

## 第86回総会ミニシンポジウム

## Ⅲ. IGRAの新しい展開

座長 <sup>1</sup>原田 登之 <sup>2</sup>星野 仁彦

キーワード：QFT-3G, T-SPOT.TB, IGRA, 応用, 免疫応答

シンポジスト：

1. IGRAにおける課題と今後について  
樋口一恵（公益財団法人結核予防会結核研究所）
2. HIV感染者やステロイド服用患者等の免疫脆弱宿主においてIGRA（Interferon- $\gamma$  Release Assays）をどのように利用するか？  
藤田 明（東京都立多摩総合医療センター）
3. 小児を対象とした精度の高い結核感染診断に向けて；2種のIGRAおよびIP-10測定の比較検討  
徳永 修（国立病院機構南京都病院）
4. 局所検体を用いてT-SPOT.TBによる結核感染診断の臨床評価  
小橋吉博（川崎医科大学）
5. 日本人のgenetic backgroundとIGRA  
星野仁彦（国立感染症研究所ハンセン病研究センター）

従来の結核感染診断法であるツベルクリン反応検査（ツ反）の弱点，特に特異度の点で格段の高精度をもつ診断試薬Interferon-gamma Release Assays（IGRA）が開発され約10年余りになり，日本を含む多くの先進諸国における結核関連のガイドラインにおいて，その使用が推奨されている。現在IGRAには，日本でも承認されている全血を用いるクオンティフェロン®TBゴールド（通称QFT-3G，海外ではQuantiFERON®TB Gold In-Tubeと呼ばれる）と，日本において未承認である精製末梢血単核球を用いるT-SPOT®.TB（T-SPOT）があり，両者共に結核菌特異抗原により刺激された感作T細胞から産生されるInterferon-gamma（IFN- $\gamma$ ）を指標として結核感染を診断する。しかし，急速にIGRAの使用が広まってい

る一方で，検討されるべき課題も数多くあるのが現実である。特に，結核のリスク集団であるHIV感染者，透析患者等の免疫脆弱集団や小児におけるIGRAの診断能力に関しては重要な検討課題であり，一貫した使用基準の作成が待たれる。また，QFT-3Gについては，以前のQFT-2Gより陽性率・判定保留率が上昇しているケースが多く見られており，これが感度上昇によるものか，あるいは他の要因によるものか早急に明らかにする必要があると考えられる。もう一つのIGRAであるT-SPOTは，多くの比較研究によりQFT検査よりも感度が高く，小児や免疫抑制者においても診断性能はQFT検査よりも優れていると報告されており，またT-SPOT検査の応用として胸水や髄液等の血液以外の検体も使用されることもあり，今後日本でも承認が得られるものと思われる。さらに，現状のIGRAを改良する試みもなされており，IFN- $\gamma$ と同時にIP-10を測定し両者を総合的に判断することにより感度が上昇するという報告がなされている。こうした状況において，本ミニシンポジウムでは5名の先生方に，IGRA研究の現状・問題点，および今後の方向性についてのご講演をいただいた。

公益財団法人結核予防会結核研究所の樋口一恵先生には，IGRAの原理，使用上の注意点，およびQFT-3GとT-SPOTの特異度を比較し両者は共に高特異度を有していることを報告していただいた。東京都立多摩総合医療センターの藤田明先生には，HIV感染者やステロイド服用者等の免疫脆弱宿主においてもQFT検査は有用であることを示唆する報告をいただいた。国立病院機構南京都病院の徳永修先生には，小児におけるQFT-3GとT-SPOTの比較，およびIP-10測定の有用性について報告をいただいた。川崎医科大学の小橋吉博先生には，T-SPOT

<sup>1</sup>公益財団法人結核予防会結核研究所，<sup>2</sup>国立感染症研究所ハンセン病研究センター感染制御部

連絡先：原田登之，公益財団法人結核予防会結核研究所，〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

(E-mail: harada@jata.or.jp)

(Received 10 Sep. 2011)

検査を血液以外の局所検体に応用した結果、その有用性と限界について報告いただいた。国立感染症研究所ハンセン病研究センターの星野仁彦先生には、HLAの型によって結核菌特異的抗原に対する免疫応答の強度が異なる可能性を示す報告をいただいた。

今回のミニシンポジウムでは、IGRAの問題点や今後の新しい展開について示された。しかし、症例数が限られていることから、さらなる多施設による種々の検討も必要であるという認識をもつ機会になったと思われる、今後の精力的なIGRA研究の進展に期待したい。

## 1. IGRAsにおける課題と今後について

公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部 樋口 一恵

### はじめに

これまで結核感染診断法として使われていたツベルクリン反応（ツ反）に代わり、現在ツ反より感度・特異度共に優れているInterferon-Gamma Release Assays (IGRAs)が多くの先進国において使用されている。日本においても、IGRAsの一つであるクオンティフェロン®TB (QFT)検査が承認され、また保険収載もされている。QFT検査は、接触者健診のガイドラインや医療施設内における結核管理のガイドラインにおいて積極的に使用するよう推奨されており<sup>1,2)</sup>、今やQFT検査なしでは日本の結核対策が成り立たないような状況にあると考えられる。現在、QFT検査はQFT-2G検査から第3世代であるクオンティフェロン®TBゴールド (QFT-3G)に切り替わっているが、検体の取り扱いによっては正しい結果が得られない場合もあることが分かってきた。また、もう一つのIGRAs検査であるT-SPOT®.TB (T-SPOT)検査も将来診断試薬として日本で承認される可能性も考えられるため、本講演ではまずIGRAs検査の原理を述べ、次にQFT-3Gにおける結果の変動要因、さらに日本においてT-SPOT検査の特異度の検討を行ったので報告する。

### IGRAs検査の原理

IGRAs（日本語で、結核菌特異的インターフェロングamma遊離試験）とは、結核の感染を受けたヒトの血液、

あるいは精製末梢血単核球に、結核菌に特異的なタンパク（ESAT-6とCFP-10はQFT-3GとT-SPOTの両者に使われ、TB 7.7はQFT-3Gのみで使用されている）抗原を20時間前後作用させ、抗原特異的T細胞から産生放出されるインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )を測定し結核感染を診断する方法である。多くの国で承認されているIGRAsと呼ばれる結核診断法には、QFT-3GとT-SPOTの2種類 (Table 1)があり、測定の対象は両者ともに抗原特異的に産生されたIFN- $\gamma$ を対象としている。しかし、QFT-3GとT-SPOTは、IFN- $\gamma$ を検出する方法が異なる。QFT-3Gでは、抗原刺激後に血漿中に産生されたIFN- $\gamma$ 量をELISAにより定量する (Fig. 1)。一方、T-SPOTは抗原刺激後にIFN- $\gamma$ を産生する抗原特異的T細胞の個数をELISPOT法により計測する (Fig. 2)。両検査はそれぞれ特徴があり、採血から培養までの時間はQFT-3Gが採血後16時間以内、T-SPOTでは32時間以内であり、手技的にはQFT-3GよりT-SPOTのほうがより煩雑である。一方、培養後のIFN- $\gamma$ の検出はT-SPOTのほうがより簡単である。両者の性能比較は数多く報告されており、それらを統合したメタアナリシスによると、感度はT-SPOTが優れており特異度はQFT-3Gが優れている<sup>3,4)</sup>。また、ツ反と同様にIGRAs検査も生体の免疫反応を通して結核感染を検出する方法であるため、検査性能が生体の免疫状態に左右されることも知られているが、一般的にQFT-3GよりもT-SPOTのほうが影響を受けにくいとす

Table 1 Characteristics of QFT-3G and T-SPOT.TB

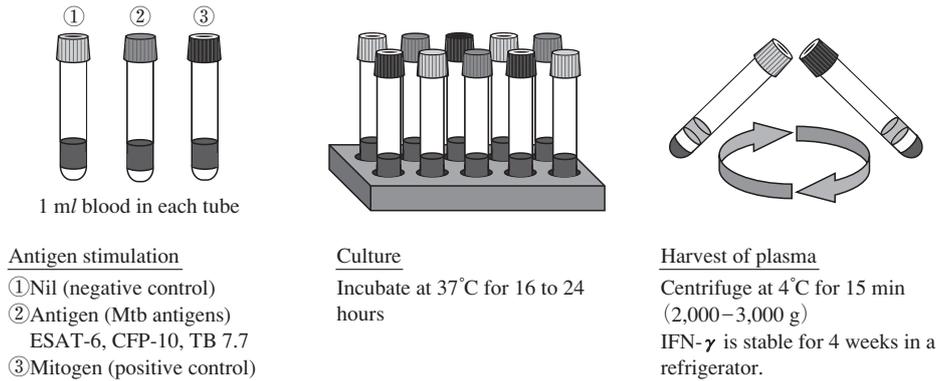
IGRAs	QFT-3G	T-SPOT.TB
Material	Whole blood	PBMC
Antigens	ESAT-6, CFP-10, TB 7.7	ESAT-6, CFP-10
Time until antigen stimulation	16 hours	32 hours
Time for antigen stimulation	16–24 hours	16–20 hours
Method for measurement	ELISA	ELISPOT
Measure	Measure IFN- $\gamma$ in plasma with a plate reader	Count IFN- $\gamma$ produced cell spot numbers
Cut-off point	IFN- $\gamma$ $\geq$ 0.35 IU/ml	Spot number $\geq$ 6 (Europe)
Required time	About 24 hours	About 20 hours
The youngest age for test	More than 5 (Japanese guideline)	From 0

る報告が多い<sup>5)</sup>。

IGRAsの最大の利点は、血液あるいは末梢血単核球の刺激に用いられている結核菌抗原がBCGやほとんどの非結核性抗酸菌に存在しないことから、BCG既接種集団における特異度がツ反に比べ非常に優れていることであろう。感度もツ反より優れており、また被検者は1回の採血で済み、短時間で結果が得られる。さらに、ツ反のようなブースター効果もないという利点ももつ。このよ

うに、IGRAs検査はツ反のもついくつかの重大な弱点を克服した診断法であると言える。このようにIGRAs検査はツ反よりは優れているものの、一般的な血液検査と異なり、結核菌特異抗原により刺激された生きたリンパ球から産生されるIFN- $\gamma$ を測定するため、次項で述べるように検体の取り扱いには細心の注意が必要である。検体の取り扱いが適切に行われないと正しい結果が得られない場合もあり、誤診断の結果、被検者が重大な不利益を

Stage 1: Blood culture and harvest of plasma



Stage 2: IFN- $\gamma$  ELISA and analysis

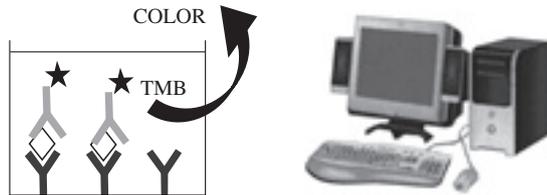


Fig. 1 Flow chart of QFT-Gold In-Tube (QFT-3G)

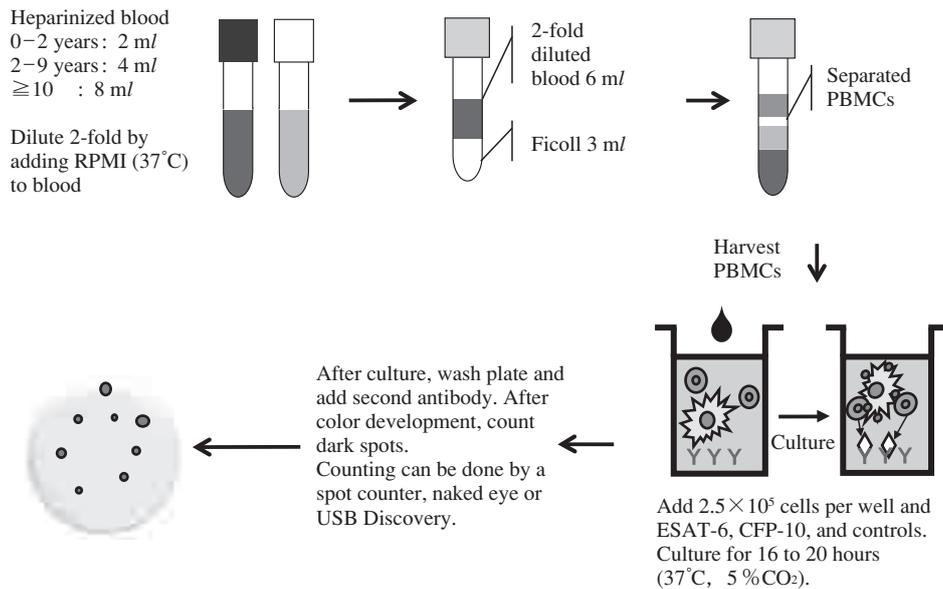


Fig. 2 Flow chart of T-SPOT.TB

被ることになることを、IGRAs検査を利用するわれわれは肝に銘ずべきであろう。さらに検査結果を判断するうえで、活動性結核と潜在性結核感染の区別はできないこと、および結核感染の時期を特定することもできないというIGRAs検査の特性を十分理解することが重要であろう。これらの区別には、他の検査結果や臨床所見、あるいは過去の接触歴等の情報を合わせた総合的な判断が必要となることも明記すべきことである。

