

b : 小児結核症例や事例の報告は最近の5年間で170件報告されており、年平均34件であった。複数報告している施設が10施設存在し、このような施設を結んで、小児結核患者診療に関するネットワーク形成につなげる可能性が示唆された。

3) 医学中央雑誌掲載「小児結核」
論文数調査

E. 結論

今後、本格的に小児結核患者診療に関する実態の交流、課題の整理を開始する前段階の作業として診療経験の豊富な施設間の交流を行った。その結果、今後本格的な診療実態の交流から小児結核患者診療機関ネットワークを形成していくことが当面の緊急課題であることが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当するものなし

I. 参考資料

- 1) 厚生科学研究 森・高松班
2004年3月6日 「小児結核の実態と臨床像に関する研究」岡田賢司
国立療養所南福岡病院小児科
- 2) 当院における小児結核診療の現況('04/03/06) 徳永修、井上康広、宮野前健 国立療養所南京都病院小児科

分担研究課題 小児結核の実態と臨床像に関する研究 資料5

小児結核の実態と臨床像に検討に関する研究

国立療養所 南福岡病院 小児科 岡田 賢司

1. 福岡県における結核患者発生状況と当科における小児結核患者の動向

福岡県内の結核新登録率年次推移では、県内の発生率は人口10万人あたり約33で、全国平均と同じ発生率となっている。年次別発生数はやや減少傾向にある。図2に1974年から2003年までの当院における小児結核患者数を図3に示す。

2. 学校検診の問題点

学校における健診問診票と当科の学童・生徒結核患者発見動機では、

1. 本人の結核罹患歴 2名
2. 本人の予防内服歴 1名
3. 家族の結核罹患歴 7名
4. 高蔓延国での居住歴（過去3年以内など）（0）
5. 自覚症状（長引く咳や痰が2週間以上など） 8名：胸痛3名
6. BCG接種歴（未接種者）（0）
7. その他：2名
 - 1) 小学1年生のツベルクリン強陽性（無症状）で胸部X線で浸潤影あり
 - 2) 中学1年生のツベルクリン強陽性（無症状）で胸部X線で空洞あり

3. 予防接種ガイドライン改定

今回改定され、2004年1月市町村に配布されている予防接種ガイドラインではBCGの接種部位は、上腕伸側中央の三角筋下端部 予防接種間違い防止の手引きでは上腕外側となっており、一部の地域で質問が出されている。

4. 小児結核ネットワーク

各都道府県で小児結核患者が発生したとき、どの医療機関でどのように診断・治療を行うかのまとまった情報がない。国立病院・国立療養所小児科における呼吸器・感染症グループ（川崎・岡田 平成12年）で○呼吸器感染症外来患者数○呼吸器感染症入院患者数○小児結核患者数○治験参加、研究グループ参加の希望などは調査している。このネットワークは国立病院・国立療養所だけであり、小児結核の診療実績の多い東京の清瀬小児病院や大阪の羽曳野病院は入っていない。本研究で、初めて小児結核のアンケート調査が行われる。国内での小児結核診療の実態把握をもとに都道府県の結核・感染症課と小児呼吸

