

m 別冊 ASAHI medical

メディカル朝日

診断を中心とした、
国内における
結核の現状

T-スポット
検査に対する
世界的認識



T-スポット®.TBセミナー採録(一部)

2013年1月に大阪で開催されたT-スポット®.TB
セミナーにおける講演のうち、一山 智氏(京
都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学分
野教授)および原田登之 氏(一般社団法人免
疫診断研究所 所長)のご講演について採録し
ています。

開催: 2013年1月25日(金) 18:45~21:00
会場: ヒルトン大阪(大阪市)
主催: オックスフォード・イムノテック株式会社
共催: 株式会社エスアールエル

T-スポット®.TB

「診断を中心とした、国内における結核の現状」

京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学 臨床病態解析学講座 臨床病態検査学分野
教授 一山 智 氏



ご存じのとおり、日本は、先進諸国中で最も結核罹患率が高い国です。2009年には人口10万人に対する新規結核発症者数は194人です。



結核を取り巻く問題は大きく分けて2つあります。一つは、地域に偏在しているということです。例えば、大阪の西成区近辺では、アフリカのタンザニアやアフガニスタンなどに匹敵する、人口10万対100 200という罹患率となっています。また、これら地域だけが問題ということではなく、罹患率の高い地域で感染した人が、出身地に戻り感染源になることがあり、問題視されています。もう1つの問題は、耐性結核菌です。再発により結核菌が耐性を得て、その菌が既感染者にも感染し得るということを認識することが重要です。

よって、結核には正確な診断と治療が求められるわけですが、結核の正確な検査は、徐々に進歩を遂げてきております。特に、従来、発病者の診断において、結果が出るまで長い期間を要するものでした。しかし、固形培地から液体培地への進歩、そして、PCR法の進歩等により、1994年にCDC（米国疾病管理予防センター）が提示した検査結果報告までの目標期間を達成するところまで来ました。

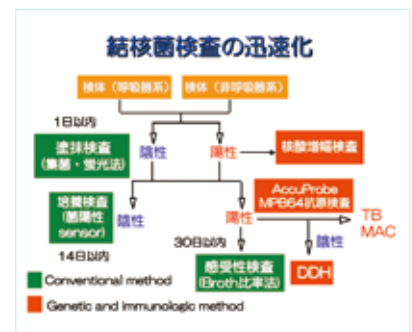
しかし、発病した人に対する診断方法の進歩に対し、結核菌に感染している人、すなわち潜在性結核患者については課題が残っています。潜在性結核患者を、いかに早く把握し、予防内服へと導くかということは、感染対策において重要な問題です。従来から用いられ

ているツベルクリン反応検査は、潜在性結核感染者の診断能が低く、昨今はIGRA検査のひとつであるELISA法を用いた検査が広く用いられ

ていますが、患者の免疫状態などにより偽陰性が出る可能性があることや、検査手順が煩雑であるなどの課題があります。

そんな中、2007年にLancet誌にELISpot法という免疫学的な手法を用いた診断法が発表され、潜在的結核感染者の診断が正確にできる可能性が示唆されました。

その研究が発展し、この度「T-スポット®.TB」という診断キットとして日本国内で販売が開始されたということです。今後、日本において広く活用され、データが蓄積されていくことを期待しております。



「T-スポット検査に対する世界的認識」

一般社団法人免疫診断研究所 所長 原田登之 氏

結核感染診断の歴史



ツベルクリン反応は、結核菌の発見者であるロベルト・コッホがワクチンとして作製したオールドツベルクリンの実験中に現われた激しい全身性反応をヒント

にして、ロシアの獣医師グッドマンや、アメリカの獣医師ピアソンらが結核牛の診断にオールドツベルクリンを用いた事が始まりです。コッホは、結核菌を栄養分（肉汁）を加えた培養液で培養して濃縮・濾過したオールドツベルクリンを作製し、ワクチンとして患者に与えたところ長時間にわたる高熱、嘔吐などの激しい全身症状が現われる事を観察しました。

ヒトではピルケの乱刺反応がツベルクリン反応の原型で、モロの貼布法、カルメットの結膜法、マントウの皮内接種法等が相次いで提唱され、簡単・正確かつ苦痛の少ないものを求めて改良が加えられながら100年以上結核感染の診断に使われてきました。

現在使われているツベルクリン（PPD）は1939年にシーパートによって作製された精製ツベルクリンですが、多糖体や核酸の含有も多く、更には多種類のタンパクが含まれており、低分子ペプチドに存在する結核菌活性因子の精製には至っていないためBCGや非結核性抗酸菌のタンパク抗原と類似性の高いものとなっています。そのため、結核菌に感染していなくても、ツベルクリンを接種した箇所、発赤や硬結等、結核感染の時と同様な反応が発現する場合があります。

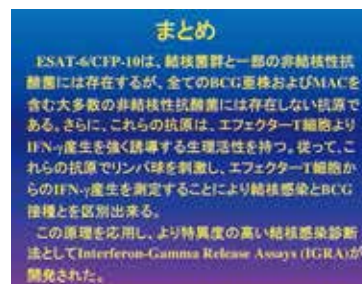
そこで、結核菌抗原とBCG抗原、非結核性抗酸菌抗原の

違いを解析し、どうしたら結核感染の診断を可能に出来るかという点が長年の課題でした。その解決法としては、結核菌だけに存在し、かつ何らかの特異的な反応を引き起こすような抗原を検査に用いれば、正確な診断ができることとなります。そしてそれを可能にする抗原（ESAT-6とCFP-10）がデンマーク国立血清研究所のチームにより報告されました。ESAT-6とCFP-10は、結核菌群と一部の非結核性抗酸菌には存在しますが、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す。さらに、これらの抗原は、結核に感染したヒトのエフェクターT細胞よりインターフェロン γ （IFN- γ ）の産生を強く誘導する生理活性を持ちます。したがって、これらの抗原でリンパ球を刺激して、エフェクターT細胞から産生されるIFN- γ を測定することで、結核感染とBCG接種との区別が可能になります。この原理を応用して、より特異度の高い結核感染診断法である、現在のIGRA（インターフェロン γ 遊離試験）検査が開発されました。

