

平成25年5月25日

IGRA検査の理論と検査技術について

～「T-スポット.TB」を中心に～

原田登之

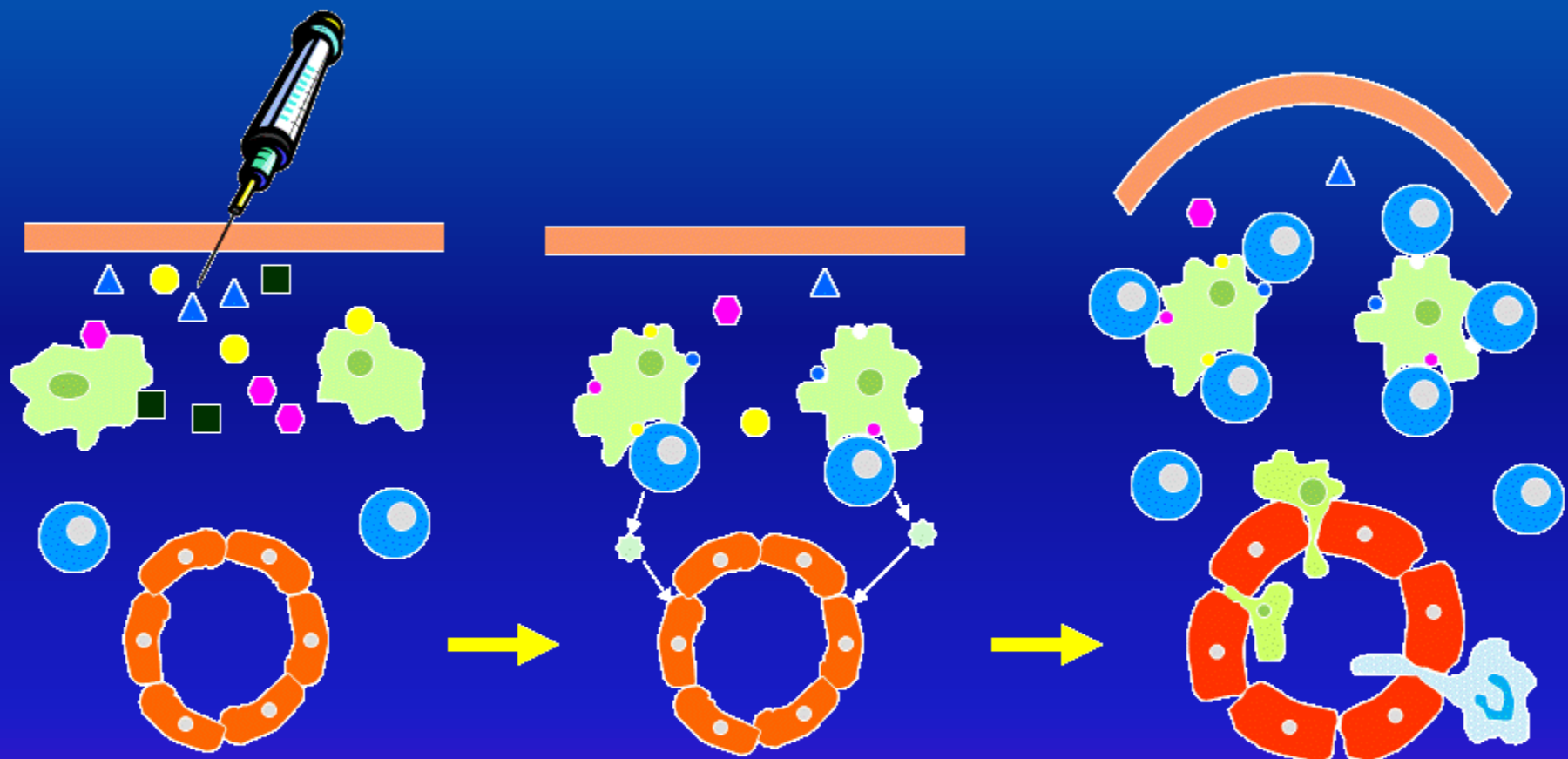
一般社団法人免疫診断研究所 所長
(結核研究所 技術顧問)

講義内容

1. ツベルクリン反応と結核菌特異抗原

2. T-スポット.*TB*検査

ツベルクリン反応の原理



PPD投与。
局所マクロファージ
によるPPDの取り
込みと消化。

マクロファージにより消化
されたPPDが抗原として
記憶T細胞へ提示され、
T細胞は種々のサイトカ
インを産生する。

炎症性細胞がサイトカイン
に誘導されPPD投与部位
に浸潤し、また体液が蓄積
する。このようにして硬結お
よび発赤が現れる。

ツベルクリン反応の問題点

1. PPDは結核菌培養液成分を部分精製したもので、数百種類もの異なる蛋白質を含む。その多くのものがBCGや環境中の抗酸菌と高い類似性を持つ。このため、BCG接種、あるいは非結核性抗酸菌感染により陽性反応を引き起こす(*M. tuberculosis*と*M. bovis*の遺伝子配列は99.95%同一であることが報告されている。PNAS, 100, p7877-7882, 2003)。
2. PPD注射や反応測定に技術的差がある。
3. 判定のため、被験者は2日後再び医師を訪れる必要がある。
4. ブースター効果を有する。

まとめ

ツベルクリン反応(ツ反)に用いるPPDはBCGや非結核性抗酸菌抗原と類似性が高いため、ツ反では結核感染とBCG接種、あるいは非結核性抗酸菌感染との区別が困難である。このようなツ反の持つ問題点を解決するためには、結核菌に特異的な刺激抗原を用いる必要がある。

結核菌特異抗原ESAT-6

1995年デンマーク国立血清研究所のP. Andersenらにより、結核菌感作マウスの記憶T細胞を刺激し、IFN- γ 産生を誘導する結核菌抗原が菌培養上清より同定され、さらに遺伝子がクローニングされた。

