

## QuantiFERON TB-2G 検査の再現性に関する基礎的検討

久保田紀子、奥田 富貴、羽場 昇、寺井直樹  
長野県松本保健福祉事務所

### The fundamental experiment for reproducibility of QuantiFERON-2G

Noriko KUBOTA, Fuki OKUDA, Noboru HABA, Naoki TERAI

Matsumoto health and welfare office 1002, Shimadati, Matsumoto city, Nagano

**目的:** 松本保健福祉事務所において結核接触者健康診断としての QFT-2G を導入するため、QFT-2G の再現性に関する基礎的検討を行い考察した。

**方法:** QFT-2G の第1ステップ、第2ステップそれぞれについての同時再現性・日差再現性について検討した。また、測定条件として規定されている反応温度内(17~27°C)における反応温度の違いによる IFN- $\gamma$  定量値についても検討した。

**結果:** 第2ステップにおいては、同時再現性・日差再現性とも良好であることが示された。第1ステップの刺激培養においても同一採血検体を用いて行なった同時再現性は良好な結果を示したものの、日差再現性に関しては、異なる3日間にそれぞれ採血を行い刺激培養した場合に、3検体中1検体において大きなバラツキが認められた。

第2ステップでの反応温度を17、22、27°Cで変化させた場合、標準液希釈系列の最高濃度(およそ10IU/ml)までは濃度依存的に吸光度が上昇し、標準曲線から換算する IFN- $\gamma$  値は反応温度の違いによって変化することはなかったが、IFN- $\gamma$  値が高値となる健康正常人の陽性コントロール刺激検体は反応温度の違いによって IFN- $\gamma$  値が大きく変化した。

**考察:** QFT-2G は同時再現性には優れているものの、日差再現性ではバラツキが認められることがあるため、同一被検者であっても採血日を変えることで IFN- $\gamma$  値が大きく変動する可能性があることを念頭において結果の解釈を行なう必要があることが示唆された。

また、QFT-2G によって算出される測定値は、低~中濃度領域での定量性はあるものの高濃度領域における定量性には乏しいため、IFN- $\gamma$  値の定量的な解釈をしたいときにはそのときの吸光度値にも注目する必要がある。

**Key words:** QuantiFERON-2G、同時再現性、日差再現性

### I. はじめに

結核の制圧に向けた対策の中でも、結核患者と接触のあった者に対する接触者健診は患者の治療について優先度の高い重要な対策であり、発病および潜在性結核感染の有無について感染症法に基づく健康診断が行

なわれ、その実務的役割の多くを各地域保健所が担っている。

これまで接触者健診では、胸部X線検査およびツベルクリン反応検査(ツ反)が実施されてきたが、潜在性結核感染者を検出できる検査は唯一ツ反検査に限られていた。しかしツ反はBCG接種や非結核性抗酸菌感染によっても陽性反応を示す場合があり<sup>1)</sup>、本邦のように積極的にBCG接種を行なってきている集団を

(2010年2月16日受付、2010年7月7日受理)

対象とした場合、ツ反のみで潜在性結核感染を正確に診断することはきわめて困難である。

近年、BCG やほとんどの非結核性抗酸菌には存在しない結核菌特異的の刺激抗原<sup>23)</sup>に対するリンパ球のインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 産生能を測定することによって結核感染の診断を行なう QuantiFERON TB-2G (QFT-2G) が開発された。QFT-2G は、優れた感度と特異性を示し、BCG 接種の有無に影響を受けることなく結核患者・潜在性結核感染者を検出できる<sup>45)</sup>。そのため、新感染症法に基づいて2007年改訂された「結核の接触者健康診断の手引き」<sup>6)</sup>において、一定の条件付ではあるものの接触者検診の第一選択検査に位置づけられた。

検査データには、その測定原理、使用機器、検査実施環境、被検者自身の生理的変動等による様々な不確かさが内包されている。そのため、目的とする検査データに存在する不確かさの程度(データ再現性のバラツキとして表されることが多い)を把握することは、

より正しい結果解釈を導くために必須である。今回我々は、松本保健福祉事務所における接触者検診を目的とした QFT-2G 導入のために、QFT-2G に関する同時再現性、日差再現性、第2ステップ反応温度についての基礎的検討を行ったので、その検討結果について考察し報告する。