器・感染症グループのネットワークを生かして都道府県別小児結核診療病院一覧表の作成をしていきたい。

図 1 結核新登録罹患率推移

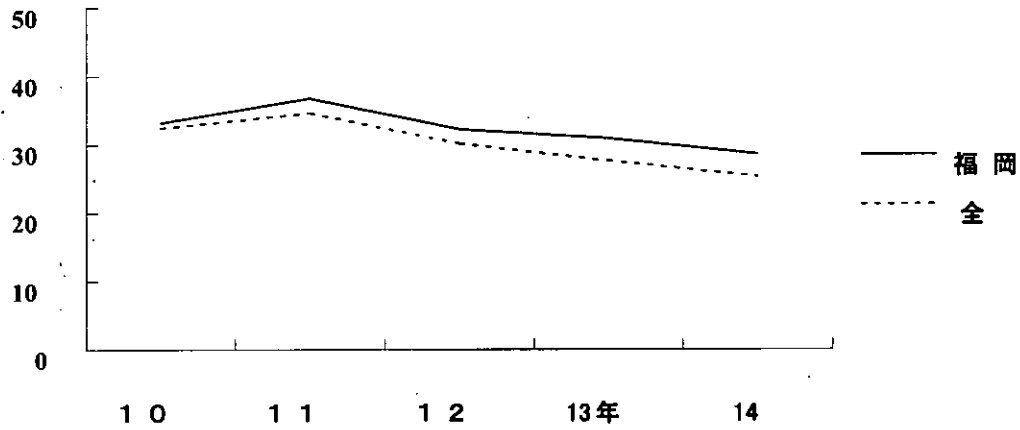
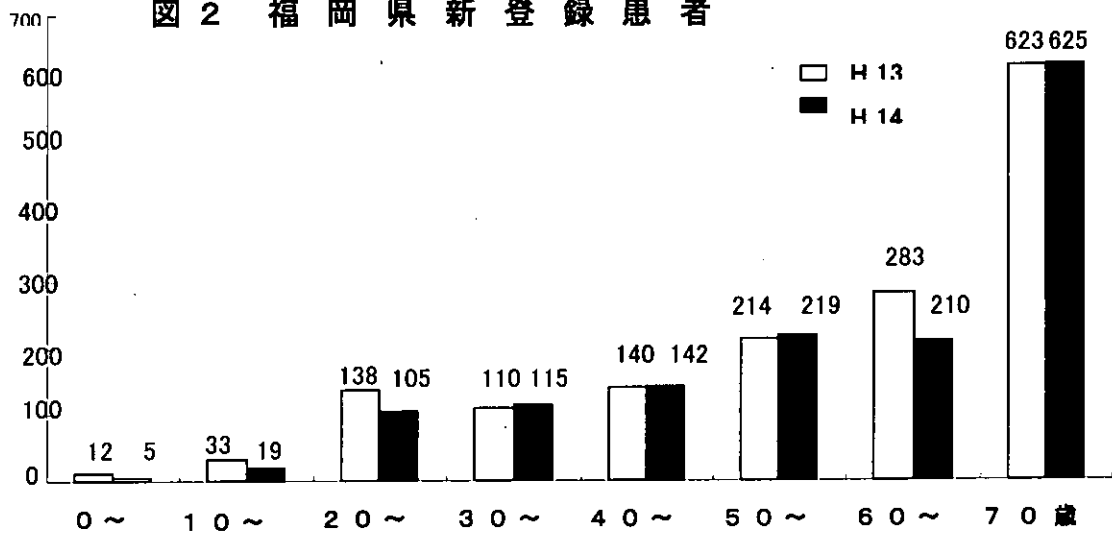
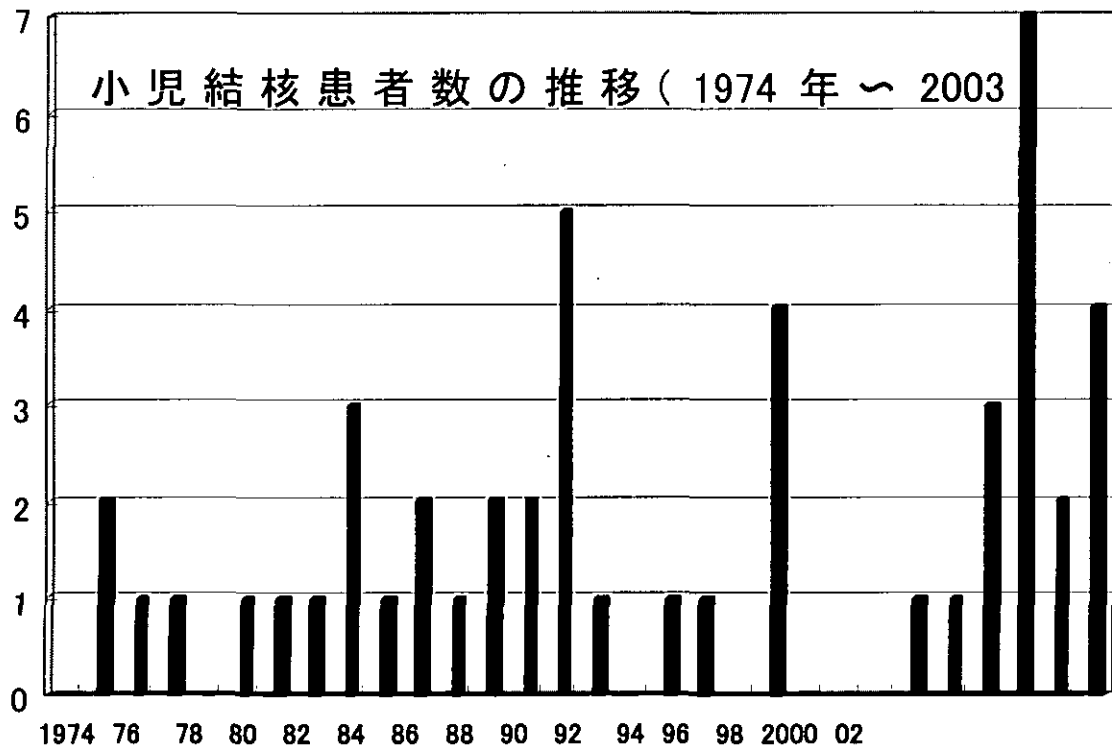


