定結果に大きな問題はない。以上より、今回検討した採血後に4℃で32時間まで血液保存のオプションは、臨床的に有用性があると考えられる。

JarvisらはQFT検査で22℃以下の低温（4℃, 15℃, 22℃）保存では陽性コントロールが抑制されると報告している⁴⁾。しかし、むしろ30℃, 37℃の高温では陽性コント

ロールが増幅されている。また、マウスにおいて低温では未感作ヘルパーT細胞からのインターロイキン生成/分泌は抑制されるが、記憶T細胞の活性化は低温でもそのような機能抑制はない⁵⁾。すなわち、QFT検査で低温保存では記憶T細胞からのIFN- γ の産生に影響しないと推測される。

今回の検討では保存条件が4℃, 32時間の1点だけであり、経時変化による結果の変動は検討していない。他の経時変化等の傾向を検証するには、測定点の増加による被験者個人からの採血量の増加のみならず実験操作の煩雑さと実験条件の厳格性が低下するために本施設内で実施するには限界があった。

本研究は1施設の限られた数の対象者で得られた結果であるため、他施設で同様の検証が行われることが望まれる。

結 論

QFT-3Gの採血法と血液保存のオプションとしてLiHep採血管による1本採血後に4℃で32時間まで保存した血液検体を用いてもQFT-3G判定結果への影響は軽微と考えられ、臨床的に有用であることが示唆された。

著者のCOI（conflicts of interest）開示：本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) クオンティフェロン®TBゴールド添付文書（第11版）
- 2) Bland JM, Altman DG: Statistical method for assessing agreement between two methods of conical measurement. *The Lancet*. 1986; 1 (8476): 307-310.
- 3) Bland-Altman 解析手順. http://jspt.japanpt.or.jp/ebpt_glossary/bland-altman-analysis.html
- 4) Jarvis J, Gao Y, de Gaarf H, et al.: Environmental temperature impacts on the performance of QuantiFERON-TB Gold In-

Tube assays. *Journal of infection*. 2015 ; 71 : 276–280.

- 5) Wang-Yang M, Buttke TM, Miller NW, et al.: Temperature-mediated processes in immunity: Differential effects of low

temperature on mouse T helper cell responses. *Cellular Immunology*. 1990 ; 126 : 354–366.

—————Short Report—————

STUDY ON TIME-RELATED STABILITY OF BLOOD SAMPLE FOR
QuantiFERON® TB GOLD AS AN *IN VITRO* DIAGNOSTIC FOR
INFECTION WITH *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Kiyoyasu FUKUSHIMA, Toru KUBO, Yuko KANEKO, Naomi EHARA,
and Toyoshi MATSUTAKE

Abstract [Object] Evaluation of blood sample stability stored at 4°C for 32 hours after blood drawing for QuantiFERON TB Gold (QFT-3G).

[Materials and Methods] Blood samples from 27 donors were drawn into multiple lithium heparin (LiHep) tubes. The blood samples from one LiHep tubes were aliquoted into QFT-3G tubes at room temperature (Control group) and the other LiHep tubes were stored at 4°C for 32 hours and then aliquoted into QFT-3G tubes (Study group). The QFT-3G test results using blood samples of the Study group were compared to those of the Control group.

[Results] Interferon- γ levels of the Study group (y) significantly correlated with those of the Control group (x): $y=0.979x-0.166$ ($n=27$, $r=0.982$, $p<0.01$). The total agreement between these two groups was 88.9% (24/27), with a positive agreement of 88.2% (15/17), and negative agreement of 90.0% (9/10). Discrepant interpretations were found in three instances, of which interferon- γ levels were in

the vicinity of the cut-off point and within the expected limit of assay variation. The results of the Bland-Altman analysis did not show significant differences between these two groups.

[Conclusion] The results support single LiHep blood draw and storage at 4°C for 32 hours prior to blood transfer to the QFT-3G assay tubes as there was no significant loss of reactivity found compared to standard methods.

Key words: Tuberculosis, QuantiFERON, Temperature, Blood sample stability

Department of Respiratory, Japanese Red Cross Nagasaki Genbaku Isahaya Hospital

Correspondence to: Kiyoyasu Fukushima, Department of Respiratory, Japanese Red Cross Nagasaki Genbaku Isahaya Hospital, 986–2, Keya, Tarami-cho, Isahaya-shi, Nagasaki 859–0497 Japan. (E-mail: kiyofuku@isahaya.jrc.or.jp)