なお、本研究は信州公衆衛生学会倫理委員会による倫理審査受け、承認を得たものである。

## II. 方 法

### A QFT-2G 検査方法

QFT-2G (日本 BCG 製造、東京) は全血検体に免疫抗原を添加して刺激培養する第1ステップとその免疫反応によって放出される IFN- $\gamma$  を ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) によって定量する第2ステップから構成される。検査方法概略図を図1に示した。

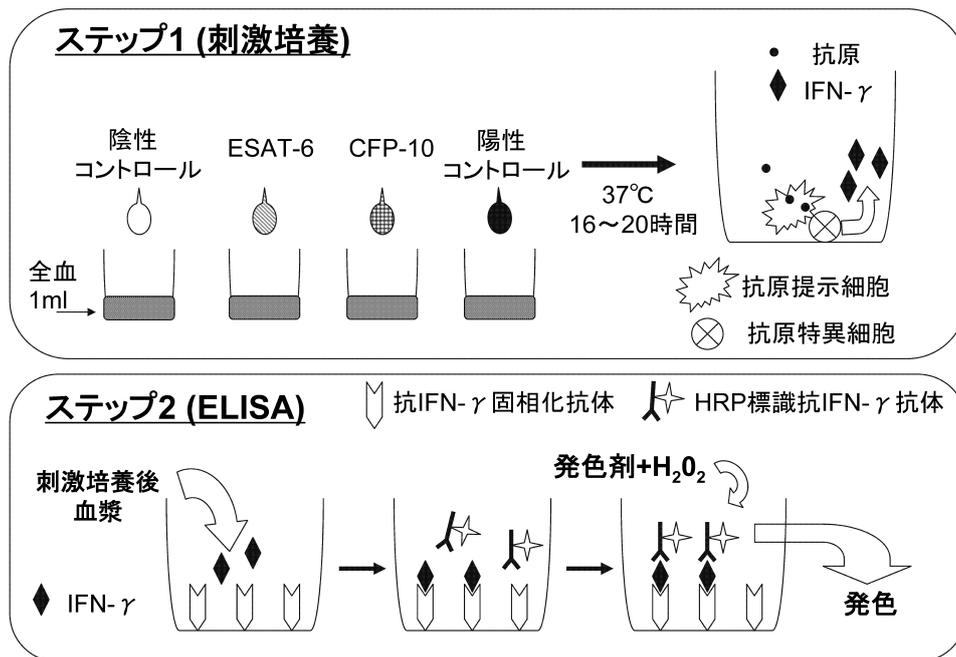


図1 QFT-2G 検査法概略図

検査は QFT-2G キット添付文書に従い、刺激抗原と全血検体の混和はマルチマイクロプレートジェニー (Scientific Industries、New York) にてスピード4で1分間の攪拌を行なった。洗浄操作はオートミニウォッシャーAMW-8(バイオテック、東京)を用いて6回洗浄を行い、吸光度はMTP-310Lab 吸光マイクロプレートリーダー(コロナ電気、茨城県)を用い

て主波長450nmにて測定した。

標準曲線の作成と、作成された標準曲線からの IFN- $\gamma$  濃度の算出には専用のソフトウェア (<http://www.bcg-qft.com/>) を用い、IFN- $\gamma$  値は、刺激抗原(ESAT-6またはCFP-10または陽性コントロール)添加検体の IFN- $\gamma$  値から陰性コントロール添加検体の IFN- $\gamma$  値を差し引いたものである。

なお、QFT-2G キット添付文書では同時再現性に関する性能を変動係数 (CV)15%以下としている。

## B 同時再現性の検討

### 1 第1ステップの同時再現性の検討

松本保健福祉事務所内において、業務上結核罹患リスクが高いと考えられる職員の QFT ベースラインを把握することを目的とした QFT-2G 検査において、検体の提供と今回の知見を発表することに同意が得られた健康成人ボランティア3名からそれぞれ10ml ずつヘパリンナトリウム採血管にて採血し、1 ml ずつの全血に陰性コントロール、陽性コントロールを添加し、37℃にて18時間培養した。それぞれ同一検体につき同時に3回第1ステップを行ない、全検体同時に IFN- $\gamma$  定量を行なった。陽性コントロール添加検体の IFN- $\gamma$  値から陰性コントロール添加検体の IFN- $\gamma$  値を差し引いたものを Mitogen 値 (M値) とした。