### QFT-3G検査の結果に影響を及ぼす因子

現在、接触者健診においてQFT-3G検査が積極的に使用されているが、QFT-2Gと比較し検査の陽性率、判定保留率が共に上昇していることが見られる。この要因の一つには、QFT-3Gの感度が上昇していることが挙げられるであろう。われわれのQFT-2GとQFT-3Gの性能を比較した臨床試験の結果では、統計的にQFT-3Gの感度がQFT-2Gのそれよりも上昇しており、他方両者共に高特異度であることが示されている<sup>6)</sup>。QFT-3Gの感度が上昇した原因としては、いくつかの可能性が考えられる。まず第一に、QFT-2Gにはなかった新たな結核菌特異抗原TB.7.7がQFT-3Gで使用されていることである。次に、QFT-2Gでは個々の抗原刺激により産生されたIFN- $\gamma$ 値の高いほうを指標として用いていたが、QFT-3Gでは3つの抗原が1本の採血管に混合されているために、それぞれの抗原刺激により産生されたIFN- $\gamma$ の総和を指標とし判断する。そのため、個々の抗原に対し弱い反応があった場合でも、QFT-2Gで陰性、あるいは判定保留とされていたものが、QFT-3Gでは判定保留や陽性となり感度が上昇している可能性も十分考えられる。また、QFT-2Gでは培養プレートによる血液培養であったが、われわれはプレートを単にQFT-3G専用採血管と同様の径をもつチューブに変更するだけで感度が上昇することを観察しており、このこともQFT-3Gの感度上昇の一因と考えている。

しかし一方では、感度の上昇だけでは説明が困難な、陽性や判定保留の結果が接触の濃厚さと相関しない場合もあり、このような原因を明らかにすることは急務であ

る。特に2011年6月のH保健所のQFT検査中止発表は、大きな波紋を起している。QFT検査結果が不安定となる大きな要因の一つとして考えられるのは、採血後の採血管の強振による分離剤の血液への混入である (Table 2)。当初QFT-3G採血管の振り方は、上下に5秒間、あるいは10回激しく振るとされていたが、この振り方では検体の保存温度が高い場合に分離剤が柔軟になり容易に血液へ混入し非特異的なIFN- $\gamma$ 産生を誘導する現象が起こることが判明した。その結果、採血管の振り方の動画が、それまでの激しい振り方からゆっくり振るように変更された<sup>7)</sup>。夏場は特に室温が上昇することが考えられることから、検体の保存温度と採血管の振り方には十分な配慮が必要であろう。

次の要因として、培養後の採血管を遠心分離した際の、分離剤上に残存する血液残渣成分のELISAプレートへの混入である。QFT-3Gのシステムでは、血液培養後に採血管を遠心すると分離剤により血漿と血球成分が分離でき、培養後の血漿回収がQFT-2Gより容易になっていることも特徴の一つである。しかし上記したように、われわれは分離剤上に残存する血液残渣成分がELISAプレートへ混入することにより、ELISAの発色段階において非特異的な発色が起こることを見出した。この原因として、血液残渣成分には生細胞が含まれており、これがELISAプレート内における2時間の免疫反応の間にプレートに付着し、プレート洗浄後も細胞の一部は付着したままであり、これに発色液を添加すると細胞が壊れ種々の酵素が細胞より放出されることにより、IFN- $\gamma$ とは関係のない発色反応が見られることにあると考えられる。実際に、回収した血漿検体を再遠心することにより、計算されるIFN- $\gamma$ 値が低下することが認められることから (Table 3, Fig. 3)、回収した血漿検体、特に培養後遠心された採血管が検査する場所に搬入された場合は、血液残渣成分は血漿中に遊離している可能性も十分考えられることから、いったん検体回収チューブに血漿を回収した後に再遠心することが強く勧められる。

その他の変動要因としては、採血量の問題がある。製

**Table 2** Effects of shaking methods of QFT-3G tubes on test results (Verification in Nil tubes)

Healthy volunteers No.	How to shake tubes	
	Mild shaking	Vigorous shaking
	IFN- $\gamma$ production (IU/ml)	
1	0.13	4.67
2	0.10	2.22
3	0.06	1.30
4	0.31	5.76
5	0.04	1.11

**Table 3** Verification of re-centrifugation

ID No.	Without	With
1	0.49	0.14
2	3.07	3.02
3	1.56	1.32
4	0.15	0.07
5	0.12	0.05
6	0.37	0.45
7	0.12	0.06
8	0.07	0.04
9	0.41	0.33

IFN- $\gamma$  values decreased in 5 among 9 samples (55.55%).

造元によると、採血量が0.8から1.2 mlの範囲で結果が妥当であるとされている。では、この範囲を逸脱するとどのような結果が得られるのであろうか。われわれは、少人数ではあるが採血量を変化させ、各血液量におけるIFN- $\gamma$ の産生量を検討した結果、血液量が多くなると産生量は低下する方向に傾き、逆に採血量の低下はIFN- $\gamma$ 産生量が上昇する方向に傾くことが観察された (Fig. 4)。従って、同一被検者であっても採血量が適切な範囲を逸脱した場合は結果が変動するため、採血量には十分な注意が必要である。

さらに、QFT-3Gはこれら以外にも結果が不安定になる要素を含んでいるため、判定基準の見直しを示唆する論文も報告されている<sup>8)</sup>。このような要素が個体の免疫応答の変動によるものか、あるいはシステム自体に問題があるのか現状では不明であるが、診断法の根幹に関する

重要な問題であるため早急に明らかにする必要があると考えられる。

### T-SPOT 検査の特異度

もう一つのIGRAsであるT-SPOTは、現在日本においては診断試薬として未承認であるが、欧米ではQFTと同様に結核診断試薬として承認され広く用いられている。先にも述べたように、感度はQFT検査より高いことがメタアナリシスにより示されている一方、特異度は一般的にQFT検査のほうがT-SPOTよりも高いとされており、われわれも以前同様の報告をしている<sup>9)</sup>。しかし、このような結核感染診断法の特異度を検討するための対象集団の選別は、潜在性結核感染の「絶対基準」が存在しないため困難であり、特に途上国においては健常者の中にも多くの潜在性結核感染者が含まれている可能性は否定できない。この点について、われわれは新たに結核感染の低リスク者をできるかぎり厳重に選別し、日本においてT-SPOTとQFT-3Gの特異度を再度比較した。その結果、T-SPOTとQFT-3Gは日本における判定保留という、いわゆるグレーゾーンを考慮しない場合は全く同一の99.1%という高特異度をもつことが示された。ただし、判定保留を考慮した場合は、T-SPOTの特異度に変化はないが、QFT-3Gの特異度は86.5%に低下することが見られた (Table 4)。これらの結果は、結核未感染者におけるT-SPOTの特異度は非常に高いことを示唆していると考えられる。

### IGRAsの今後

QFT検査は、QFT-2G検査として最初2005年に発売されて以降6年以上経過し、現在ではその後継試薬であるQFT-3Gが使用されるに至っている。T-SPOTも将来日本において承認される可能性が十分考えられ、T-SPOT

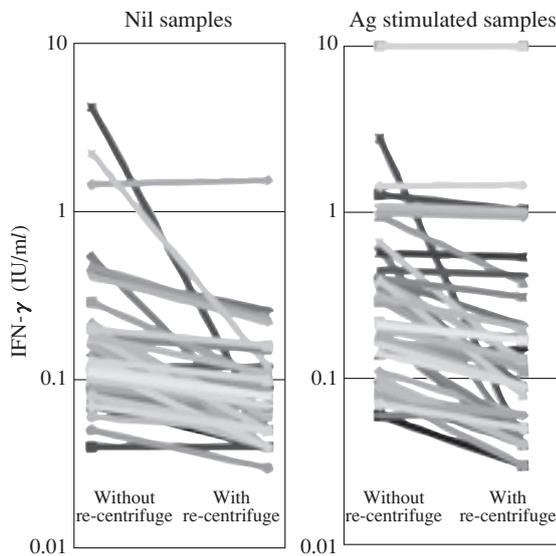


Fig. 3 Fluctuation of IFN- $\gamma$  values with or without re-centrifugation

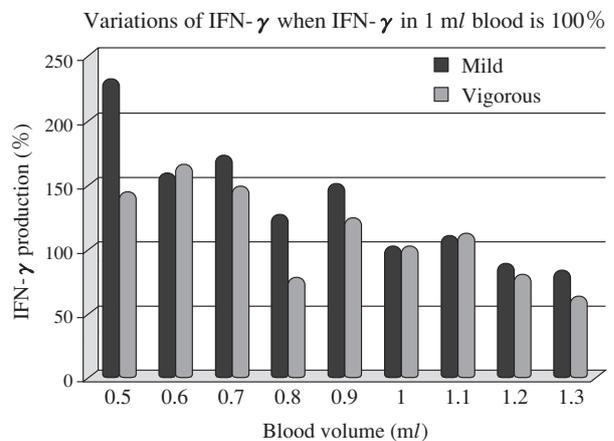
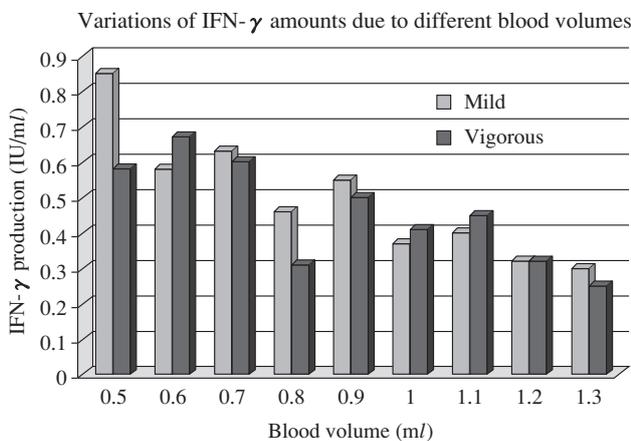


Fig. 4 Correlation between blood volumes and IFN- $\gamma$  amounts (n=2)

**Table 4** Comparison of specificity between T-SPOT.TB and QFT-3G

		T-SPOT.TB <sup>2</sup>			
		Positive	Border	Negative	Total
QFT-3G <sup>1</sup>	Positive	1	0	0	1
	Border	0	0	14	14
	Negative	0	0	96	96
	Total	1	0	110	111

Cut-off:

1. 0.1 IU/ml below: negative, From 0.1 IU/ml to 0.35 IU/ml: border  
More than 0.35 IU/ml: positive

2. Less than 4 SFC: negative, 5–7 SFC: border, More than 8 SFC: positive

はQFT検査が不得意とする集団においても診断性能は優れていることが知られていることから、承認されれば結核感染診断がより一層充実するものと考えられる。しかし、一方ではIGRAs検査はツ反と比べると歴史は浅く、その診断特性が十分把握されていない面も多々あると思われる。IGRAsは潜在性結核感染者の診断に威力を発揮するが、感染から陽性になるまでの期間、あるいは年齢や治療が及ぼす影響、免疫抑制者における反応性、乳幼児での反応性等、明確にすべき検討課題も多く残されている。特に、結核感染した個人の免疫応答の強弱により判定が変動する可能性も考えられているが、この点についての解析はほとんどされていないのが現状である。また、QFT-3G検査は採血の時から採血量や採血管の振り方、あるいは採血検体の保管温度等、注意すべきことが多々あるため、採血現場においては決してユーザーフレンドリーな検査法とは言えず、さらなる改善が期待される。

