

次世代結核菌感染診断用インターフェロン γ 測定検査法の検討

三宅 啓文, 山本 宣和, 福田 貢, 向川 純, 吉田 道彦,
中村 清純, 藤田 明, 本保 善樹, 貞升 健志, 甲斐 明美

Basic Study of a New Interferon- γ Release Assay, QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube

Hirofumi MIYAKE, Nobukazu YAMAMOTO, Mitsugu FUKUDA, Jun MUKAIGAWA, Michihiko YOSHIDA,
Kiyozumi NAKAMURA, Akira FUJITA, Yoshiki HONBO, Kenji SADAMASU and Akemi KAI

次世代結核菌感染診断用インターフェロン γ 測定検査法の検討

三宅啓文*, 山本 宣和*, 福田 貢*, 向川 純*, 吉田 道彦**, 中村 清純**,
藤田 明***, 本保 善樹**, 貞升 健志*, 甲斐 明美*

結核菌感染診断用インターフェロン γ 測定検査法であるQuantiFERON[®]第二世代 (QFT-2G) の改良版として, 第三世代の検査法 (QFT-3G) が開発された. しかしながら, QFT-3Gは過度の振とう操作が検査結果に悪影響を与えることが知られている. 検体輸送の検査結果に及ぼす影響について検討を行った結果, バイク便による輸送程度の振とうでは検査結果に影響が無いことが示された.

さらに, QFT-2G・QFT-3Gの二種類の検査法を用いて性能の比較検討を行った結果, QFT-2G 陰性例109件中105件の結果が一致し, またQFT-2G 陽性例27件中25件, QFT-2G 判定保留例5件中3件で結果が一致した. 不一致例の多くは第三世代のQFT法の感度が向上したことによる結果と推察される.

キーワード: 結核, 診断法, インターフェロン γ 測定検査, 結核菌特異的抗原, QuantiFERON TB-2G, TB Gold

はじめに

体内に結核菌の侵入を受けると, マクロファージが結核菌を貪食し抗原を提示することによりTリンパ細胞が結核菌に感作され, 同様な抗原が体内に再侵入した際にインターフェロン γ (IFN- γ) を産生する. 結核菌感染診断用インターフェロン γ 測定検査法はこの性質を利用して, 被験者より採血した血液に結核菌特異的抗原を加えて培養し, 産生されるIFN- γ 量を測定することで, 結核感染の有無を早期に判断する方法である.

この原理を利用したQuantiFERON[®] TB-2G (QFT-2G) は, ツベルクリン反応と異なり, 過去のBCG接種による偽陽性がみられないため, 結核接触者検診のガイドライン¹⁾において, 積極的使用が推奨されている. その理由としてQFT-2GおよびQuantiFERON[®] TB Gold (QFT-3G) で用いる結核菌特異的抗原²⁻⁷⁾は, ワクチンに用いるBCG株には存在しないタンパクを使用するため, 過去に受けたBCG接種による影響を受けることなく結核菌感染の診断を行うことができるためである.

結核の伝播阻止のための的確な接触者検診の策定を行う上で, 東京都健康安全研究センターではQFT-2Gによる検査を2007年度より開始し, 都内の15箇所の保健所からの血液検体の搬送には, バイク便が使用されている.

現在検査に用いているQFT-2Gは第二世代のQFT法であるが, その改良版である第三世代のQFT法, QFT-3Gが最近開発され, 日本を除く世界各国で運用⁸⁾されている. QFT-3Gの導入により作業工程の一部を機械化や簡略化を行うことができ, 検査の効率化につながる事が期待されている. しかしながら, QFT-3Gは過度の振とう操作が検査結果に悪影響を与えることが添付文書に記載されており, バイク便搬送時の振とうによる検査結果への影響が懸念さ

れた.

そこで, QFT-3Gの導入を目的とし, 検査結果に影響を与える恐れのある振とう条件について基礎的検討を行った. また医療機関の受診または入院患者, および保健所の接触者検診の受診者を対象としてQFT-2GとQFT-3Gの感度や特異性などの性能の比較検討を行った.