### 2 第2ステップの同時再現性の検討

QFT-2G キット添付のヒト IFN- $\gamma$  標準品を添付文書に従って溶解し、この溶解液を原液 (S 1 とする) として希釈用緩衝液にて6段階の2倍希釈系列 (S 2 ~ S 7 とする) を作製した。この希釈系列とゼロポイントとしての IFN- $\gamma$  不含希釈用緩衝液 (S 0 とする) について、それぞれ3回ずつ第2ステップを行い吸光度を測定した。

## C 日差再現性の検討

### 1 第1ステップの日差再現性

第1ステップの同時再現性の検討と同様に、松本保健福祉事務所内において、QFT ベースライン把握を目的として行なった QFT-2G 検査において、検体の提供と今回の知見を発表することに同意が得られた健康成人ボランティア3名から3日間 (Day 1, Day 2, Day 3 とする) にそれぞれ採血し、1 ml ずつの全血に陰性コントロール、陽性コントロールを添加し、37℃にて18時間培養した。それぞれの刺激済み血漿を回収し、IFN- $\gamma$  定量検査まで4℃にて保存した。全検体同時に IFN- $\gamma$  定量を行いM値を算出した。

2 第2ステップの日差再現性は、QFT キットに添付のヒト IFN- $\gamma$  標準品を添付文書に従って溶解し、3日間 (Day 1, Day 2, Day 3) にそれぞれこの溶解液 (S 1 とする) を原液として6段階の2倍希釈系列 (S 2 ~ S 7) を作製した。この希釈系列とゼロポイントとしての IFN- $\gamma$  不含希釈用緩衝液 (S 0 とする) について、3日間それぞれ第2ステップを行い吸光度測定を行なった。

## D 第2ステップ反応温度の検討

第2ステップにおける抗原抗体反応と発色反応の指定反応温度17~27℃内での温度の違いにより、吸光度と IFN- $\gamma$  値が変化するかどうかを調べるために、QFT-2G キット添付の IFN- $\gamma$  標準液希釈系列 (S 1 ~ S 7) とゼロポイントの S 0 と4名の正常健康人の陽性コントロール血漿4件 (検体番号 N 4 ~ N 7 とする) を用いて、17℃、22℃、27℃の3温度で反応させた。このとき室温は22.5度、洗浄工程はオートミニウォッシャーAMW-8を使用し同一工程にて行なった。

## III. 結 果

### A 同時再現性

#### 1 第一ステップ同時再現性

健康正常人3名から得られた検体につき3回ずつ刺激培養を行なった第1ステップの同時再現性について表1に示した。3検体ともM値にバラツキは認められず変動係数 (CV) は4.5%以下であった。

表1 第1ステップ同時再現性 (M値)

No.	1 st (IU/ml)	2 nd (IU/ml)	3 rd (IU/ml)	CV (%)
N 1	15.14	15.13	15.13	0.1以下
N 2	10.36	10.69	11.32	4.5
N 3	15.11	15.15	15.11	0.2

注: N 1 ~ N 3 は健康正常人検体

#### 2 第2ステップ同時再現性

IFN- $\gamma$  標準品の希釈系列についてそれぞれ3回ずつ同時に測定した第2ステップの同時再現性について表2に示した。吸光度の低下にしたがってCVが上がっていく傾向は認められたものの、CVは最大でも約4.3%であった。

表2 第2ステップ同時再現性 (吸光度値)

No.	1 st (abs)	2 nd (abs)	3 rd (abs)	CV (%)
S 1	2.003	2.004	1.993	0.3
S 2	1.201	1.213	1.198	0.7
S 3	0.666	0.673	0.675	0.7
S 4	0.347	0.353	0.354	1.1
S 5	0.179	0.179	0.181	0.6
S 6	0.099	0.097	0.097	1.2
S 7	0.064	0.061	0.065	3.3
S 0	0.036	0.037	0.034	4.3