### おわりに

IGRAs検査は、今や日本の結核対策にとって必須の診断法として位置付けられているため、正確な検査結果を得られるように利用者側もまた販売会社側もより一層努力する必要があると思われる。また、検査特性の不明な点についても今後さらなる研究の進展が待たれる。

## 2. HIV感染者やステロイド服用患者等の免疫脆弱宿主においてIGRAs (Interferon- $\gamma$ Release Assays) をどのように利用するか?

東京都立多摩総合医療センター呼吸器科 藤田 明

### はじめに

HIV感染者、人工透析患者、ステロイド等免疫抑制薬服用患者など結核発病のハイリスク患者から発病を防ぐためには、早い時点で結核感染を診断し、潜在性結核感染症 (LTBI) を治療することが有効と考えられる。とく

### 文 献

- 1) 財団法人結核予防会：改正感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引きとその解説。平成22年改訂版。2010。
- 2) 日本結核病学会予防委員会：医療施設内結核感染対策について。結核。2010；85：477–481。
- 3) Pai M, Zwerling A, Menzies D: Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med.* 2008；149：177–184。
- 4) Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A: Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest.* 2010；137：952–968。
- 5) Lange C, Mori T: Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology.* 2010；15：220–240。
- 6) Harada N, Higuchi K, Yoshiyama T, et al.: Comparison of two whole blood interferon- $\gamma$  assays in tuberculosis patients and healthy controls. *J Infection.* 2008；56：348–353。
- 7) 日本ビーシージー株式会社ホームページ：http://www.bcg.gr.jp/qftgold/index.html
- 8) Schablon A, Harling M, Diel R, et al.: Serial testing with an interferon- $\gamma$  release assay in German healthcare workers. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* 2010；5：pii：Doc05。
- 9) Higuchi K, Kawabe Y, Mitarai S, et al.: Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2009；198：33–37。

に、HIV感染者に対しては、WHOは3つの‘I’s戦略の一つとしてIsoniazid preventive therapyを提唱している。しかし、免疫脆弱宿主ではLTBI診断のツールであるInterferon- $\gamma$  release assays (IGRAs)は、細胞性免疫機能低下のためにその反応が低下する恐れがある。すなわち、結核菌に感染していても偽陰性や判定不能となる可能性

がある。

免疫脆弱宿主でも結核診断におけるクオンティフェロン (QFT) の有用性は免疫適格宿主と同様であるとする報告があるが<sup>1)</sup>, 免疫脆弱宿主における研究でも免疫適格宿主も含めた検討でも末梢血リンパ球数減少例では感度が低下すると報告されている<sup>2)3)</sup>。また, QFTの測定原理からも細胞性免疫機能はQFTの結果に影響を及ぼすと考えられる。しかし, QFTの診断性能を免疫脆弱宿主の疾患単位や病態との関連から検討した報告は少ない。

## 研究 1

IGRAs適用に関する米国CDCガイドライン (2010) においては, 免疫脆弱宿主におけるデータはまだ限定的と記載されているが, HIV感染者の日和見感染予防治療に関する米国ガイドラインでは, LTBIの診断のためにIGRAsまたはツベルクリン検査を実施することと記載している<sup>4)</sup>。

演者らは, HIV感染者107例 (うち結核治療開始前の活動性結核患者は9例) を対象にクオンティフェロン® TB-2G (以下QFT-2G) 検査の診断性能を, とくにCD4陽性リンパ球数 (CD4<sup>+</sup>) に注目して検討した。

詳細は演者らが発表した論文<sup>5)</sup>を参照されたいが, CD4<sup>+</sup>50/μL以上の群では結核患者6例中5例でQFT-2G陽性 (ESAT-6またはCFP-10が0.35 IU/mL以上) で感度は83%, 特異度99%であった。CD4<sup>+</sup>50未満の群では判定不能例が50/μL以上の群と比較して有意に多かった (p<0.0001)。また, CD4<sup>+</sup>が500未満では陽性コントロールに対するインターフェロンγの反応性はCD4<sup>+</sup>が少ないほどより低下していた (p=0.0001)。HIV感染者においてCD4<sup>+</sup>が50以上ならばQFTの感度・特異度は高いといえるが, それでもHIV感染者においてはインターフェロンγの反応性が低下する点には留意すべきであろう。

なお, 活動性結核を合併したHIV感染者におけるQFT-2Gの結果については演者らの報告を含めて国内でこれまで3本の報告 (Table)<sup>5)~7)</sup>があり, 陽性率は56~77%である。

## 研究 2

2010年にQFT-2Gから移行したクオンティフェロン® TBゴールド (以下QFT-3G) による結核発病患者の診断感度はQFT-2Gの83.0%と比較して92.6%と高いことが報告されている<sup>8)</sup>。

研究2では, 免疫脆弱宿主を対象にQFT-3Gによる結核の潜在性結核感染症 (LTBI) 発見の可能性について検討するために, 臨床的には活動性結核と診断されていない患者に対してQFT-3G検査を行った。ただし, LTBI確定のgold standardはないこと, QFT-3G検査後の観察

**Table** Results of QuantiFERON®-TB Gold (QFT-2G) among active TB patients with HIV infection in Japan

Study	National survey <sup>6)</sup> n=19	Fujita <sup>5)</sup> n=9	Nagai <sup>7)</sup> n=13
Number of pts.			
Interpretation			
Negative	37%	22%	0%
Doubtful positive	5	11	15
Positive	63	56	77
Indeterminate	5	11	8
CD4 <sup>+</sup> <50 of total cases	NA	23	38

NA: not available

期間が現時点で短いという限定された検討である。

### (1) 方法

対象はHIV感染者42例 (男/女: 34例/8例, 平均年齢48±15歳, CD4数の分布は6~1131/μL), 透析患者15例 (男/女: 13例/2例, 平均年齢67±10歳), ステロイド等免疫抑制療法患者27例 (男/女: 9例/18例, 平均年齢61±15歳) の3グループである, 結果は添付文書に従い陽性, 判定保留, 陰性, 判定不可と分類した。

### (2) 結果

① HIV感染者: 臨床的には活動性結核と診断されていない患者42例ではQFT-3G検査の結果, 陽性例は2例 (5%), 判定保留 (疑陽性) 例は2例 (5%), 判定不可は2例 (5%) であった。陽性あるいは判定保留の4例うち3例は過去のQFT検査 (QFT-2G) は陰性であった。なお, 肺結核またはLTBIの治療歴を有する例が3例含まれていたが, QFT-3Gはすべて陰性であった。結核発病3例において, QFT-3Gは陽性であった。

② 透析患者: 臨床的には活動性結核と診断されていない患者15例にQFT-3G検査を行った結果, 陽性例は3例 (20%), 判定保留 (疑陽性) 例は3例 (20%), 判定不可は0例であった。結核発病3例において, 2例はQFT-3G陽性, 1例は判定保留 (疑陽性) であった。

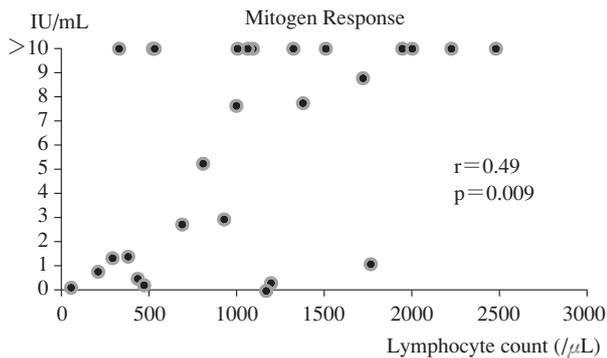
③ 免疫抑制療法患者: 疾患別では関節リウマチが最も多く12例 (44%) で, ステロイドは25例 (93%) に投与, 11例 (41%) にメソトレキサートを, 11例 (41%) にその他の免疫抑制剤が投与されていた。

臨床的には活動性結核と診断されていない患者27例にQFT-3G検査を行った結果, 陽性例は2例 (7%), 判定保留 (疑陽性) 例は2例 (7%), 判定不可は4例 (15%) であった。結核発病2例において, 1例はQFT-3G陽性, 1例は判定保留 (疑陽性) であった。

末梢血リンパ球数が500未満では陽性コントロール値もかなり低下していたが (Fig.), リンパ球数と陽性コントロール値が必ずしも相関しない例が存在した。

### (3) 考察

① HIV感染者: 今回のQFT-3G検査では, 演者らが



**Fig.** Relationship between lymphocyte count and mitogen response using QFT-GIT (QFT-3G) in patients on immunosuppressive therapy (n=27)

QFT-2Gを用いて検討した結果と比較して結核非発病例における陽性率が高いようであったが、QFT-3G検査の検討例数は少なく、この2つの検討におけるCD4<sup>+</sup><50の例の割合に差があるため、さらに多数例による検討が必要である。

②透析患者：このグループでは高齢者が比較的多く、QFT-3G陽性例の中には過去の既感染者も含まれる可能性があるが、LTBI治療を推奨する方向性からは、陽性であれば年齢の影響のみと解釈せずにLTBI治療について検討したほうがよいかもしれない。QFT-2Gによる検討は井上らが活動性結核を含む131例中で24.1%が判定不能、非結核例（既往なし）でも10例が陽性であると報告しており<sup>9)</sup>、透析患者の中にはLTBIが少なからず存在する可能性がある。

③免疫抑制療法患者：関節リウマチにおけるQFT-2GによるLTBI診断に関しては、坂野が結核既治療患者の結果から陽性のCut-off値を0.1 IU/mLまで下げても問題ないと考えられたと報告しているが<sup>10)</sup>、結核既治療患者の成績をもってLTBI診断の値を設定してよいのかについて疑問もあり、今回は添付文書に従って判定した。

判定不能4例中2例はステロイドパルス後、1例はエンドキサンプルス後であり、このような時期にQFTを検査することは避けたほうがよいと思われた。

実地臨床において免疫抑制療法患者に対してIGRAsを検査するタイミングとしては、a) 治療（免疫抑制療法）開始時、b) 生物学的製剤導入時、c) 定期的（年1回?）、d) 結核発病を鑑別診断したい時、などがあげられる。a) b) c) はLTBIのスクリーニングとしての検査である。しかし、IGRAsの感度については、末梢血リンパ球数が少なくなると低下すると報告されている。今回陽性コントロール値でみた場合、リンパ球数が1000以上あってもコントロール値がかなり低い例が存在した。従って、IGRAsの反応性に関してはリンパ球数のみなら

ず、原疾患や治療薬による影響が生じる可能性を考慮する必要がある。

## ま と め

(1) 臨床的には結核を疑っていないHIV感染者等の免疫脆弱宿主（結核発病ハイリスク者）にQFT検査を行うことで、潜在性結核感染症（LTBI）をスクリーニングできる可能性が示唆された。

(2) 健常者におけるQFT-3Gの陽性率1.3%（添付文書）と比較して、免疫脆弱宿主における陽性率は高い傾向を示した。検討症例数が少ない解析結果ではあるが、結核発病リスクが高い集団なので、LTBIを発見するため症例背景を考慮しつつQFT-3G検査を行うことは意義があると思われた。

## 謝 辞

本発表にご協力いただいた下記の方々（敬称略）に感謝いたします。

（公財）結核予防会結核研究所 原田登之、樋口一恵、森 亨。がん感染症センター都立駒込病院感染症科 味澤 篤。都立多摩総合医療センター内科 西尾康英、同呼吸器科 畠山修司（東大病院感染症科）、同検査科 佐藤修子、同リウマチ膠原病科 杉井章二。

## 文 献

- 1) 伊藤明広, 多田公英, 大寺 博: 免疫抑制宿主における活動性結核補助診断としてのQuantIFERON®TB-2Gの有用性に関する検討. 結核. 2011; 86: 45-50.
- 2) Kobashi Y, Mouri K, Obase Y, et al.: Clinical evaluation of QuantiFERON TB-2G test for immunocompromised patients. Eur Respir J. 2007; 30: 945-950.
- 3) Komiya K, Ariga H, Nagai H, et al.: Impact of peripheral lymphocyte count on the sensitivity of 2 IFN- $\gamma$  release assays, QFT-G and ELISPOT, in patients with pulmonary tuberculosis. Inter Med. 2010; 49: 1849-1855.
- 4) Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, et al.: Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents: Recommendations from CDC, NIH, HIV Medicine Association of IDSA; 2009. 58/No. RR-4.
- 5) Fujita A, Ajisawa A, Harada N, et al.: Performance of a whole-blood interferon-gamma release assay with Mycobacterium RD1-specific antigens among HIV-infected persons. Clinical and Developmental Immunology. 2011; pii 325295, 1-6.
- 6) 加藤誠也: 日本におけるHIV合併結核に関する調査. 厚生労働科学新興・再興感染症研究費事業「結核菌に関する研究」平成20年度総括・分担研究報告書. 2009, 191-201.
- 7) 永井英明, 川辺芳子, 有賀晴之, 他: HIV感染症におけ

- る結核感染診断に対してのQuantiFERON®-TB第2世代の有用性についての検討. 結核. 2007 ; 82 : 635-640.
- 8) Harada N, Higuchi K, Yoshiyama T, et al.: Comparison of two whole blood interferon- $\gamma$  assays in tuberculosis patients and healthy controls. J Infection. 2008 ; 56 : 348-353.
- 9) Inoue T, Nakamura T, Katsuma A, et al.: The value of QuantiFERON TB-Gold in the diagnosis of tuberculosis among

dialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2009 ; 24 : 2252-2257.