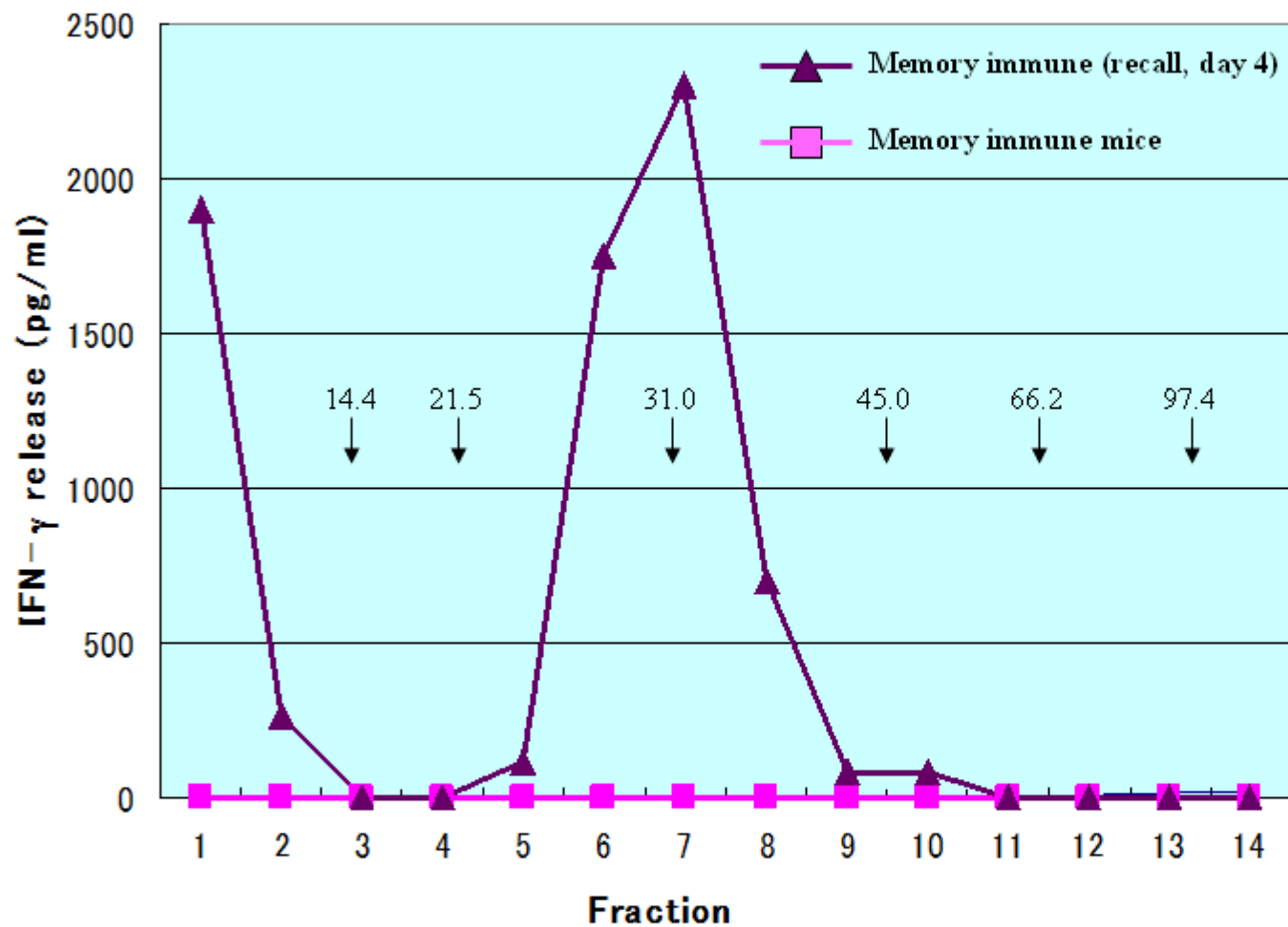
ESAT-6 (the early secreted antigenic target 6 kDa protein)

P. Andersen et al. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J. Immunol., Vol. 154, p3359, 1995.

A. L Sorensen et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity, Vol. 63, p1710, 1995.

1996年にESAT-6は、*M. bovis*には存在するがBCGでは欠落している遺伝子座RD1上に位置することが明らかになる。

Figure 7. Specificity of the memory effector cells reactivated during the initial phase of a secondary infection.



P. Andersen et al. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.*, Vol. 154, p3359, 1995.

CFP-10の発見

CFP-10 (10 kDa culture filtrate protein)

F.-X. Berthet, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*, Vol. 144, p3195, 1998.

R.L.V. SkjØt, et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect. Immun.*, Vol 68, p214, 2000.

ESAT-6/CFP-10を持つ抗酸菌類

Tuberculosis complex

M. tuberculosis

M. africanum

M. bovis

Environmental strains

M. kansasii

M. marinum

M. szulgai

M. flavescens

M. gastri

ESAT-6/CFP-10を持たない抗酸菌類

BCG substrains

Gothenburg

Moreau

Tice

Tokyo

Danish

Glaxo

Montreal

Pasteur

Environmental strains

M. avium

M. intracellulare

etc

まとめ

ESAT-6/CFP-10は、結核菌群と一部の非結核性抗酸菌には存在するが、全てのBCG亜株およびMACを含む大多数の非結核性抗酸菌には存在しない抗原である。さらに、これらの抗原は、抗原に感作したエフェクターT細胞よりIFN- γ 産生を強く誘導する生理活性を持つ。従って、これらの抗原でリンパ球を刺激し、エフェクターT細胞からのIFN- γ 産生を測定することにより、BCG接種および大部分の非結核性抗酸菌感染の影響を受けることなく結核感染が診断できる。