実験方法

1. 検査対象

1) バイク便搬送実験

試験は二回繰り返して行い, 一回目の被験者は4名, 二回目の被験者は7名で, インフォームドコンセント取得済の健常者採血を用い実施した. バイク便の経路は, 東京都健康安全健康センターから最遠の西多摩保健所からの片道直線距離とほぼ同じ直線距離である, 当センターと多摩府中保健所間の往復とした.

2) QFT-2GとQFT-3Gの検査結果の比較

医療機関で結核疑いあるいは結核既往とされた受診または入院患者51名, および保健所で実施した接触者検診の受診者90名, 合計141名についてQFT-2GとQFT-3Gの検査結果の比較を行った.

2. 検査法操作

1) QFT-2G

ヘパリン加全血を1 mLずつ培養用プレートの各ウェルに分注後, 陰性対照 (生理食塩水), 結核菌特異的刺激抗原2種 (ESAT-6: the early secreted antigenic target 6kDa protein (特異的抗原E), CFP-10: 10kDa culture filtrate protein (特異的抗原C)), 陽性対照 (Mitogen) を各々3滴加え, 37°C, 湿度飽和状態で16~20時間培養した後,

* 東京都健康安全研究センター微生物部 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 品川区保健所 140-8715 東京都品川区広町 2-1-36

*** 東京都立多摩総合医療センター 183-8524 東京都府中市武蔵台 2-8-29

表1. バイク便輸送におけるQFT-2G, QFT-3Gでの測定値の比較

被験者	QFT-2G			QFT-3G					
	バイク便			バイク便				センター静置	
	測定値 E (IU/ml)	測定値 C (IU/ml)	判定	測定値 A (IU/ml)	判定	測定値 A (IU/ml)	判定	測定値 A (IU/ml)	判定
1 (1回目)	0.00	0.01	陰性	0.01	陰性	0.00	陰性	0.04	陰性
1 (2回目)	0.00	0.00	陰性	0.01	陰性	0.00	陰性	0.00	陰性
2 (1回目)	0.00	0.04	陰性	0.06	陰性	0.07	陰性	0.07	陰性
2 (2回目)	0.01	0.04	陰性	0.03	陰性	0.02	陰性	0.03	陰性
3 (1回目)	0.00	0.00	陰性	0.01	陰性	0.09	陰性	0.07	陰性
3 (2回目)	0.00	0.00	陰性	0.02	陰性	0.04	陰性	0.08	陰性
4 (1回目)	0.08	0.01	陰性	0.19	判定保留	0.19	判定保留	0.20	判定保留
4 (2回目)	0.18	0.00	判定保留	0.15	判定保留	0.10	判定保留	0.26	判定保留
5	0.00	0.00	陰性	0.00	陰性	0.02	陰性	0.02	陰性
6	0.00	0.00	陰性	0.00	陰性	0.00	陰性	0.00	陰性
7	0.00	0.00	陰性	0.01	陰性	0.02	陰性	0.04	陰性

E: 結核菌特異的抗原 (ESAT-6), C: 結核菌特異的抗原 (CFP-10)

A: 結核菌特異的抗原3種混合 (ESAT-6, CFP-10, TB7.7(p4))

上清を分取しその50 μ Lについて抗ヒトIFN- γ 抗体固相化プレートを用いてELISA法を行った。得られた吸光度から標準IFN- γ を用いた検量線によりIFN- γ 濃度 (IU/mL) を求め、特異的抗原E, 特異的抗原Cならびに陽性対照由来の値から陰性対照の値 (測定値N) を差し引いた値をそれぞれ測定値E, 測定値C, 測定値Mとした。測定値EまたはCが0.35以上を陽性, 0.10以上0.35未満を判定保留 (疑陽性), 測定値E, C共に0.10未満を陰性とする判定基準に従って判定を行った。