- 10) 坂野章吾: クオンティフェロンTB-2Gの関節リウマチにおける潜在性結核診断の有効性と限界. 第84回総会ミニシンポジウム「免疫抑制療法と結核」. 結核. 2010 ; 85 : 40-42.

### 3. 小児を対象とした精度の高い結核感染診断に向けて

#### — 2種のIGRAおよびIP-10測定と比較検討 —

国立病院機構南京都病院小児科 徳永 修, 宮野前 健  
結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部 樋口 一恵, 原田 登之

#### 1. はじめに

小児, 特に乳幼児では感染後発症に至る頻度が成人に比して高く, 感染源となりうる結核患者との接触が判明した後に精度の高い感染診断を行い, その判断結果に従った適切な事後処置を行うことが特に重要である。近年, 結核感染診断に導入された QuantiFERON®TB (以下, QFT) に関してはツ反に代わる鋭敏な感染診断法として大きな期待が寄せられてきたが, 特に小児を対象としてはその有用性ととも限界も明らかとなってきた<sup>1)</sup>。われわれは小児を対象により精度の高い結核感染診断法を導入することを目的に, 欧米において既に汎用されているもう一つのIGRA, T-SPOT®.TB (以下, T-SPOT) や IFN- $\gamma$  以外の biomarker を指標とした感染診断法の有用性についても検討を行ってきた。今回のシンポジウムではこれまでに明らかとなった小児を対象としたQFT-2Gの有用性と限界を整理し, さらに, T-SPOT®.TBやIP-10を指標とした感染診断の検討結果について紹介した。

#### 2. 小児を対象とした結核感染診断におけるQFT-2Gの有用性と限界

われわれは2005年以降「小児QFT研究会」において, 小児を対象としたQFT-2Gの反応性に関する検討を行い, 以下のとおりその有用性と限界が明らかとなった<sup>1)</sup>。

①0歳児ではMitogen (PHA) 刺激に対するIFN- $\gamma$ 産生応答が弱いためQFT-2Gが「判定不可」を呈する例が40%近くに達する。

②小児においても結核発症例を対象とした検査感度は良好であり, 年齢や病型にかかわらず約90%の例が陽性を呈する。菌陰性例の多い小児活動性結核の補助的診断法として非常に有用である。

③父母などの同居家族が塗抹陽性肺結核を発症し, 感染リスクが高いと評価された小児接触者健診例を対象に

年齢群ごとのQFT-2G陽性頻度を比較したところ, 3歳以上の年齢群では過去の疫学データより推定される結核感染率 (30~50%) と同等の陽性頻度を認めたのに対し, 0~2歳児群では発症例を除いて陽性を呈した例はきわめて少なかった。このことより乳幼児を対象とした潜在性結核感染例 (LTBI) 診断においてはQFT-2Gが満足できる検査感度を有していないことが示唆された。

#### 3. 小児を対象とした結核感染診断におけるQFT-2GおよびT-SPOT®.TB反応性の比較検討

2007年10月~2010年6月の間に結核感染が疑われたために国立病院機構南京都病院小児科でQFT-2Gを適用した例のうち, 本人あるいは保護者の同意が得られた例でT-SPOTも同時に実施し, 2種のIGRA判定結果を比較検討した。検討対象となった例は121例 (225検体) で, その内訳は結核発症例8例 (26検体), 家族健診例60例 (119検体), 非濃厚接触例37例 (63検体), コッホ現象疑い例4例 (5検体), 結核除外目的例12例 (12検体) であった。

その結果,

①QFT-2Gでは0歳で約35%, 1歳でも約10%の例が判定不可を呈したのに対し, T-SPOTは年齢群によって判定不可例頻度の有意な差異を認めなかった (Fig. 1)。

②結核発症と診断された8例では2種のIGRA判定結果が一致した (8例のうち, 7例が共に陽性, 1例は共に陰性)。

③同居家族内に喀痰塗抹陽性肺結核患者が発生した接触者健診例 (34例) を対象として, QFT-2Gでは0歳, 1~2歳に陽性例を認めなかったのに対し, T-SPOTではこの年齢群を含め, 各年齢群で20%以上の頻度で陽性例を認めた (Fig. 2)。T-SPOTのみが陽性を呈した例における結核菌特異抗原刺激発色スポット数は結核発症例やQFT-2G, T-SPOTが共に陽性を呈した例でのスポット

数に比して有意に少ない数であった (Fig. 3)。また、T-SPOTのみが陽性を呈した例の中には経時的に複数回の検査を行ったところ、陰性→陽性へ、あるいは陽性→陰性へと判定が揺らぐ例も多く含まれた。

などが明らかとなった。

これらより、T-SPOTが0歳児を含む低年齢小児においても良好な感度で結核感染を検出している可能性が期待される。一方で、T-SPOTのみが陽性を呈した例から発症に至った例は確認されておらず、逆に特異度が劣っている可能性も否定できない。

2種の感染診断結果が異なった例を対象にその後の発症の有無を慎重に追跡するとともに、感染リスクの乏しい小児を対象としたT-SPOTの特異度検討も必要と考える。

#### 4. 小児を対象とした結核感染診断におけるQFT抗原刺激上清中IP-10定量測定に関する検討；QFT-3GおよびT-SPOT反応性との比較検討

IP-10 (IFN- $\gamma$ -inducible protein-10 kDa；別名CXCL10)はCXC chemokine familyに属する向炎症性ケモカインで、リンパ球や単球に発現し炎症局所に単球や活性化されたTh1リンパ球を走化誘導する働きをもつ。種々の疾患に関連してその病巣局所や血中で多く発現することが知られているが、結核感染においてもその病勢に応じて血中濃度が増減することが報告されている<sup>2)</sup>。2007年以降、被検者全血を結核菌特異抗原刺激で刺激することにより血中に放出されるIP-10を指標とすることでIGRAと同様に、あるいは、より鋭敏に結核感染の有無を判断

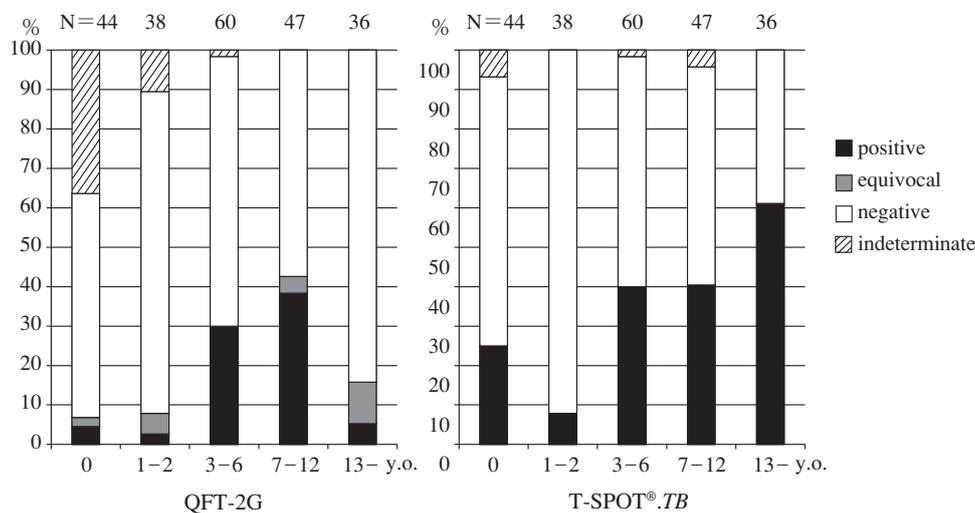


Fig. 1 Comparison of results distribution on in QFT-2G and T-SPOT.TB assays among 225 samples from 121 children with suspicion of tuberculosis infection

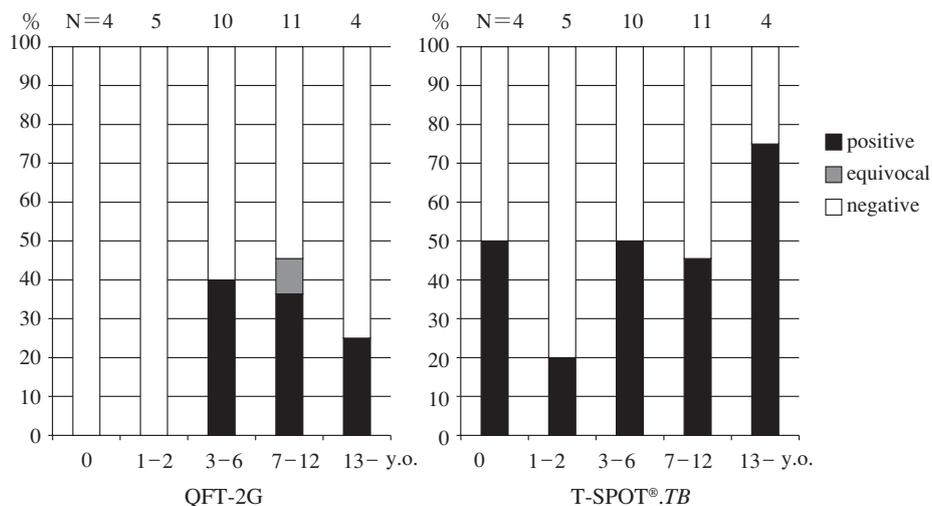


Fig. 2 Comparison of results distribution in QFT-2G and T-SPOT.TB assays among 34 children who had household contact with contagious tuberculosis patients

することができる, とした報告<sup>3)~5)</sup>も相次いでおり, 小児を対象とした有用性も期待されている<sup>6)7)</sup>。

われわれは2010年3月~2011年2月の間に結核感染が疑われ国立病院機構南京都病院小児科を受診した例のうち, 本人あるいは保護者の同意が得られた例を対象にQFT-3G, T-SPOTに加え, QFT-3G結核菌特異抗原刺激・培養後上清中のIP-10をELISA法により定量測定し, 2種のIGRAおよびIP-10に基づいた感染診断結果について比較検討を行った。検討対象となった例は47例(71検体)で, その内訳は結核発症例4例(8検体), 家族健診例23例(35検体), 非濃厚接触例13例(20検体), コホ現象疑い例3例(4検体), 結核除外目的例4例(4検体)であった。なお, IP-10については特異抗原刺激により放出された量から陰性コントロールのIP-10を減じた値を診断の指標とし, 過去の報告例<sup>4)</sup>に倣って455 ng/mlをcut-off値に設定して感染の有無を判定した。

その結果,

- ①陽性コントロール(PHA)刺激に伴うIP-10放出量に

- 年齢群間で有意な差は認めなかった。
- ②結核発症例における判定結果は3種の診断方法で相違する例はなかった。
- ③接触者健診例(家族健診例および非濃厚接触例)でQFT-3Gが陽性を呈した例はIP-10およびT-SPOTも共に陽性を呈した。一方でIP-10のみ, あるいはT-SPOTのみが単独で陽性を呈した例も散見された。
- ④BCG接種後早期の局所所見推移やツ反結果よりコホ現象の可能性が強く疑われた3例でQFT-3GおよびT-SPOTが陰性または判定保留を示したのに対し, IP-10は全例で「陽性」を呈した(Table)。