注: S 0 ~ S 7 は IFN- $\gamma$  標準液希釈系列

**B 日差再現性**

## 1 第一ステップ日差再現性

3名の健康正常人から3日間採血し、それぞれ刺激培養を行なった第1ステップの日差再現性について表3に示した。3検体中2検体（検体番号N1とN3）では採血日の違いによるM値の差は認められずCVはおよそ1.5%だったが、検体番号N2では採血日によってM値が10.79IU/ml、5.50IU/ml、4.28IU/mlを示し、CVは50%以上となり、良好な再現性が得られなかった。

表3 第1ステップ日差再現性（M値）

No.	Day 1 (IU/ml)	Day 2 (IU/ml)	Day 3 (IU/ml)	CV (%)
N 1	15.15	15.18	14.78	1.4
N 2	10.79	5.50	4.28	50.5
N 3	15.12	14.86	14.63	1.7

注：N1～N3は同時再現性検討と同一被検者を由来とする検体。

## 2 第2ステップ日差再現性

IFN- $\gamma$ 標準品の希釈系列について異なった3日間に測定した第2ステップの日差再現性について表4に示した。1日あたりに吸光度を3回測定したデータを平均しその平均値を1日のデータとした。S0（IFN- $\gamma$ 値0IU/ml）のCVは8.7%を示したが、S1からS7のCVは1.2～4.6%の範囲内に含まれていた。

表4 第2ステップ日差再現性（吸光度値）

No.	Day 1 (abs)	Day 2 (abs)	Day 3 (abs)	CV (%)
S 1	2.000	2.005	2.044	1.2
S 2	1.204	1.112	1.112	4.6
S 3	0.671	0.637	0.635	3.2
S 4	0.351	0.332	0.325	4.0
S 5	0.180	0.179	0.170	3.0
S 6	0.098	0.100	0.092	4.3
S 7	0.063	0.060	0.064	2.9
S 0	0.036	0.030	0.031	8.7

**C 第2ステップ反応温度の違いによるIFN- $\gamma$ 値の変動**

第2ステップの反応温度を17、22、27℃の各温度で行なったときの吸光度値とそれぞれの温度で作成した標準曲線から算出したIFN- $\gamma$ 値を表5に示した。このときのIFN- $\gamma$ 値は陰性コントロールによる補正は行っていない。

S0（0IU/ml）～S1（10.13IU/ml）では各温度の違いによる吸光度に差はあってもIFN- $\gamma$ 換算値に大きな差はなかったが、正常健康人の陽性コントロール検体（N4～N7）は反応温度の違いによってIFN- $\gamma$ 換算値が変化した。17℃から反応温度が上がるにつれてIFN- $\gamma$ 換算値は低下し、17℃と27℃での差はN4では4.27IU/ml、N5では4.23IU/ml、N6では4.27IU/ml、N7では3.54IU/mlであり、全検体

表5 第2ステップ反応温度の違いによる吸光度値とIFN- $\gamma$ 値

検体番号 (標準液IFN- $\gamma$ 濃度 IU/ml)	17℃		22℃		27℃	
	吸光度 (abs)	IFN- $\gamma$ 値 (IU/ml)	吸光度 (abs)	IFN- $\gamma$ 値 (IU/ml)	吸光度 (abs)	IFN- $\gamma$ 値 (IU/ml)
S 1 (10.13)	2.184	9.32	2.608	8.60	2.821	8.52
S 2 (5.065)	1.303	5.26	1.701	5.30	1.962	5.57
S 3 (2.533)	0.728	2.76	1.023	2.98	1.114	2.87
S 4 (1.266)	0.372	1.31	0.506	1.34	0.570	1.31
S 5 (0.633)	0.182	0.61	0.258	0.62	0.309	0.64
S 6 (0.317)	0.099	0.30	0.138	0.31	0.161	0.30
S 7 (0.158)	0.056	0.16	0.073	0.15	0.091	0.15
S 0 (0.000)	0.010	0.02	0.014	0.02	0.019	0.02
N 4	3.113	13.81	3.087	10.39	3.107	9.54
N 5	3.096	13.72	3.066	10.33	3.095	9.49
N 6	3.106	13.77	3.084	10.38	3.098	9.50
N 7	2.948	13.00	3.065	10.32	3.087	9.46