2) QFT-3G

1 mLずつ3種の専用採血管 (陰性対照採血管, 結核菌特異抗原 ESAT-6, CFP-10, TB7.7(p4)含有採血管, 陽性対照 (Mitogen) 採血管) に採血し, 5秒間または10回振って混合した後, 37°C, 湿度飽和状態で16~24時間培養した。培養後, 採血管を2,000 \times g, 15分間遠心分離し, 分取した血漿のうち50 μ Lについて抗ヒトIFN- γ 抗体固相化プレートを用いてELISA法を行った。得られた吸光度から標準IFN- γ を用いた検量線によりIFN- γ 濃度 (IU/mL) を求め, 特異的抗原ならびに陽性コントロール由来の値から陰性コントロールの値 (測定値N) を差し引いた値をそれぞれ測定値A, 測定値Mとした。測定値Aが0.35以上を陽性, 0.10以上0.35未満を判定保留 (疑陽性), 0.10未満を陰性とする判定基準に従って判定を行った。

3. 搬送時の振動が検査結果に与える影響

被験者の血液を採血後, QFT-2G用に5 mLをヘパリン加採血管に分注し, QFT-3G用採血管3組 (陰性対照・結核菌特異抗原・陽性対照の合計3本) に各1 mLを分注した。さらに, QFT-3G用採血管のうち1組 (3本) は実験室内で静置し, 検査対照とした。残り2組は当センター指定のバイク便搬送用容器に位置 (中央または端) を変えて配置し,

位置の違いによる影響を調べた。採血後バイク便に搬送用容器を載せ, センターを出発し, 都内に設定した折り返し地点を経由し, 1.5時間後に再びセンターに帰着後, 各検査を実施した。

結果及び考察

1. 搬送時の振動が検査結果に与える影響

バイク便輸送におけるQFT-2G, QFT-3Gでの測定値を比較した結果を表1に示す。

QFT-3Gの測定値について, バイク便で輸送したものと当センターで静置したものとで比較した結果, 両者に差はみられなかった。バイク便による検体輸送時の振動が検査結果に与える影響はないものと考えられる。

バイク便で輸送したQFT-3Gの中央付近に配置した検体と端に配置した検体とで測定値を比較した場合, 両者に大きな差はみられず, 搬送用容器中の位置の違いによる影響についてもないものと考えられた。

QFT-3GとQFT-2Gの判定を比較した場合, QFT-2Gで陰性であったのに対しQFT-3Gでは判定保留となった1例を除いて全て一致した。一回目と二回目の調査で重複する4名 (1~4) については, 被験者4のQFT-2Gを除いて結果に差はみられなかった。

2. QFT-2GとQFT-3Gの検査結果の比較

医療機関で結核疑いあるいは結核既往とされた受診または入院患者51例, および保健所で実施した接触者検診の受診者90例についてQFT-2GとQFT-3Gによる検査を実施し, その判定を比較した。

医療機関の患者を対象とした調査では51例中47例で両者の結果が一致した (一致率92.2%)。また, 接触者検診についての調査では90例中86例で両者の結果が一致した (一致率95.6%)。

表2. QFT-2G 陰性例におけるQFT-3G の判定

		QFT-3G				計
		陽性	判定保留	陰性	判定不可	
QFT-2G	陰性	0	3 ^a	105	1	109

表3. QFT-2G 陽性・判定保留例におけるQFT-3G の判定

		QFT-3G			計
		陽性	判定保留	陰性	
QFT-2G	陽性	25	2 ^b	0	27
	判定保留	2 ^c	3	0	5

表4. QFT-2G, QFT-3G 結果不一致例の測定値

	QFT-2G		QFT-3G
	測定値 E (IU/ml)	測定値 C (IU/ml)	測定値 A (IU/ml)
a	0.00	0.04	0.13
	0.07	0.06	0.26
	0.05	0.04	0.30
b	0.00	0.41	0.31
	0.01	0.55	0.32
c	0.09	0.16	0.59
	0.31	0.03	0.67

QFT-2Gで陰性となった109例についてのQFT-3Gの判定を表2に示した。105例が両検査法で結果が陰性（一致率96.3%）であったが、3例はQFT-2G陰性、QFT-3G判定保留となり、測定値Aは0.13-0.30であった（表4）。