などが明らかとなった。

これらの結果より, 結核菌特異抗原刺激によって放出されるIP-10の多寡を指標とした感染判断は乳幼児を含む小児において, QFT-3GやT-SPOTと同等の, あるいはこれらに優る良好な検査感度を有していることが期待された。一方で, T-SPOTと同様に特異度が劣っている可能性も否定できず, 単独陽性例からの発症の有無に関する追跡や感染リスクが乏しい小児を対象とした特異度の検討も必要である。

5. まとめ

結核感染の可能性が疑われ, 当科で診療を行った小児例を対象にQFT, T-SPOT, QFT検体上清中のIP-10定量検査を適用し, それぞれの反応態度を比較した。その結果, 発症例では3種の診断法で判定結果の相違を認めなかったが, 感染リスクの高い健診例やコホ現象例では異なる反応態度を示し, IP-10あるいはT-SPOTがQFTよりも鋭敏に結核感染を検出している可能性が期待された。一方で, これら2種の感染診断法の特異度が劣っている可能性も否定できず, これらの単独陽性例からの発症の有無に関する追跡とともに, 感染リスクが乏しいコントロール群を対象とした反応態度の検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) 徳永 修, 宮野前健: 小児へのQFT等の適用とその課

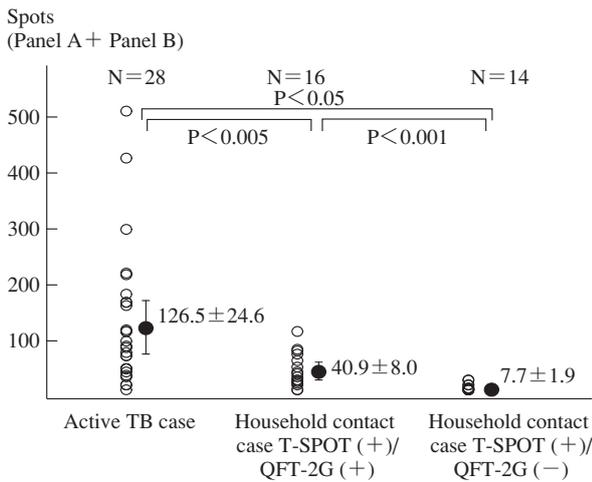


Fig. 3 Spot numbers with *M. tuberculosis* specific antigen stimulation ( ; Spots numbers of Panel A + B) in T-SPOT®. TB assay of 3 patient categories; active TB cases, household contact cases with T-SPOT (+)/QFT-2G (+), and household contact cases with T-SPOT (+)/QFT-2G (-)

Table 3 infants with Koch's phenomenon after direct BCG vaccination, who were tested QFT-3G, T-SPOT®.TB and IP-10 release assays simultaneously

Age	TST	Timing of testing	QFT-3G		T-SPOT®.TB			IP-10	
			TB Ag-nil	Judge	Panel A-nil	Panel B-nil	Judge	TB Ag-nil	Judge
6 m	Negative		0.03	Negative	3	0	Negative	2307.98	Positive
4 m	Induration 4 mm Erythema 10 mm		0.10	Equivalent	0	0	Negative	1149.04	Positive
		+ 2 m	0.00	Negative	0	0	Negative	398.52	Negative
5 m	Induration 9 mm Erythema 13 mm		0.01	Negative	0	0	Negative	9782.54	Positive

- 題. 第84回総会シンポジウム「新しい結核感染診断法の課題と展望」. 結核. 2010; 85: 21-23.
- 2) Azzurri A, Sow YS, Amedei A, et al.: IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes and Infection*. 2005; 7: 1-8.
  - 3) Ruhwald M, Bjerregaard-Andersen M, Rabna P, et al.: CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7. *Microbes and Infection*. 2007; 9: 806-812.
  - 4) Ruhwald M, Bodmer T, Maler C, et al.: Evaluating the

potential of IP-10 and MCP-2 as biomarkers for the diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J*. 2008; 32: 1607-1615.

- 5) Ruhwald M, Dominguez J, Latorre I, et al.: A multicentre evaluation of the accuracy and performance of IP-10 for the diagnosis of infection with *M. tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2011; 91: 260-267.
- 6) Whittaker E, Gordon A, Kampmann B.: Is IP-10 a better biomarker for active and latent tuberculosis in children than IFN $\gamma$ ? *PLoS ONE*. 2008; 3: e3901.
- 7) Lighter M, Rigaud M, Huie C-H, et al.: Chemokine IP-10: an adjunct marker for latent tuberculosis in children. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009; 13: 731-736.

#### 4. 局所検体を用いてT-SPOT.TBによる結核感染診断の臨床評価

川崎医科大学呼吸器内科 小橋 吉博, 岡 三喜男

##### はじめに

Interferon-gamma release assay (IGRA) には, 全血を用いてT細胞によって産生されたIFN- $\gamma$ をELISA法で測定するクオンティフェロン (QFT) と, 分離した単核球の中からIFN- $\gamma$ 反応T細胞数をELISPOT法で抽出するT-SPOT.TBの2つの方法がある。このうちより感度に優れているとされているT-SPOT.TB法は単核球を分離後, 細胞数を調整してからIFN- $\gamma$ 反応T細胞を測定することから, QFTに比して操作は煩雑であるが, 末梢血以外の臨床検体からの結核感染診断にも応用することができる。

このT-SPOT.TBを用いて, 2006年にJafariらが気管支肺胞洗浄液 (BALF) を用いて塗抹陰性の肺結核の早期診断の有用性を報告した<sup>1)</sup>。次いで, 2007年にはLosiら<sup>2)</sup>が胸水を用いて結核性胸膜炎の診断に, その後, 髄液<sup>3)</sup>, 心嚢液<sup>4)</sup>, 腹水<sup>5)</sup>を用いてそれぞれの活動性結核の早期診断の有用性を報告した。

私どもも2007年以降, T-SPOT.TBを導入し, 臨床的に結核疑いの患者に末梢血のみでなく胸水やBALFを用いて, 結核感染診断の補助的診断法として有用化を検討しており, その成績および問題点を報告する。

##### 対象と方法

###### (1) 結核性胸膜炎

2007年以降, 当施設および関連施設においてリンパ球優位の滲出性胸水貯留を認めた45例とした。これらの症例に末梢血と胸水でT-SPOT.TBを測定し, 結核性胸膜炎確診例 (結核菌培養陽性もしくはPCR陽性) と疑診例 (結核菌培養陰性だが抗結核薬による治療奏功例), その他の疾患例に分けて成績を比較検討した。方法は,

胸水を100~200 ml採取後, Losiらが述べた方法<sup>2)</sup>に準じて $2.5 \times 10^5$  cellsに調整した単核球を結核菌特異蛋白抗原で刺激後に得られたIFN- $\gamma$ 産生T細胞数をELISPOT法で測定した。

###### (2) 肺結核

2008年以降に当施設および関連施設において肺結核を疑い, 気管支鏡検査を施行し, 気管支肺胞洗浄液 (BALF) を回収できた症例79例とし, これらの症例を肺結核確診例 (結核菌培養陽性もしくはPCR陽性) と疑診例 (結核菌培養陰性だが抗結核薬による治療奏功例), 肺非結核性抗酸菌症例 (2008年に日本結核病学会が提唱した診断基準<sup>6)</sup>を満たした症例), 陳旧性肺結核症例, その他の症例に分類して成績を比較検討した。方法は, BALFを30~100 ml採取後, Jafariら<sup>1)</sup>が述べた方法に準じて胸水と同様にELISPOT法で測定した。

なお, 判定基準に関してはこれまで胸水やBALFを用いてのガイドラインがないことから, 末梢血によるLalvaniらの報告<sup>7)</sup>に準じて行った。

##### 結 果

###### (1) 結核性胸膜炎

確診例は10例, 疑診例は8例, 他疾患例は27例であった。他疾患であった症例の最終診断は癌性胸膜炎19例, 石綿関連胸膜病変5例, 膠原病に伴う胸膜炎2例, 悪性リンパ腫1例であった。3群間での臨床所見の比較では, 他疾患群で肺癌症例が多かったため, 呼吸器系の基礎疾患を有する比率が有意に高かった以外には背景因子, 検査所見において有意差はなかった。胸水所見では, 総細胞数やリンパ球数においては有意差はみられなかったが, 胸水中ADAは45 IU/lをカットオフ値とした

場合、確診例では陽性率が8/10 (80%)、疑診例では6/8 (75%) に対して、他疾患例では2/27 (7%) と有意に低率であった。

末梢血を用いてのQuantiFERON TB-2G (QFT-2G) の結果はCDCのガイドライン<sup>8)</sup>に従って判定したところ、確診例では陽性が8/10 (80%) に対して、陰性1/10 (10%)、判定不可1/10 (10%) であった。一方、疑診例では陽性が7/8 (88%) に対して、陰性が1/8 (12%)、他疾患例では陽性が3/27 (11%)、陰性が23/27 (85%)、判定

不可が1/27 (4%) であった。

次に、末梢血でのT-SPOT.TBでは、確診例が陽性9/10 (90%)、陰性1/10 (10%)、疑診例は陽性7/8 (88%)、陰性1/8 (12%)、他疾患例は陽性5/27 (19%)、陰性21/27 (77%)、判定不可1/27 (4%) であった (Fig. 1)。胸水を用いてのT-SPOT.TBでは、確診例では10/10 (100%) が陽性、疑診例でも陽性が7/8 (88%)、陰性が1/8 (12%)、他疾患例では陽性が4/27 (15%)、陰性が23/27 (85%) と有意差をもって確診例と疑診例での合わせた陽性

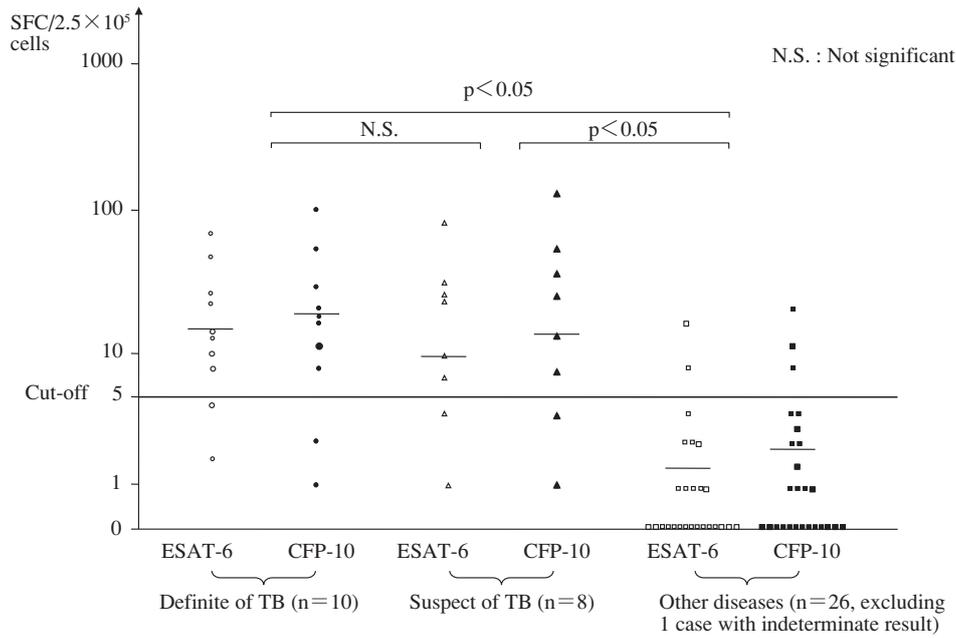


Fig. 1 The results of T-SPOT.TB (PBMC)

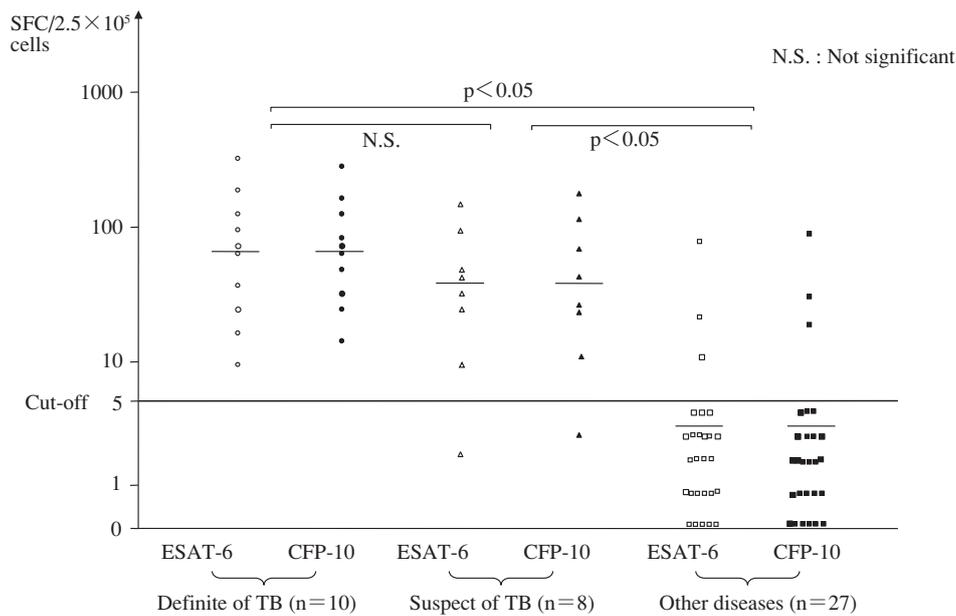


Fig. 2 The results of T-SPOT.TB (PEMC)