この原理を応用し、より特異度の高い結核感染診断法としてInterferon-Gamma Release Assays (IGRA)が開発された。

ESAT-6, CFP-10抗原の限界

1. 活動性結核と潜在性結核感染を区別できない

-区別するためには必ず他の臨床所見・検査結果が必要である

1. 「古い感染」と「新規感染」を区別できない

-感染リスクの高い状況では定期的な検査が望まれる

2. ESAT-6/CFP-10を産生しない状態(休止期)の結核感染は検出できない

-新たな抗原の発見が必要

講義内容

1. ツベルクリン反応と結核菌特異抗原

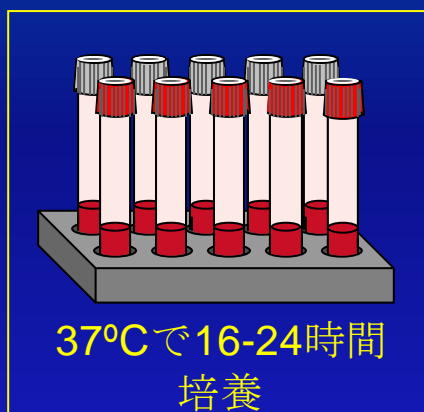
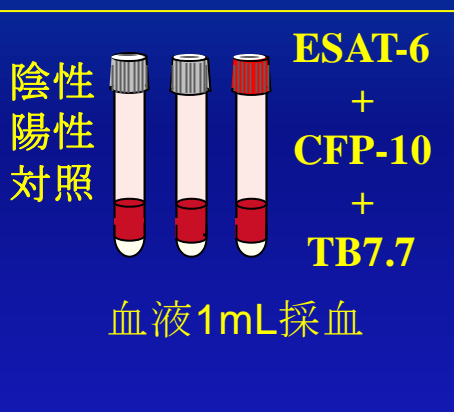
2. T-スポット.*TB*検査

T-スポット.TB検査とは

- T-スポット.TB 検査は、結核感染の診断を補助するInterferon-Gamma Release Assays (インターフェロン- γ 遊離試験)の一つである。
- QFT検査と共通点も多いが、多くの違いもある。