QFT-2Gで陽性・判定保留となった32例についてのQFT-3Gの判定を表3に示した。28例（陽性25例、判定保留3例）が両検査法で結果が一致した（一致率87.5%）。QFT-2G陽性、QFT-3G判定保留となった2例のQFT-3Gにおける測定値Aはそれぞれ0.31、0.32であり、陽性の境界値に近い値であった（表4）。また、QFT-2G判定保留、QFT-3G陽性となった2例の測定値Aはそれぞれ0.59、0.67であり、それらのQFT-2Gでの測定値E、測定値Cと比較して高い値を示した（表4）。

原田ら⁹⁾は94名の結核患者での調査から、QFT-3GはQFT-2Gより高感度（QFT-2G: 81.4%, QFT-3G: 92.6%）と報告しており、QFT-2GとQFT-3Gの検査結果の不一致例の多くは第三世代のQFT法の感度が向上したことによる結果と考えられる。

まとめ

バイク便による輸送程度の振とうではQFT-3Gの検査結果に影響が無いことが示された。都内に点在する保健所での接触者検診の検査にQFT-3Gを用いて問題無いと考えられる。

また、QFT-2GとQFT-3Gの判定の比較では高い一致が見られた。QFT-3GはQFT-2Gに続く次世代検査法としてQFT-

2G同様高い感度・特異性を有した結核感染診断法であるといえる。

謝 辞

バイク便輸送実験にあたり協力を頂いた多摩府中保健所の阿保満氏に謝意を表します。

文 献

- 1) 結核予防会：「改正感染症法に基づく結核の接触者検診の手引きとその解説」。結核予防会，東京，2007。
- 2) Andersen, P., Andersen, A. B., Sørensen, A. L., et al. *J. Immunol.*, **154**, 3359-3372, 1995.
- 3) Sørensen, A. L., Nagai, S., Houen, G., et al. *Infect. Immun.* **63**, 1710-1717, 1995.
- 4) Berthet, F. X., Rasmussen, P. B., Rosenkrands, I., et al. *Microbiology*, **144**, 3195-3203, 1998.
- 5) Laurens, A. H., van Pinxteren, Clin. *Diag. Lab. Immunol.* **7**, 155-160, 2000.
- 6) Brock, L., Weldingh, K., Leyten, E. M., et al. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2379-2387, 2004.
- 7) Aagaard, C., Brock, I., Olsen, A., et al. *J. Infect. Dis.*, **189**, 812-819, 2004.
- 8) CDC: *MWWR*, **59**, RR-5, 2010.
- 9) Harada, N., Higuchi, K., Yoshiyama, Y., et al. *J. Infect.*, **56**, 348-353, 2008.

Basic Study of a New Interferon- γ Release Assay, QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube

Hirofumi MIYAKE*, Nobukazu YAMAMOTO*, Mitsugu FUKUDA*, Jun MUKAIGAWA*, Michihiko YOSHIDA**,
Kiyozumi NAKAMURA**, Akira FUJITA***, Yoshiki HONBO**, Kenji SADAMASU* and Akemi KAI*

The third generation of interferon γ release assays for *Mycobacterium tuberculosis* infection, QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube, QFT-3G, has been introduced as an improved method of the second generation assay, QFT-2G. This new method is more sensitive and has simplified the examination procedure. However, it is known that excessive test tube shaking may exert a harmful influence on the results of QFT-3G. Therefore, we examined the influence of transportation on the results of QFT-3G and found that shaking conditions with motorcycle delivery service did not affect.

We also compared the 2 methods, QFT-2G and QFT-3G. The results of the 2 methods for 47 hospital samples of 51 samples were in agreement. Further, the results of the 2 methods for 86 samples from health center of 90 samples were in agreement. Most cases of disagreement in results were thought as due to the high sensitivity of QFT-3G.

Keywords: tuberculosis, diagnostic method, interferon γ , TB specific antigen, QuantiFERON TB Gold, QuantiFERON TB Gold In-Tube

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** Shinagawa City Health Center
2-1-36, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8715 Japan

*** Tokyo Metropolitan Tama Medical Center
2-8-29, Musahidai, Fuchu-shi, Tokyo 183-8524 Japan