注：S0～S7はIFN- $\gamma$ 標準液希釈系列、N4～N7は正常健康人陽性コントロール検体

とも27°C反応で得られたIFN- $\gamma$ 値は17°C反応で算出されたIFN- $\gamma$ 値のおよそ30%程度低下していた。

#### Ⅳ. 考 察

QFT-2Gに関する今回の基礎検討の結果から、採血日を替えて採取した同一被験者検体において、良好な日差再現性が得られない場合があることが示された。この被験者の同一採血検体を3分割して第1ステップを行なったときの同時再現性は良好であったこと、IFN- $\gamma$ 標準品の希釈系列を用いて検討した第2ステップ(ELISA)のみの同時再現性と日差再現性は良好であったことから、今回の検討結果では、日差再現性のバラツキの原因は健康成人において存在する何らかの生理的変動を反映した可能性、もしくは第1ステップ(抗原刺激培養)過程に日差間のバラツキが存在する可能性が示唆された。QFT-2Gは採血後12時間以内の第1ステップ反応開始が必要であるため、同一採血検体による第1ステップの日差再現性の検討は不可能なため、原因の確定は難しいと考えられる。

今回我々は、健康正常人のMitogen値を対象とした再現性について検討しているが、Detjin<sup>7</sup>らは結核感染リスクの高い結核医療施設職員を対象に、QFT-Gold(QFT-2Gの後継試薬)における結核菌特異抗原刺激によるIFN- $\gamma$ 放出値の同時再現性と日差再現性の検討を行っており、同時再現性は良好であるが、3日間の間隔をあけて採血した検体を用いて検討した日差再現性では、27名中5名でIFN- $\gamma$ 値の変動によって判定結果が反転したことを報告している。また、Veerapathranら<sup>8</sup>はQFT-Goldを用いてQFT陽性者とQFT陰性者の結核菌特異抗原値を対象に0日目、3日目、9日目、12日目の4日間での日差再現性を調べており、それぞれの検査日によって結核菌特異抗原に対するIFN- $\gamma$ 値の変動が認められ、一部の検体では判定結果が反転したことを報告している。

さらに、Tuuminen<sup>9</sup>らは、過去に結核に罹患したことのある無症状の被験者を対象に、2~8日の間隔をあけて採血日を変えて採取した検体について検討したときの同時再現性は良好であったものの、日差再現性はCV30%を超えるバラツキを認めたことを報告している。しかしTuuminen<sup>9</sup>らは、同一論文にてIFN- $\gamma$ 値0.5IU/mlを理論値として作成した検体を凍結保存し測定日を変えて89回の重複測定を行ったとき、IFN- $\gamma$ 値のCVが23%となったと述べ、被験者側の生理的変動のみでなく、QFT-2G第2ステップ自体

にも日差間のバラツキを引き起こす可能性が存在することを報告している。

我々の検討結果とこれまでに報告された事例から、QFT検査は同時再現性には優れているものの、日差再現性ではバラツキが認められることがあるため、同一被験者であっても再検査をすることで抗原刺激によるIFN- $\gamma$ 放出値が変動し判定結果が変動する可能性があることを念頭におき、結果の解釈を行なう診断の際には、臨床症状や患者背景を十分考慮した上で判断する必要があることが示唆される。