QuantiFERON[®]-TB Gold (日本における商品名) (QFT-Gold In-Tube)検査の図解

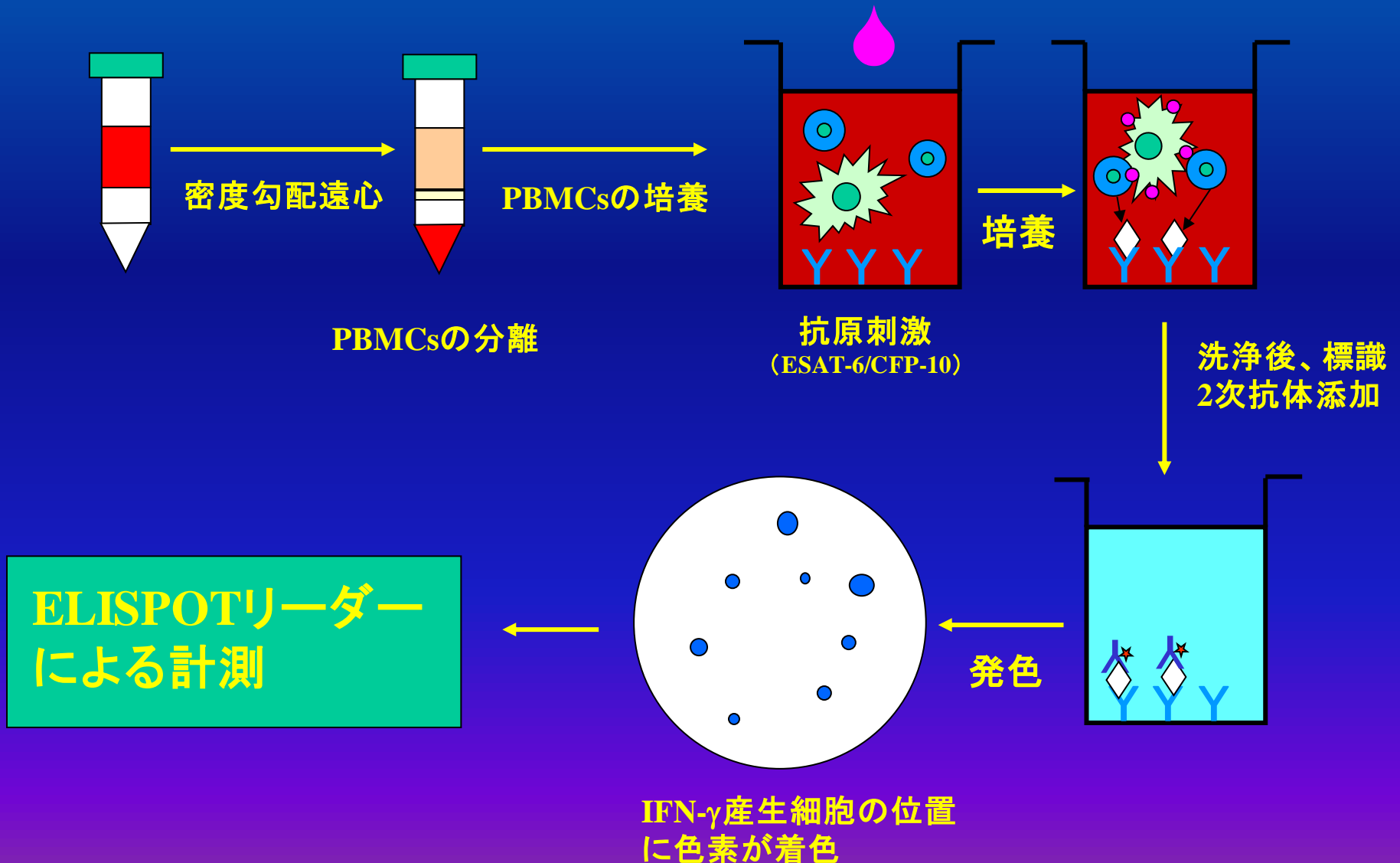
Stage 1: 血液培養と回収



Stage 2: IFN- γ ELISAと 解析



T-スポット. *TB* (ELISPOT) 検査の流れ



血液量が十分ある場合の血液重層法

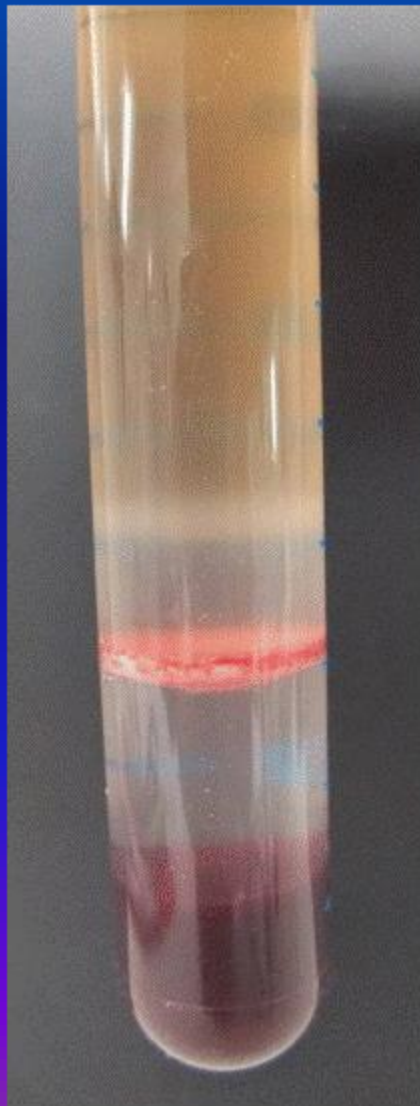


血液量が少量の場合の血液重層法

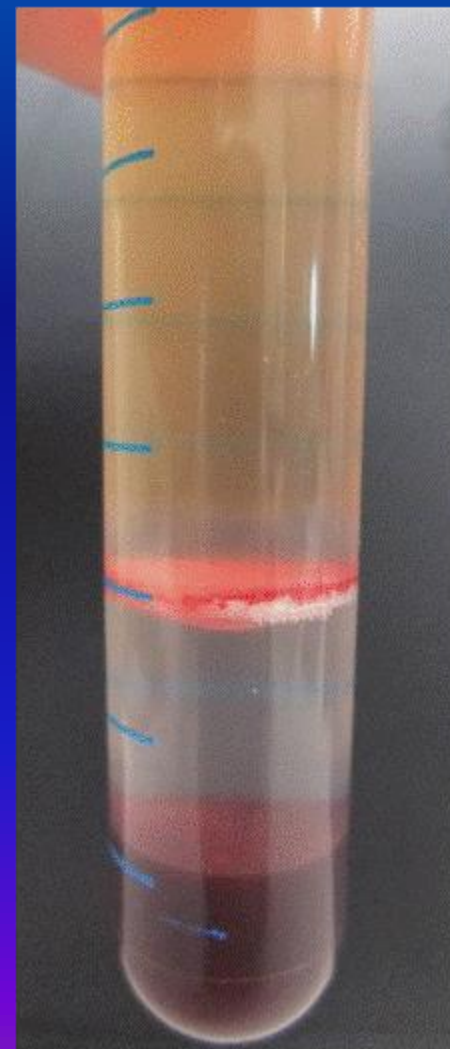


界面を乱
さない様
に注意深
く重層する。