率が最も優れていた (Fig. 2)。末梢血と胸水の両群が他疾患例に比して有意に高値をとっていたが、末梢血と胸水の検体の違いでは、胸水のほうが有意に高値を呈していた。

(2) 肺結核

確診例は17例、疑診例は6例、肺非結核性抗酸菌症 (すべて原因菌は *Mycobacterium avium* と *Mycobacterium intracellulare* (MAC)) は30例、その他は26例 (薬剤性肺炎9例、特発性器質性肺炎5例、膠原病肺4例、サルコイドーシス4例、過敏性肺炎4例) であった。なお、これらの症例の中に陳旧性肺結核の症例は9例含まれていた。肺結核例23例 (確定診断例+疑診例)、肺MAC例30例、その他の疾患例26例の3群間の臨床所見の比較では、平均年齢で肺結核例の63.5歳がその他の疾患例の51.3歳に比して有意に高齢で、性別は肺結核例が17:6で男性が多かったのに比して、肺MAC症例が10:20と女性が多かった。検査所見では末梢血および気管支肺胞洗浄液において3群間で有意な差はみられなかった。

末梢血でのQFT-2Gの結果では、肺結核例が陽性19/23 (82%)、陰性2/23 (9%)、判定不可2/23 (9%)、肺MAC症例が陽性3/30 (10%)、陰性25/30 (83%)、判定不可2/30 (7%)、その他の疾患例が陽性3/26 (12%)、陰性21/26 (80%)、判定不可2/26 (8%) であった。また、陳旧性肺結核9例では陽性が3例 (33%) に対して、陰性は6例 (67%) であった。

次に、末梢血でのT-SPOT.TBの結果では、肺結核例が陽性21/23 (91%)、陰性2/23 (9%)、肺MAC症例は陽性5/30 (17%)、陰性25/30 (83%)、その他の疾患例では

陽性5/26 (19%)、陰性20/26 (77%)、判定不可1/26 (4%) であった。また、陳旧性肺結核9例では陽性が4例 (44%) に対して、陰性は5例 (56%) であった。BALFを用いてT-SPOT.TBを施行した結果、肺結核例が陽性22/23 (96%)、陰性1/23 (4%)、肺MAC症例が陽性4/30 (13%)、陰性26/30 (87%)、その他の疾患例が陽性4/26 (15%)、陰性22/26 (85%) であった。また、陳旧性肺結核9例では陽性が2例 (22%) に対して、陰性は7例 (78%) であった。BALFを用いたT-SPOT.TBでは、判定不可がすべての群で1例もみられなかった。末梢血とBALFを用いてT-SPOT.TBで判定可能であった症例の測定値をそれぞれFig. 3とFig. 4に示した。IFN- $\gamma$ 陽性細胞数はいずれの臨床検体においても肺結核例が肺MAC症例、その他の疾患例、陳旧性肺結核例に比して有意に高値をとっていた。末梢血とBALFとの検体の違いでは、BALFのほうが有意に高値を呈していた。

考 察

過去の報告<sup>9)</sup>でも結核感染の炎症局所から採取された検体においては活動性が高いといわれていた。しかし、これを利用した有用な結核感染診断法はこれまで登場しなかった。

私どもは2007年以降、胸水やBALFを用いてT-SPOT.TBにより結核性胸膜炎や肺結核の補助的診断法として有用性を評価してきた。結核性胸膜炎に対しては、陽性率が末梢血では確診例が90%、疑診例で88%、その他の疾患例で19%であったのに対して、胸水では確診例で100%、疑診例で88%、その他の疾患例で15%と有意差ま

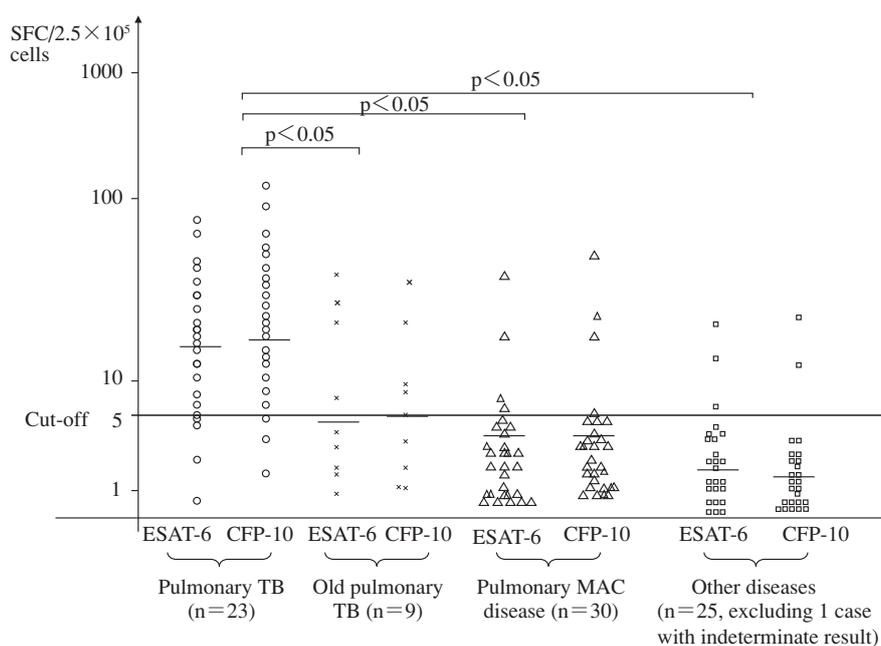


Fig. 3 The results of T-SPOT.TB (PBMC)

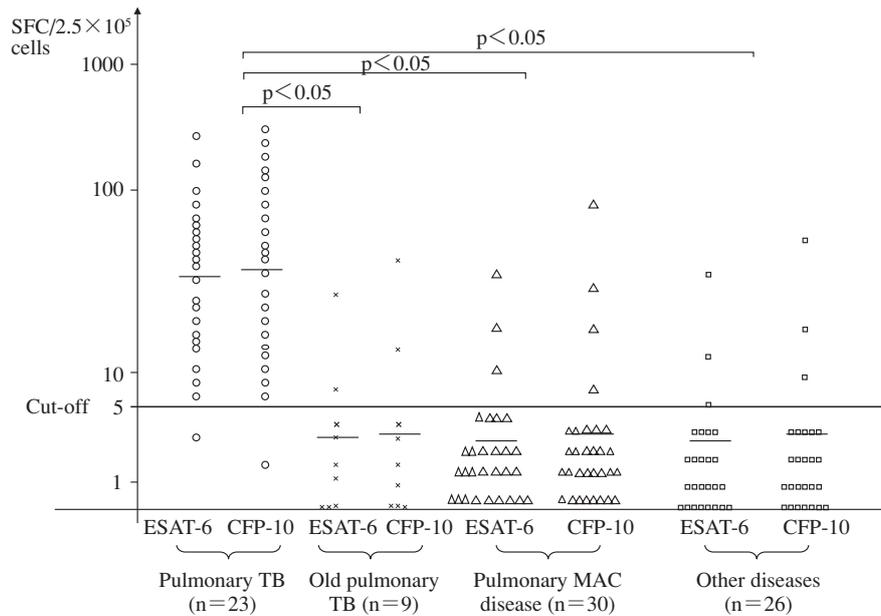


Fig. 4 The results of T-SPOT.TB (BALF)

ではなかったもののわずかに良好な成績が得られており、胸水中ADAの成績に比しても良好な成績であった。臨床の実際の場合、原因不明のリンパ球優位の胸水貯留の症例に遭遇した場合に結核菌が胸水の培養検査から検出される確率は10%以下が現状である。今回の結果から、胸水中ADAのみでなく、胸水を用いたT-SPOT.TBも診断技術に熟練が必要な面もあるが並行して行う価値はあると推定される。Arigaら<sup>10)</sup>も有意差はなかったものの胸水中ADA以上に胸水中IFN- $\gamma$ 、特に2種類の結核菌特異蛋白抗原で刺激後のIFN- $\gamma$ が最も高値をとっていたと報告していることから、胸水中の単核球を用いた結核感染診断の有用性は高いことが裏づけられる。

肺結核の診断、特に塗抹陰性の肺結核の診断に対しては確定診断が得られるまでに長期間を要することから、迅速に診断しうる検査法が必要である。肺結核に対しては、T-SPOT.TBで陽性率が末梢血では確診例で91%と肺MAC症例(17%)、その他の疾患例(19%)に比して有意に高率で陳旧性肺結核症例に対しても症例数は少ないが44%と比較すると有意に高率であった。BALFを用いると確診例が96%と肺MAC症例(13%)、その他の疾患例(15%)に比してより有意に差がみられており、症例数は少ないが陳旧性肺結核症例も22%と末梢血以上に鑑別するうえでも良好な成績が得られていた。Jafariら<sup>11)</sup>も活動性肺結核群71例とその他の疾患群275例を用いて、末梢血によるT-SPOT.TBでは感度92%、特異度48%に対して、BALFによるT-SPOT.TBでは感度91%、特異度79%と特に特異度に優れており、今回の検討と同様な結果であった。

しかし、胸水やBALFを用いたT-SPOT.TBもいくつかの問題点はある。1つは、臨床検体の採取量である。胸水は50~100 ml採取するのは容易であり、細胞成分のリンパ球の占める比率も50%以上を大半の症例が占めているため、T-SPOT.TBに必要な $2.5 \times 10^5$ の単核球を採取可能であるが、BALFでは50 ml以上の検体量を採取するのが困難な場合があり、1 mlあたりで得られる単核球数も少ないため $2.5 \times 10^5$ の単核球数を用意するのが困難な症例もあり、今回の検討期間中でも約半数の肺結核疑いの症例が検体量不足から施行しえなかった。Jafariら<sup>11)</sup>はBALFを診断のために100~200 ml以上採取して検討したと報告しているが、本邦では現実的に倫理上、多くの検体量を採取することは困難と思われる。2つめは、今回の検討では末梢血以外の臨床検体での陽性の判定基準が過去にないため、末梢血のガイドラインをそのまま引用して行ったが、炎症局所からの検体のほうが高値をとりやすい傾向が見られたため、末梢血以外の臨床検体に関しては、今後、症例数を増やして判定基準を新たに見直していく必要があると思われる。3つめは今回の検討が単一施設でのデータのため症例数が少なかったことから、今後さらに症例数を増やして多施設での検討も考慮していく必要があると思われる。

以上、胸水やBALFといった炎症局所から採取した臨床検体を用いて結核感染診断に有用性があるかどうかを評価したが、一定の検体量が確保できれば活動性と陳旧性結核の鑑別も可能になるとと思われる。しかし、現時点では末梢血以外の臨床検体を用いた判定基準がなく、今後、多くの症例に対するデータを集めて適切な評価を進

めていく必要があると思われた。

## 文 献

- 1) Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B, et al.: Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174: 1048–1054.
- 2) Losi M, Bossink A, Codecasa L, et al.: Use of a T-cell interferon-gamma release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Eur Respir J.* 2007; 30: 1173–1179.
- 3) Kim SH, Chu K, Choi SJ, et al.: Diagnosis of central nervous system tuberculosis by T-cell-based assays on peripheral blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells. *Clin Vaccine Immuno.* 2008; 15: 1356–1362.
- 4) Bathoom E, Limburg A, Bouwman JJ, et al.: Diagnostic potential of an enzyme-linked immunospot assay in tuberculous pericarditis. *Clin Vaccine Immuno.* 2011; 18: 874–877.
- 5) Liao CH, Chou CH, Lai CC, et al.: Diagnostic performance of an enzyme-linked immunospot assay for interferon- $\gamma$  in extrapulmonary tuberculosis varies between different sites of disease. *J Infect.* 2009; 59: 402–408.
- 6) 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会：肺非結核性抗酸菌症診断に関する指針—2008年. *結核.* 2008; 83: 525–526.
- 7) Lalvani A, Pathan AA, Mcshane H, et al.: Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 824–828.
- 8) Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al.: Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep.* 2005; 54 (RR-15): 49–55.
- 9) Barnes PF, Lu S, Ahrams JS, et al.: Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immunol.* 1993; 61: 3482–3489.
- 10) Ariga H, Kawabe Y, Nagai H, et al.: Diagnosis of active tuberculous serositis by antigen-specific interferon- $\gamma$  response of cavity fluid cells.
- 11) Jafari C, Thijsen S, Sotgiu G, et al.: Bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for a rapid diagnosis of tuberculosis: a Tuberculosis Network European Trails group study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180: 666–673.