QFT-2Gの第2ステップでの反応温度を17、22、27°Cで変化させた場合、標準液希釈系列の最高濃度(およそ10IU/ml)までは反応温度が上がるにつれ濃度依存的に吸光度も上昇し、標準曲線から換算したIFN- $\gamma$ 値は反応温度の違いによって大きく変化することはなかった。一方、健康正常人の陽性コントロール刺激血漿検体は反応温度の違いによって吸光度に差が生じることはなく、このため各温度での標準曲線から換算したIFN- $\gamma$ 値は大きく変化した。ELISAは測定しようとする抗原(QFT-2GではIFN- $\gamma$ )と標識した抗体を抗原抗体反応させ、標識抗体と反応した成分だけを測定する方法であるため<sup>10</sup>、QFT-2Gでは検体中にIFN- $\gamma$ が試薬としてあらかじめ含まれている抗体量以上に存在する場合には抗体と反応できないIFN- $\gamma$ が残存し、この残存部分については検出ができない。つまり実際に存在するIFN- $\gamma$ 濃度よりも低い数値しか算出されないマイナス誤差が生じる。よってQFT-2Gによって算出される測定値は、低~中濃度領域での定量性はあるものの高濃度領域においての定量性には乏しいといえることができる。本来であれば高濃度検体に関しては、検体を希釈して再測定を行い定量値を算出することが正しい方法である。しかしながら判定基準値付近ではこのような現象は認められないため、定性検査としては十分実用に足るものである。結核予防会から発行されているQFTのQ&Aと使用指針の解説<sup>11</sup>では、QFT検査結果の解釈に際して判定区分のみでなくIFN- $\gamma$ 値までも吟味すべきことが求められており、また、QFT-2Gを含めたIFN- $\gamma$ 放出測定値が化学療法による活動性結核治療の治療効果判定に利用できるといった報告<sup>12,13</sup>やIFN- $\gamma$ 産生濃度が高いほど結核発病の危険性が高いという報告<sup>14</sup>のような、IFN- $\gamma$ 産生量値の有用性を示している報告もある。今回の検討結果から、IFN- $\gamma$ 値について定量的な解釈をしたいときには注意が必要な場合があり、

IFN- $\gamma$  高値データではその吸光度に注目すべきであると考えられる。また、QFT-2G 検査実施の際には、許容された範囲内の反応温度であっても常に一定の条件による実施が望ましいと考えられる。

QFT 検査は結核の接触者健康診断として取り入れ

られてまだ日が浅く、多くの研究者や検査者が知見を集積している段階であり、情報の周知が十分でない部分もあると思われる。今回の基礎検討から得られた情報を積極的に臨床の現場に還元していきたい。

## 文 献

- 1) 日本結核病学会予防委員会：今後のツベルクリン反応検査の暫定的技術的基準. 結核 81: 387-391, 2006.
- 2) Sorensen AL, Nagai S, Houen G, et al: Purification and characterization of low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 63: 1710-1717, 1995.
- 3) Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al: A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-6). Microbiology 144: 3195-3203, 1998.
- 4) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al: Specific detection of tuberculosis infection an interferon- $\gamma$ -based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med 170: 59-64, 2004.
- 5) 原田登之, 森亨, 穴戸眞司, 他: 集団感染事例における新しい結核感染診断法 QuantiFERON TB-2G の有効性の検討. 結核 79: 9637-9643, 2004.
- 6) 石川信克: 接触者検診の実施. 感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引き 改訂第3版 (石川信克監修), 26-31, 2008.
- 7) A.K.Detjen, L.Loebenberg, H.M.S.Grewal, et al: Short-term reproducibility of a commercial interferon gamma release assay. Clin Vaccine Immunol 16(8): 1170-1175, 2009.
- 8) Veerapathran A, Joshi R, Goswami K, et al: T-cell assay for tuberculosis infection: Deriving cutoffs for conversions using reproducibility data. Plos One 3(3): e1850, 2008.
- 9) Tamara T, Tavast E, vaisanen R, et al: Assesument of imprecision in gamma interferon release assay for the detection of exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Vaccine Immunol 17(4): 596-601, 2010.
- 10) 日高宏哉: 免疫学的定量法. 臨床検査法提要 改訂第32版 (金井正光編集). 53-64, 金原出版, 2005.
- 11) Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, et al: Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN- $\gamma$ -secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: Association with clinical disease state and effect of treatment. J Immunol 167: 5217-5225, 2001.
- 12) 鈴木公典: 「クオンティフェロン TB-2G の使用指針」の解説. QFT の Q & A と使用指針の解説 平成20年改訂版 (森亨監修), 25-26, 財団法人結核予防会, 2008.
- 13) Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N, et al: Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy. Clin Infect Dis 38: 754-756, 2004.
- 14) Higuchi K, Harada N, Fukazawa K, et al: Relationship between whole blood interferon-gamma responses and the risk of active tuberculosis. Tuberculosis 88: 244-248, 2008.