T-スポット®.TB検査の内容

T-スポット®.TB検査は、結核感染補助診断法であるIGRA検査の1種であり、T-スポット®.TB検査と既存のIGRA検査との間には、共通点と相違点がありますので、次に説明します。

T-スポット®.TB検査の手順は、全血からPBMC（末梢血単核球）を分離、回収、洗浄して、一定の数に調製して検査に用います。検査キットの96穴マイクロプレートの各ウエルの底は白いPVDF系の合成膜で出来てい



て、抗IFN- γ 抗体が既に付着した状態となっています。このウエルに、PBMCと抗原を添加し、湿潤タイプのCO2インキュベーターで37℃、16～20時間培養します。結核菌に感染していれば、培養中にエフェクターT細胞がIFN- γ を産生し、IFN- γ はその場で抗体にトラップされます。培養後、プレートを洗浄して細胞を洗い流し、二次抗体を加えて4℃で1時間反応させます。反応終了後に再洗浄し、酵素基質を加えるとIFN- γ が産生された処には黒っぽい点が出現します。この点一つひとつが、特異抗原に反応したIFN- γ 産生性のT細胞で、スポットと呼びます。スポット（黒点）は専用のリーダーで個数を数えます*。

1人分の検体に対して4つの刺激を行い、そのうち1つは陰性コントロールとして被験者自身の非特異的炎症反応の有無を検証します。もう1つは陽性コントロールで、被験者の細胞性免疫応答の能力が正常にあるかを確認する刺激です。更に、結核菌特異的抗原であるESAT-6とCFP-10の2種類の抗原で別々に刺激します。

ESAT-6とCFP-10いずれかの刺激のスポット数から陰性コントロールのスポット数を引いた数が日本の添付文書では6個以上出ていれば、陽性という結果になります。しかし米国CDCではグレーゾーン（判定保留）を設けており、8個以上を陽性としています。一般社団法人免疫診断研究所はCDCのクライテリアに準じて判定保留域を設け、8個以上を陽性とし、5個を陰性判定保留、6～7個を陽性判定保留、4個以下を陰性としています。

T-スポット®.TB検査に必要な採血量は添付文書では6ccへパリン管1本以上とされています。へ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能です。採血後、特にその場で行う作業はなく、キチンとした温度管理（18℃～25℃）の下で32時間内に指定検査所へ搬入します。検体は、採血後32時間以内であれば検査が可能です。特別便を手配する必要もなく、例えば採血後宅配便で検査所に送り、翌日検査所に到着しても、採血後32時間以内であれば検査は十分可能です。

*スポット数の計測については、リーダーの他、拡大鏡、デジタル顕微鏡等を用いることもできます。

既存のIGRA検査との類似点としては、結核感染診断検査を血液材料で行う。ツ反のように結果判読のために48時間後に検査機関を再訪する必要がない、RD1領域の抗原（ESAT-6とCFP-10）でT細胞刺激を行うため、健常者で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（*M. kansasii*等、ごく少数の非結核性抗酸菌を除く）等、です。

一方でT-スポット®.TB検査の特徴として、以下の様なものがあります。

T-スポット®.TB検査は採血が非常に簡単。採血量は厳密に採血する必要は無く、添付文書には6ccへパリン管1本以上あれば検査可能とされています。

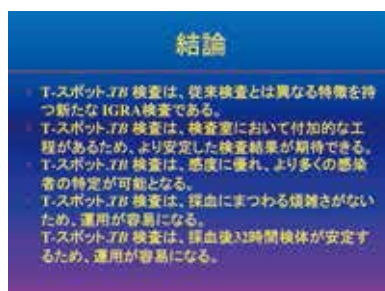
採血後32時間まで検査可能なため、遠隔地からの検体も検査可能。

PBMCを分取精製する際に洗浄するため、免疫機能を阻害する物質を除去できる。検体中に存在するIFN- γ のバックグラウンドを除去できる。

必ず同濃度のPBMC数で検査が行われるよう細胞数を調製するため、結果はPBMC数の影響を受ける事はない。また、免疫抑制状態にある被験者についても十分な細胞数を確保できるので、検査のバラつきは極めて少ない。

これらの特徴からわかるように、T-スポット®.TB検査は従来のIGRA検査とは異なる特徴を持つ検査です。T-スポット®.TB検査は、検査所において専門的な技術工程を行うため、免疫脆弱者の集団でも安定した検査結果が期待でき

ます。採血にまつわる煩雑さがなく採血後32時間まで検査可能であるため、搬送に丸一日以上要する様な遠隔地でも運用が可能です。



【製品に関するお問い合わせ先】 **オックスフォード・イムノテック株式会社**
川崎市高津区坂戸3-2-1 かながわサイエンスパーク
TEL. 044-819-8088 FAX. 044-819-5008
e-mail: contact-jp@oxfordimmunotec.com http://www.tspot-tb.jp