分離されたPBMCs層



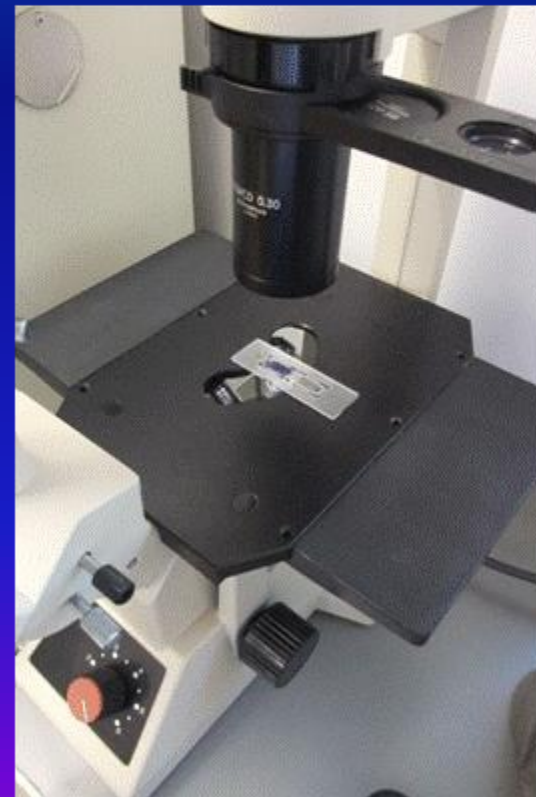
PBMCsの回収



細胞数の計測



機器による測定

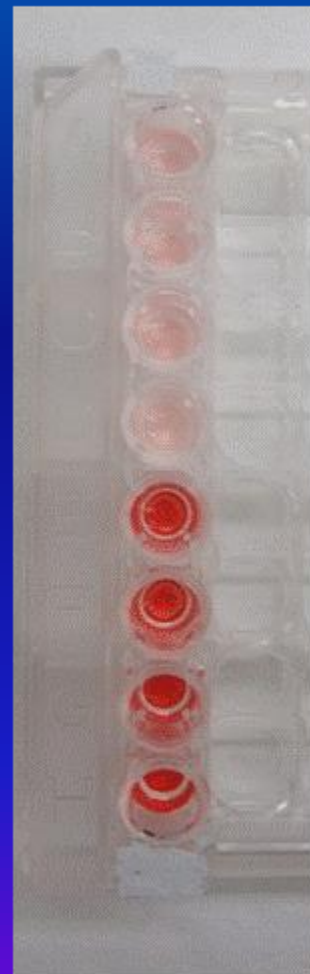


顕微鏡による測定

培養後の処理



プレート洗浄

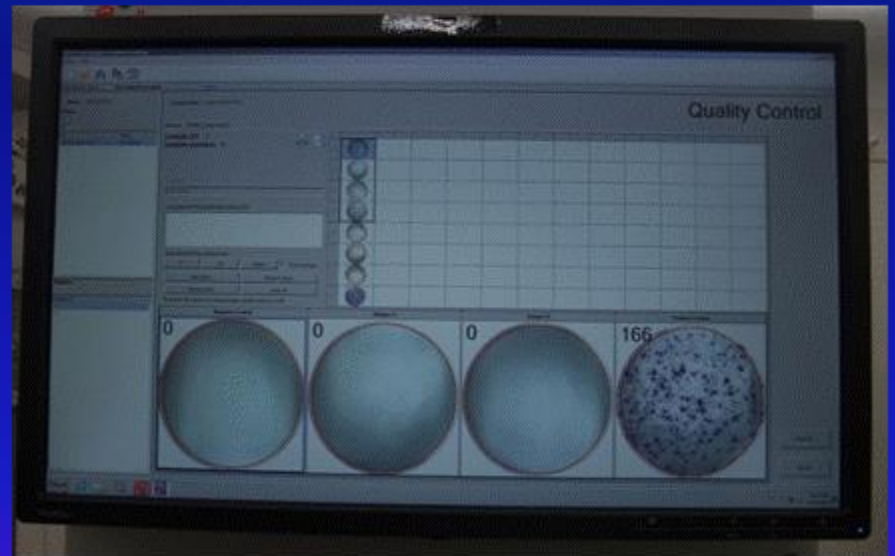
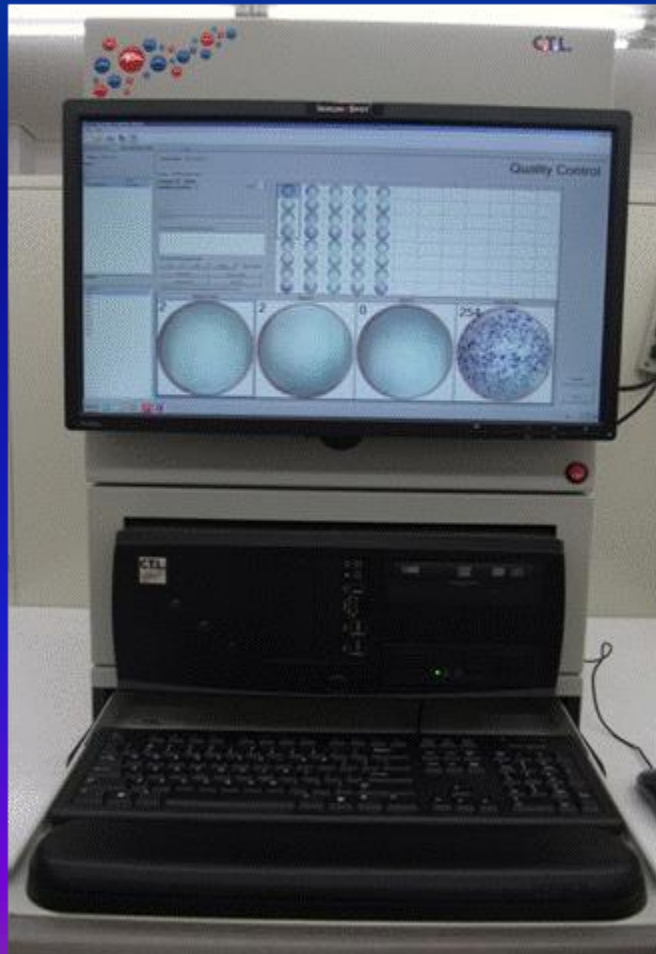


洗浄前

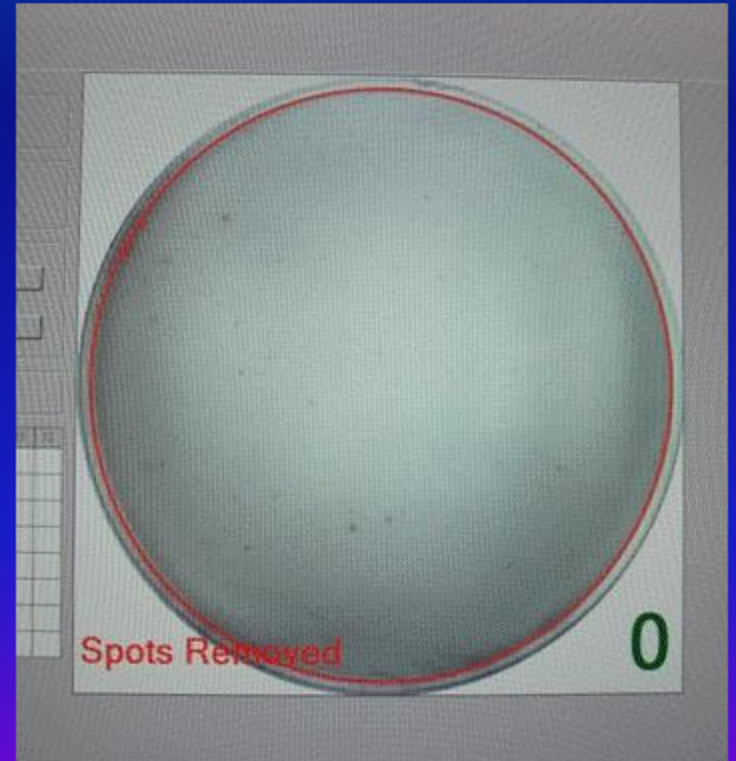
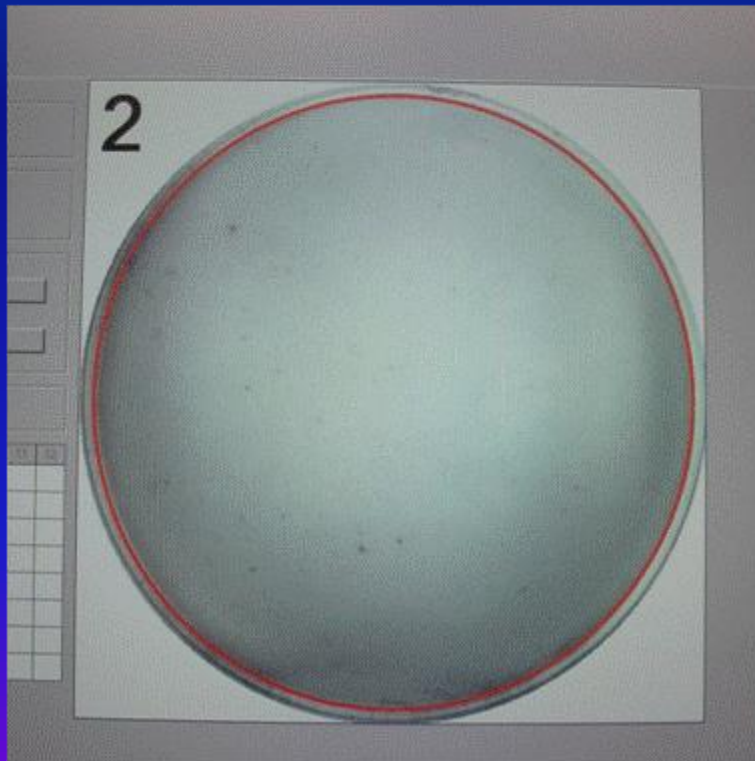