## 5. 日本人の genetic background と IGRA

国立感染症研究所ハンセン病研究センター 星野 仁彦  
 国立病院機構東京病院呼吸器疾患センター内科 有賀 晴之

### はじめに

IGRA (Interferon-Gamma Release Assays) は近年ツベルクリン反応 (ツ反) に取って代わった結核感染診断法であり、ツ反とは異なり BCG 接種や多くの非結核性抗酸菌感染症と独立して結核菌感染を診断できる検査法である<sup>1)~3)</sup>。IGRA には大きく分けて、患者全血を結核菌群特異的抗原で刺激し産生される Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) を ELISA 法で定量する QuantiFERON (QFT) 法と、患者末梢血単核球を結核菌群特異的抗原で刺激し産生される IFN- $\gamma$  を ELISPOT 法で定量する T-SPOT.TB (T-SPOT) 法の 2 種類がある<sup>4)</sup>。現在のところ本邦で承認されているのは QFT 法のみである。現在 QFT 法は QFT-3G というプラットフォームが使われている。これは結核菌特異的抗原の ESAT-6, CFP-10, TB 7.7 が 1 本の採血管の中にあらかじめ添加されており、採血された患者全血と十分混和され培養容器に移される<sup>5)</sup>。一方 2010 年 7 月まで使用されていた QFT-2G というプラットフォームにおいては、採血した血液を培養プレートに移し結核特異的抗原を添加し培養する必要があった。しかし QFT-2G では ESAT-6

と CFP-10 を別々のウェルで培養していたので、個々の患者の ESAT-6 と CFP-10 に対する IFN- $\gamma$  放出反応を別々に解析できる利点があった。本稿は QFT-2G を使用していた時期に蓄積されたデータを基にして、日本人の遺伝学的背景が IGRA に影響を及ぼしている事実を報告する。

### Genetic background と IFN- $\gamma$ 反応性

2010 年 6 月に出版された MMWR においても IGRA における遺伝的要因の影響をどのように位置づけるかが今後の課題であると記されている<sup>6)</sup>。上述したとおり QFT-2G では ESAT-6 と CFP-10 に対する IFN- $\gamma$  放出反応が別々に観察できる。われわれは約 730 名の活動期結核感染症患者に対して QFT-2G を施行してきたが、QFT-2G 陽性患者の中には ESAT-6 単独陽性、CFP-10 単独陽性、ESAT-6 陽性かつ CFP-10 陽性の患者が混在していた。そこでわれわれは、IGRA の反応性は宿主の遺伝的背景 (genetic background) に依存しており、cut-off 値を定める際にはその反応性が影響を与えるのではないだろうか? という仮説を立て、上記を実証することとした。

結核菌に対する細胞性免疫

結核菌に対する細胞性免疫は、大きく分けてCD4リンパ球によるものとCD8リンパ球によるものの2種類がある<sup>7)</sup>。どちらのリンパ球も抗菌活性を発揮するためには、結核菌を貪食した抗原提示細胞からTリンパ球にシグナルを提示されること、つまり抗原提示細胞表面の主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex, MHC) と T cell receptor とのコンタクトが必須である。抗原提示細胞表面のMHC分子は、T細胞に細菌やウイルス抗原を提示する。ヘルパー CD4細胞は、主に、MHCクラスII分子に結合した細胞外抗原 (細菌やウイルス由来の蛋白など) に反応し、キラー CD8細胞は、主に、MHCクラスI分子に結合した細胞内抗原 (腫瘍特異抗原など) に反応する。そしてヒト白血球型抗原 (Human Leukocyte Antigen; HLA, 最も重要なヒトMHCの一つ) の型によってMHC分子構造が遺伝的に異なる。そのため同じ抗原ペプチドであってもMHC分子の溝への結合のしやすさは、HLAの型によって異なる。従ってHLAの型によって抗原 (抗原ペプチド) に対する免疫応答の強度が異なる可能性がある。

日本人のHLAと結核菌抗原特異的クラスIIエピトープの同定

日本人のHLAクラスIIは比較的均一であり、われわれが結核菌活動期患者・既感染者168名でクラスII DRB1を調べたところ、0405, 0901, 0803, 1502, 1501, 0406の順で頻度が高く、この6アレルで全体の約60%を占めていた。そこで結核菌抗原特異的クラスIIエピトープを同定するために、CFP-10とESAT-6全体を網羅するオーバーラップペプチドを作製し結核菌抗原に対するT細胞エピトープの同定を試みた。使用した方法は以下のとおりである。特定のHLA DRB1をもったヒトよりPBMCを分離し、各ペプチドを10 $\mu$ Mの濃度で一昼夜培養する。培養中に上清に放出されたIFN- $\gamma$ をELISPOTアッセイによって検出するというものである (Fig. 1)。またELISPOTアッセイの代わりにflow cytometryを使用して細胞内に蓄積されたIFN- $\gamma$ を検出した。両者のアッセイを併用して陽性となるウェルに添加されたペプチドに特異的クラスIIエピトープが含まれると想定した。陽性ペプチド内に存在するクラスIIエピトープを類推するために、スペインUniversidad Complutense de MadridのDr. Pedro A Recheと国際共同研究を行い、中心となるエピトープを決定した。

クラスIIが異なるとELISPOT陽性を示すウェルは異なり、ELISPOTアッセイによりQFT-2Gの結果が再現される

Fig. 2Aに示したのはDRB1\*0405 homozygote患者のELISPOT結果である。QFTではESAT-6のみ陽性となったが、ELISPOTの結果もそれを支持する結果 (ESAT-6由来のペプチドを加えたウェルからのみスポットが陽性) となった。同様の結論がflow cytometryを使用しても導かれた。Fig. 2BはDRB1\*0803 homozygote患者の結果である。QFTの結果をELISPOTの結果が再現している。では、DRB1\*0405/0803 heterozygote患者ではどのようなのであろうか。予想されるようにELISPOTではESAT-6由来の2つのウェルが陽性となった (Fig. 2C)。またQFT値もhomozygote患者と比べて高値であった。本稿では示さないが、DRB1\*0406 homozygote患者のELISPOTアッセイではCFP-10由来のウェルのみが陽性となり、これはQFT-2GでCFP-10のみで陽性となった結果を再現している。またDRB1\*0405/0406 heterozygote

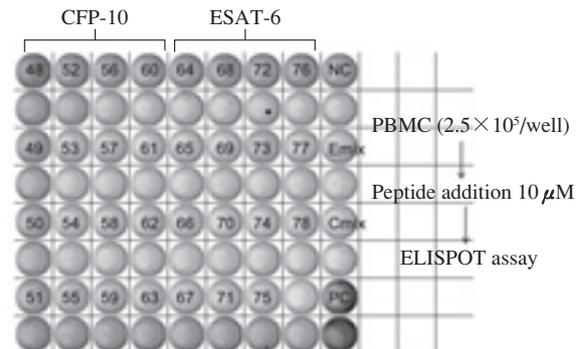


Fig. 1 Alignment of ELISPOT assay with overlap peptides from CFP-10 or ESAT-6

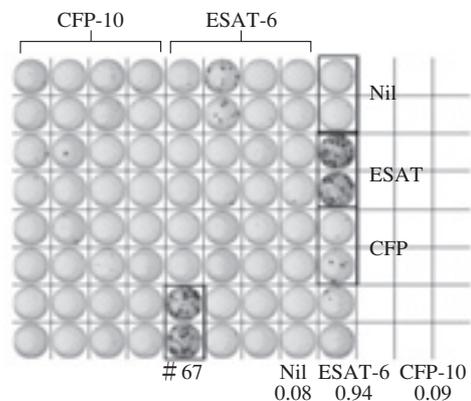


Fig. 2A The result of ELISPOT assay and QFT-2G assay from HLA DRB1\*0405 homozygote patient

患者ではCFP-10とESAT-6両方でELISPOTが陽性となり、これもQFT-2Gの結果を再現していた。

これらの解析を113名の結核感染者に行った結果をFig. 3に示した。これはESAT-6で刺激し得られたQFTの結果と同じ患者のESAT-6由来のペプチドで刺激し得られたELISPOTの結果をグラフにしたものである。両者の間には有意な相関が存在した。heterozygote患者とhomozygote患者のELISPOT数を比較すると、heterozygote患者のほうが高値であった (Fig. 4)。このことは患者の遺伝子的背景 (この場合はHLA DRB1の相違) によって、結核特異的抗原に対する epitope の数が異なること、つまり結核特異的抗原に対する免疫反応が異なり、QFTアッセイあるいはELISPOTアッセイの結果が異なることを示唆している。

ま と め

HLAの型によって、同一抗原であっても抗原決定基 epitope の場所と数が異なり、homozygote患者とheterozygote患者では一般的にheterozygote患者のほうがepitope

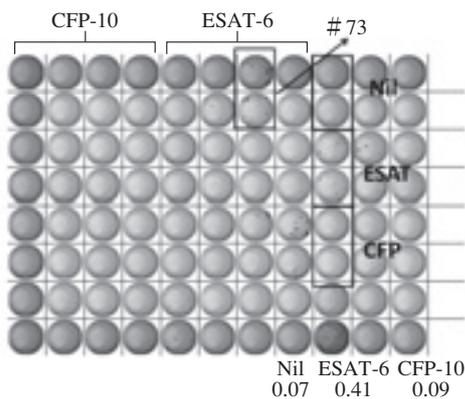


Fig. 2B The result of ELISPOT assay and QFT-2G assay from HLA DRB1\*0803 homozygote patient

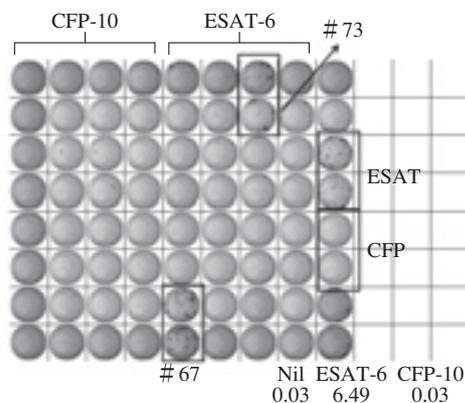


Fig. 2C The result of ELISPOT assay and QFT-2G assay from HLA DRB1\*0405/0803 heterozygote patient

数が増える。よってHLAの型によって、結核菌特異的抗原ESAT-6やCFP-10に対する免疫応答の強度が異なる可能性がある。宿主のgenetic background (HLA型)もIFN- $\gamma$ 応答値に影響する。

謝 辞

実験の補助をしていただいた国立病院機構東京病院臨床研究部の井上康子さん、渡邊亜矢子さんに深謝いたします。

文 献

- 1) Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al.: Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet. 2000 ; 356 : 1099–1104.
- 2) Lein AD, von Reyn CF, Ravn P, et al.: Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 1999 ; 6 : 606–609.
- 3) Arend SM, Thijsen SF, Leyten EM, et al.: Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for

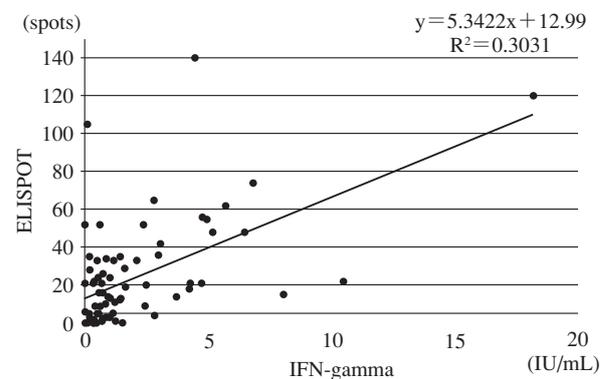


Fig. 3 Relationship between the concentration of IFN-gamma from QFT-2G assay and the ELISPOT counts

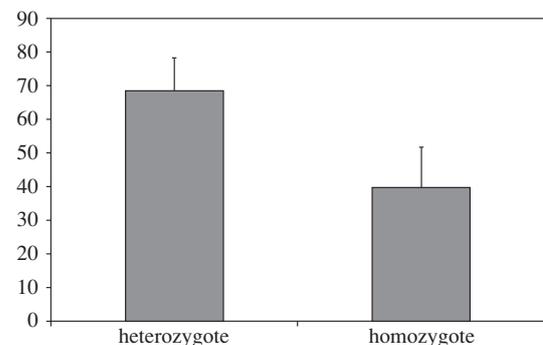


Fig. 4 The comparison of ELISPOT counts between heterozygote patients and homozygote patients (mean  $\pm$  SE)

- tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 ; 175 : 618–627.
- 4) Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al.: Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet.* 2003 ; 361 : 1168–1173.
  - 5) Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al.: Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR.* 2005 ; 54 : 49–55.
  - 6) Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, et al., IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection—United States, 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010 ; 59 : 1–25.
  - 7) Sadegh-Nasseri S, Natarajan S, Chou CL, et al.: Conformational heterogeneity of MHC class II induced upon binding to different peptides is a key regulator in antigen presentation and epitope selection. *Immunol Res.* 2010 ; 47 : 56–64.