洗浄後

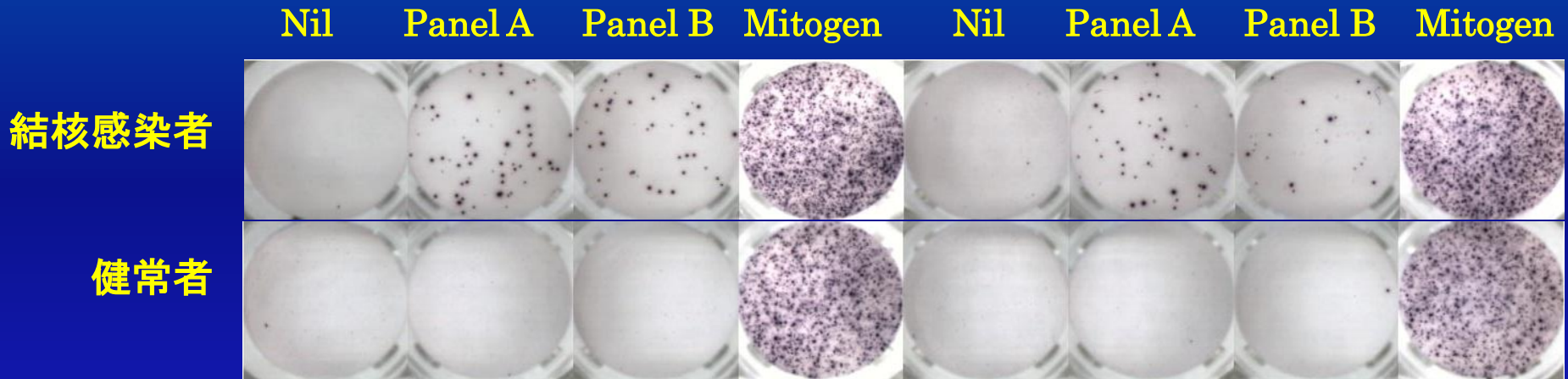
スポットカウンターによる計測



目視によるスポット数の補正



Tスポット.TB検査の例



- スポット1つが、特異抗原に反応したT細胞1個に相当
- 6個以上の細胞が反応していれば陽性となる

T-スポット.TB検査の原理

採血

- ヘパリン加採血管1本に採血(採血量は最低5mL)
 - ヘパリン加採血管であれば、ナトリウムでもリチウムでも可。いずれのメーカーでも可。
 - 採血量に対する正確に揃える必要はない。
 - 採血管内で抗原刺激を行う必要はない。

T-スポット.TB検査の原理

検体搬送

- 検体を検査室／検査センターへ搬送
 - 事前培養の必要なし
 - 室温にて保管
 - T-Cell *Xtend*試薬を用いれば、採血後検査開始まで32時間までの時間的猶予がある。搬送のために特別便を手配する必要がない。

QFT検査との類似点

- 結核の感染診断を行う。
- 血液検査である。したがって、ツ反のように結果判読のために検査機関を再訪する必要がない。
- RD1領域の抗原 (ESAT-6、CFP-10)によってT細胞の刺激を行う。これらは、結核菌への特異性が高く、100%近い特異度をもたらす。
- BCGや大部分の非結核性抗酸菌との交差反応がない

QFT検査との相違点

- 採血が簡単。
- 検体が検査室に入るまで、32時間の猶予がある。
- 検査における付加的工程がある。
 - PBMCsを洗浄する。
 - 免疫能を阻害するような物質を除去(顆粒球、薬剤等)。
 - 検体中に存在するIFN- γ を除去。
 - PBMCsを数え、検査に用いる細胞数を標準化
 - 検査が必ず同程度のPBMCs数で行われるよう調整することで、PBMCsの数の多寡によって結果が変動しない。
 - 免疫抑制にある患者についても十分な細胞数を補完。

IGRA検査の研究報告検証

感度

- 「感度」とは、感染者を正確に「陽性」と判断する尺度。
- IGRAの感度を求めるには、培養検査を対照として行う。
- Tスポット検査が最高の感度を持つことを示すメタアナリシスは多数存在している。
- 同じ被験者に対して、同時に検査を行った公正性の高い比較検査の結果は以下の通り:

培養陽性検査に対するIGRA検査の感度	Tスポット.TB	QFT-3G
Detjen et al Clin Infect Dis (2007)	92.8% (26/28)	92.8% (26/28)
Dominguez et al Clin Vacc Immunol (2008)	92.3% (36/39)	84.6% (33/39)
Goletti et al. PLoS ONE. (2008)	84.1% (58/69)	75.4% (52/69)
Chee et al., J Clin Microbiol (2008)	94.1% (254/270)	83% (224/270)
合計	92.1% (374/406)	82.5% (335/406)

IGRA検査の研究報告検証

特異度

- 「特異度」とは、感染リスクの低い者に対して正確に「陰性」と判断する尺度。
- 過去のメタアナリシスの中には、真に感染リスクの低い者に対して研究が行われていない者も含まれており、正確な特異度を示していない可能性がある。
- 同対象者に対して行った、最近の研究報告は以下のとおり:

感染リスクの低い者に対するIGRA検査の特異度	T-スポット.TB	QFT-3G
Higuchi et al IJTL (2012)	99.1% (110/111)	99.0% (96/97)
Mancuso et al AJRCCM (2011)	98.7% (1336/1354)	98.8% (1338/1354)
Total	98.7% (1446/1465)	98.8% (1434/1451)

Exclusion criteria of Healthy subjects

Higuchi et al IJTLD (2012)

1. Born in TB endemic countries.
2. Live in cities where TB incidences are more than 25 per 100,000.
3. Have lived more than 1 month in cities of foreign countries where TB is endemic.
4. Have abnormal chest X-ray observations.
5. Have had contact with TB patients.
6. Have TB patients among family members, friends, or acquaintances.
7. Have experiences working in places where TB infection is thought to be more likely, such as hospitals, prisons, the Self-Defense Forces, nursing homes, rehabilitation facilities, etc.

T-スポット.TBの判定基準(米国CDC)

判定	陰性コントロール	結核菌抗原	陽性コントロール
陽性	≤ 10 スポット	≥ 8 スポット	全て
判定保留	≤ 10 スポット	5、6、7 スポット	全て
陰性	≤ 10 スポット	≤ 4 スポット	
判定不可	> 10 スポット	全て	全て
	≤ 10 スポット	< 5 スポット	< 20 スポット

T-スポット.TBの判定基準(日本の添付文書)-1

1. 以下の計算式を用いて、①及び②を算出する。

$[(\text{パネルAウェルのスポット数}) - (\text{陰性コントロールウェルのスポット数})] \dots \textcircled{1}$

$[(\text{パネルBウェルのスポット数}) - (\text{陰性コントロールウェルのスポット数})] \dots \textcircled{2}$

2. 1で得られた①及び②の数値を用いて、以下の判定基準に従い結果を判定する。

- ①及び②の双方、或いは、①、②のいずれか一方が6スポット以上の場合：陽性
- ①、②の双方が5スポット以下の場合：陰性

ただし、以下の場合には「判定不可」と判定し、再度血液を採取して検査を行うこと。

- 陰性コントロールウェルのスポット数が10を超える場合。
- 陽性コントロールウェルのスポット数が20未満となる場合。

ただし、一部の患者のT細胞はPHA溶液に十分な反応性を示さず、スポット数が20未満となることがある。そのため、パネルAウェル又はパネルBウェルのどちらかが陽性結果を示した場合は、陽性コントロールウェルのスポット数に関わらず「陽性」と判定すること。

T-スポット.TBの判定基準(日本の添付文書)-2

判定上の注意

- 「判定基準」1. の手順に従い、①及び②を算出した際、双方のスポット数の最大値が5～7になった場合、検査結果は「判定保留」と考えられる。このような場合、「陽性」または「陰性」の判定は、検査結果としては有効であるが、数値が8以上となった場合、或いは、数値が5未満となった場合と比較して、結果の信頼性がやや低下する可能性がある。このような結果となった場合、再度血液を採取して検査を行うことが推奨される。

- 再検査の結果が再び「判定保留」となった場合、他の診断方法を用いるか、又は、臨床的・医学的症候や患者背景を考慮の上、医師の判断のもとで結核菌感染の状況を総合的に診断すること。

T-スポット.TBの判定基準(日本の添付文書)-3

判定	陰性コントロール	結核菌抗原	陽性コントロール
陽性	≤ 10 スポット	≥ 8 スポット	全て
陽性判定保留	≤ 10 スポット	6、7 スポット	全て
陰性判定保留	≤ 10 スポット	5 スポット	全て
陰性	≤ 10 スポット	≤ 4 スポット	
判定不可	> 10 スポット	全て	全て
	≤ 10 スポット	< 5 スポット	< 20 スポット

QFT-3GとT-スポット.TBの比較-1

	QFT-3G		T-スポット.TB	
	n	%	n	%
Specificity	110/111	99.1	110/111	99.1

基準値: QFT-3G 0.35 IU/ml以上→陽性
0.35 IU/ml未満→陰性

T-スポット6 spots以上→陽性
5 spots以下→陰性

QFT-3GとT-スポット.TBの比較-2

	QFT-3G		T-スポット.TB	
	n	%	n	%
Specificity	96/111	86.5	110/111	99.1

基準値: QFT-IT 0.35 IU/ml以上→陽性
0.35未満0.1 IU/ml以上→判定保留
0.1 IU/ml未満→陰性

T-スポット.TB 8 spots以上→陽性
5-7 spots→判定保留
4 spot以下→陰性

特異度の有意差: $p = 0.135$

日本におけるT-スポット.TB検査の臨床試験

感度: $78/80 \times 100 = 97.5\%$
(95%信頼区間: 91.3~99.7%)

特異度: $110/111 \times 100 = 99.1\%$
(95%信頼区間: 95.1~100%)

QFT-3G

感度: 93.7%

特異度: 93.8%

IGRA検査の研究報告検証

判定不可

Richeldi *et al* Chest 2009

検査が困難とされる対象群における検査能

- 120名の肝移植候補者
- 116名のHIV感染者
- 95名の血液疾患を有する者

	T-スポット.TB	QFT-3G
判定不可	13/369 (3.5%)	27/369 (7.3%)