————— The 86th Annual Meeting Mini-Symposium —————

## NEW MOVEMENT OF IGRA

Chairpersons: <sup>1</sup>Nobuyuki HARADA and <sup>2</sup>Yoshihiko HOSHINO

**Abstract** It has been more than 10 years since Interferon-gamma Release Assays (IGRA) which solve the weaknesses of the classical diagnostic method, tuberculin skin test, especially the test specificity, were developed. The use of IGRA is now recommended in tuberculosis (TB)-related guidelines of many developed countries including Japan. Currently, IGRA include QuantiFERON®TB Gold In-Tube (QFT-3G) and T-SPOT®.TB (T-SPOT). QFT-3G which has been approved in Japan uses whole blood and T-SPOT which has not been approved in Japan uses purified peripheral blood mononuclear cells. Both tests measure IFN- $\gamma$  production from stimulated antigen-specific T cells. Although use of IRGA is rapidly expanded, there are several subjects to be examined. Especially, evaluation of IGRA's performance in immunocompromized hosts such as HIV-infected persons, dialysis patients, or children is important subject and the establishment of the standardized guideline is awaited. About subjects concerning QFT-3G, as the positive and borderline rates increase in many cases compared with previous version, QFT-2G, it is important to demonstrate whether this is simply due to higher sensitivity of QFT-3G or due to other factors. As for another IGRA, T-SPOT, it has been shown that T-SPOT has higher sensitivity and better performances in children or immunocompromized hosts than QFT-3G. Since T-SPOT has also shown to be applicable for specimens other than blood, such as pleural effusion or cerebrospinal fluid, it is likely that T-SPOT will be approved in Japan in future. In addition, attempts to improve current IGRA have been made, and it has been reported that measurement of IP-10 as well as IFN- $\gamma$  in QFT-3G samples and synthetic interpretation using IP-10 and IFN- $\gamma$  increased the diagnostic sensitivity.

In such situation, current subjects and new movements of IGRA have been presented by five experts in this mini-symposium. However, as subject numbers shown in presentations were rather limited, it could be a good chance to have recognition that various evaluations of IGRA by more facilities

are necessary. Therefore, energetic development of IGRA studies in future is expected.

1. Subjects in IGRAs and from now on: Kazue HIGUCHI (Department of Mycobacterium Reference and Research, the Research Institute of Tuberculosis, JATA)

Although QuantiFERON®TB (QFT) tests are recommended to use instead of tuberculin skin test (TST) for contact investigations in Japanese guideline, newly introduced QFT-3G (QuantiFERON®TB Gold In-Tube) produced higher positive and borderline rates compared with previous QFT (QFT-2G). Since we have demonstrated that the sensitivity of QFT-3G is significantly higher than that of QFT-2G, increases of positive and borderline rates may be due to higher sensitivity of QFT-3G. We speculate several reasons of higher sensitivity of QFT-3G. First, QFT-3G contains new TB-specific antigen, TB7.7, which is absent in QFT-2G. Second, IFN- $\gamma$  values in QFT-3G are supposedly the sum of IFN- $\gamma$  values induced by each antigen, whereas separate IFN- $\gamma$  values induced by each antigen were used for interpretation of test results in QFT-2G. Third, we found that incubation in tubes produced higher IFN- $\gamma$  values compared with incubation in plates. However, higher positive or borderline rates in some cases did not correlate with contact heaviness and these are difficult to be explained by higher sensitivity. So far, we recognized several factors which may produce unstable QFT results (vigorous shaking of blood collection tubes, contamination of blood debris left on the separation gel after centrifugation into ELISA plates, blood collection volume). In addition to these reasons, there may be other factors which could affect QFT results. Although it is unclear whether factors may be due to fluctuation of individual's immune responses or the test system contains factors, it is urgently needed to clarify factors involving in unstable results of QFT-3G.

Another IGRA, T-SPOT®.TB (T-SPOT), has been shown to have lower specificity than QFT in meta-analyses. We have

demonstrated that the specificity of T-SPOT is equally high with that of QFT-3G in strictly selected healthy population, suggesting that some healthy control subjects in studies done in developing countries which were included in meta-analyses may be infected latently with *M. tuberculosis*. Since T-SPOT has been shown to work well even in immunocompromized hosts, approval of T-SPOT in Japan would improve diagnosis of *M. tuberculosis* infection.

As IGRA tests have been developed rather recently, there are many questions to be answered. Especially, the dynamics of immune responses in infected individuals are nearly unknown. As for the QFT-3G test, at the sites of blood collection we have to pay attention to some points. Therefore, the improvement of QFT-3G would be expected. Since IGRAs are now essential diagnostics in Japanese TB control, it is supposed that both users and manufactures of IGRAs have to make more efforts to obtain accurate results. Further progresses in characterizations of IGRA performance are also awaited.

2. How to use IGRAs for immunocompromized hosts, including HIV infected persons and patients on steroid therapy: Akira FUJITA (Department of Pulmonary Medicine, Tokyo Metropolitan Tama Medical Center)

Screening for latent tuberculosis infection (LTBI) using interferon- $\gamma$  release assays (IGRA) in immunocompromized hosts may be beneficial. QFT for the diagnosis of LTBI is recommended for HIV-infected persons with CD4 positive lymphocyte (CD4<sup>+</sup>) counts above 50 cells/ $\mu$ L, because our study suggested the sensitivity of QFT-2G in the patients with CD4<sup>+</sup> below 50 cells/ $\mu$ L may be low. The positive rate for QFT-3G tended to be higher in HIV infected persons, dialysis patients, and patients on immunosuppressive therapy compared to the published data of healthy population in Japan. Our limited data found that active screening for LTBI by QFT-3G seem to be useful among immunocompromized hosts, considering the backgrounds of patients.

3. Searching for more accurate diagnostic method of tuberculosis infection in children; Comparison between QuantiFERON<sup>®</sup>TB, T-SPOT<sup>®</sup>.TB, and IP-10 release assay: Osamu TOKUNAGA, Takeshi MIYANOMAE (Department of Pediatrics, National Hospital Organization Minami-Kyoto Hospital), Kazue HIGUCHI, Nobuyuki HARADA (The Research Institute of Tuberculosis, JATA)

Because children, especially infants, have higher probability of developing active tuberculosis (TB) disease after primary infection than adults, it is very important to judge TB infection accurately and apply an appropriate measure (i.e. LTBI treatment) after exposure to contagious TB patients.

Based on our study on the performance of QuantiFERON<sup>®</sup> TB (QFT) in children so far, the sensitivity of QFT in diagnosing infantile LTBI has proved to be unsatisfactory. To find more accurate diagnostic method of childhood TB infection, we have compared the performance of T-SPOT<sup>®</sup>.TB (T-SPOT)

and *M. tuberculosis*-specific antigen stimulated IP-10 release assay with QFT. In these studies, more cases among children at high risk for LTBI were judged "positive" by T-SPOT or IP-10 assay than by QFT. At the present time, it is unclear whether this higher positive rate in T-SPOT or IP-10 assay is related to higher sensitivity or lower specificity. To elucidate this question, longitudinal prospective study to evaluate the predictive value of a positive result for the development of active TB disease and evaluation of the specificity among children without known exposure to TB patients are needed.

4. Evaluation of the clinical utility of T-SPOT<sup>®</sup>.TB using local specimens: Yoshihiro KOBASHI, Mikio OKA (Division of Respiratory Diseases, Department of Medicine, Kawasaki Medical School)

Since 2007, we have evaluated the clinical utility of T-SPOT<sup>®</sup>.TB (T-SPOT) for diagnosing TB pleurisy or pulmonary TB using pleural effusion and bronchoalveolar lavage fluid (BALF). As for TB pleurisy, the positive response rates using peripheral blood were 90% for confirmed TB, 88% for suspected TB, and 19% for other diseases, respectively. On the other hand, the positive response rates using pleural effusion were 100% for confirmed TB, 88% for suspected TB, and 15% for other diseases, respectively. Although there was no statistical significance, pleural effusion provided slightly better results. Moreover, these results were better than those obtained by ADA. These results suggested that it would be worth to perform T-SPOT using pleural effusion as well as the measurement of ADA in using pleural effusion. As for pulmonary TB, the positive response rates using peripheral blood for confirmed TB (91%) was significantly higher than pulmonary MAC disease (17%) or other pulmonary diseases (19%), and was also significantly higher than healed pulmonary tuberculosis (44%). The positive response rates for confirmed TB using BALF was 96% and it was significantly higher than pulmonary MAC disease (13%), other pulmonary diseases (15%), or healed pulmonary tuberculosis (22%). These results suggested that T-SPOT using BALF also might give us better results than those using peripheral blood. However, there were some limitations in this study. Firstly, volumes of BALF were sometime not enough to obtain sufficient amounts of lymphocytes for T-SPOT. Secondly, there is no cut-off value using pleural effusion or BALF. Thirdly, the patient number was still limited. Thus, we think that it is necessary to accumulate more data for more appropriate evaluation of these methods.

5. The relationship between the genetic background of the Japanese and Interferon-Gamma Release Assays (IGRA): Yoshihiko HOSHINO (Department of Mycobacteriology, National Institute of Infectious Diseases), Haruyuki ARIGA (Center for Respiratory Medicine, National Hospital Organization Tokyo National Hospital)

QuantiFERON (QFT) is one of the methods of Interferon-

Gamma Release Assays (IGRA). Using this QFT-2G assay, we could estimate the amount of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) secretion from patient's PBMC with the tuberculosis specific antigen; either ESAT-6 and/or CFP-10. For the induction of cell mediated immunity, it is necessary for the T lymphocytes to contact the antigen presenting cells (APC) and to get the signal from APC, which means the contact with major histocompatibility complex (MHC) of APC and T cell receptor of T cells. Human leukocyte antigen (HLA) is one of the major MHC and significantly varies the affinity to the antigen. We hypothesized the genetic background of patients (different HLA) might affect the reactivity of IGRA. And this reactivity might be critical for setting cut-off value of IGRA. We made overlap peptides of ESAT-6 and CFP-10 and incubated them with PBMC. We assayed secreted IFN- $\gamma$  by ELISPOT method or intracellular staining by flow cytometry. We reproduced the result of QFT-2G with ELISPOT assay using overlap peptides.

There is a significant relationship between the result of QFT-2G and the count of ELISPOT assay. The ELISPOT counts from HLA class II heterozygote patients were higher than those from the homozygote patients. These data suggest the genetic background of hosts might influence the result of IGRA.

**Key words** : QFT-3G, T-SPOT.TB, IGRA, Application, Immune response

<sup>1</sup>The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, <sup>2</sup>Department of Mycobacteriology, National Institute of Infectious Diseases

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