“細胞性免疫の抑制による影響は、T-スポット.TBよりもQFT-3G検査の方がより大きな影響を受けた。；興味深いのは、QFT-3G検査の判定不可の事例の中には、ツ反、あるいはT-スポット.TB検査で陰性とはならなかったものもあることだ。QFT-3G検査で判定不可のものの中にも感染事例があることを示唆している”

Bergamini *et al* Pediatrics 2009

活動性結核、あるいは潜在性結核を疑われる子ども496名 (0-19歳, 平均11歳) に対し、1種類、あるいは2種類のIGRA検査を行った。

“T-スポット.TB検査と比べ、QFT-3Gにおける判定不可の比率は著しく高かった。”

判定不可の比率 (%)	T-スポット.TB	QFT-3G
子どもすべて	1.5%	16.4%
4歳未満の子ども	2.8%	27.7%

IGRA検査の研究報告検証

免疫抑制

Leidl *et al.*, ERJ (2009)

128名のHIV陽性患者に対してTスポット.TB検査、QFT-IT 検査とツ反検査を行った。

	HIV陽性 活動性結核患者	HIV陽性 非活動性結核患者
ツ反	-	42/49 (47.2%)
QFT-3G検査	13/19 (68.4%)	74/109 (67.9%)
Tスポット.TB検査	17/19 (89.5%)	59/109 (54.1%)

HIV患者において、CD4細胞数は以下との相関がみられた:

- QFT検査におけるIFN- γ 量
- ツ反の硬結

その反面、Tスポット.TB 検査の結果はCD4細胞数との相関は無かった

“HIV-1感染者については、免疫不全の度合いとツ反、QFT-3G検査における免疫反応とは高い相関がみられた。一方で、Tスポット.TB検査の結果は、CD4細胞数の減少によっては左右されなかった。”

T-Cell *Xtend*を用いた診断感度

Clinical Study

Maintenance of Sensitivity of the T-SPOT.TB Assay after Overnight Storage of Blood Samples, Dar es Salaam, Tanzania

Tuberculosis Research and Treatment
Volume 2012, Article ID 345290, 4 pages
doi:10.1155/2012/345290

Elizabeth A. Talbot,^{1,2} Isaac Maro,³ Katherine Ferguson,⁴ Lisa V. Adams,¹ Lillian Mtei,³ Mecky Matee,³ and C. Fordham von Reyn¹

TABLE 1: Overall agreement between TB culture and T-SPOT.TB.

		T-SPOT.TB		
		Positive	Negative	Invalid
Culture	Positive	60	2	1*
	Negative	1	2	0

* 1/66 (1.5%) of T-SPOT.TB results was invalid due to a high nil control result.

感度は96.8% (60/62: 95%CI; 88.8-99.6%)であることより、推奨温度で1晩保存された血液検体をT-Cell *Xtend*で処理した場合、通常のT-SPOT.TBの感度と同等であることが示された。

結論

- T-スポット.*TB* 検査は、QFT検査とは異なる特徴を持つ新たな IGRA検査である。
- T-スポット.*TB* 検査は、検査室において付加的な工程があるため、より安定した検査結果が期待できる。
- T-スポット.*TB* 検査は、感度に優れ、より多くの感染者の特定が可能となる。
- T-スポット.*TB* 検査は、採血にまつわる煩雑さが少ないため、運用が容易である。
- T-スポット.*TB* 検査は、採血後32時間検体が安定するため、運用が容易である。



一般社団法人免疫診断研究所

Research Institute of Immune Diagnosis (RIID)

【登録番号】福保医安第238号

〒190-0013

東京都立川市富士見町1-34-1 天野ビル301

TEL: 042-595-8868

FAX: 042-595-8867

URL: <http://www.riid.or.jp>

E-mail: info@riid.or.jp

RIIDのホームページ

The screenshot shows the RIID website homepage. At the top, the browser address bar displays 'http://www.riid.or.jp/'. The website header includes the RIID logo (a blue bird) and the text 'RIID 一般社団法人 免疫診断研究所 Research Institute of Immune Diagnosis'. To the right, contact information is provided: 'TEL 042-595-8868 受付時間：平日9時～17時' and 'FAX 042-595-8867 サイトマップ'. Below this are two buttons: '会員ページ' and '検査のお申し込み'. A horizontal navigation menu contains five items: 'HOME', 'RIIDについて', 'IGRA検査のご案内', 'よくあるご質問', and 'お問い合わせ'. The main content area features a large image of a child reaching for bubbles against a blue sky, with a green landscape in the background. Overlaid on this image is the text: '結核のない未来を実現するために RIIDは正確かつ高精度な IGRA検査を誠実にを行います'. Below the image, the section 'IGRA検査のご案内 GUIDANCE OF IGRA INSPECTION' is visible, with two sub-images showing laboratory equipment. On the right side, a sidebar titled '検査をご希望されます方へ' contains a large blue button for 'お申し込み' (Application) with the text 'インターネット・FAXよりお申し込みいただけます。', and a button for '会員ログイン' (Member Login). The bottom of the browser window shows the Windows taskbar with various application icons and the system tray displaying the time '21:36' and date '2013/01/09'.

RIID 一般社団法人
免疫診断研究所
Research Institute of Immune Diagnosis

RIIDはIGRA検査のパイオニアとして、法人理念である「誠実」に沿って
高精度のIGRA検査を行うIGRA検査専門の研究機関です。

TEL 042-595-8868 受付時間：平日9時～17時
FAX 042-595-8867 サイトマップ

> 会員ページ > 検査のお申し込み

HOME RIIDについて IGRA検査のご案内 よくあるご質問 お問い合わせ

結核のない未来を実現するために
RIIDは正確かつ高精度な
IGRA検査を誠実にを行います

IGRA検査のご案内 GUIDANCE OF IGRA INSPECTION

検査をご希望されます方へ

> お申し込み
インターネット・FAXより
お申し込みいただけます。

> 会員ログイン

> RIID

21:36
2013/01/09