図 2 福岡県新登録患者



(人)



国立療養所南福岡病院小児科

厚生労働科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

結核感染の診断技術の確立に関する研究

分担研究者 原田登之 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター
免疫検査科 科長

研究要旨

確実な治療とならんで、今後の結核対策の焦点のひとつは結核発病防止にある。感染の機会が小さくなったことで BCG 接種による発病防止の利益は限られているが、既感染者に対する発病防止は人口の 20% 近くが既に感染している日本においてはその効果は重要な意義がある。ところが日本ではそのための「化学予防」が普及していない。その大きな理由は、広範な BCG 接種によってツベルクリン反応による感染の診断に信頼性がないからである。BCG 既接種者における信頼性のある結核感染の診断は長い間の結核対策上の深刻な課題であった。

近年結核菌に特異性の高い蛋白が発見され、その生合成が可能になった。またこれを用いて感作リンパ球を刺激し、そのインターフェロン γ 応答を簡便に定量するキットが開発された。本研究はメーカーの協力によってこのキット (QuantiFERON-TB 第二世代TM) の診断パフォーマンスを評価する機会を得た。研究は一部平成 14 年度厚生労働科学研究(森班、最終年度)からの継続分をあわせて以下の設計で行われた。①未治療結核患者対健常者における感度、特異度の観察、②医療職員における陽性率の観察と反応の妥当性の検討、③集団感染事例における陽性率の観察と反応の妥当性の検討、④高齢者における反応の検討、⑤一般住民における反応の検討。

結核患者を「結核感染」のゴールドスタンダードと見なして、このテストの感度は 89%、また健常者(ほぼ全員が BCG 既接種者)の陰性率から特異度は 98% となった。結核患者を取り扱う機会のある医療期間の職員(大半が看護師)の検査では、年齢別に見た陽性率は一般住民における結核既感染率をあまり変わらないが、業務上の結核曝露歴のある職員では陽性率が高かった。集団感染事例では、対象者の半数が陽性になるようなケースもあり、接触程度別に本法での陽性率に明瞭な差があることなどからも、本法陽性が最近の感染(潜在感染)をよく反映することが支持される。また従来のツベルクリン反応検査による便宜的な「マル初」基準では既感染と判定される者が陰性となっており、無駄な予防内服指示の省略が大幅に可能となることが示唆された。高齢者の観察では 70 歳代、80 歳代、90 歳代になるにつれて陽性率が低下し、加齢による細胞免疫の減弱がツベルクリン反応におけると同様に見られた。一般住民では、年齢別に見た陽性率は推定される既感染率よりもかなり低く、また結核有所見者においても陽性率は 30% 程度であった。これは古い感染では反応性の減弱が進行するものと考えられ、その程度と経過については今後さらに研究する必要がある。

この研究は集団感染対策に実用化がもっとも切実に待たれているものであり、また医療従事者の健康管理、そして中高齢者を含む医学的ハイリスク者の化学予防のためにも有用性は大きく、今後早急にその診断パフォーマンスの全容を明らかにし、その最も効果的な

利用方法を確立する必要がある。

同時に少量の血液でも検査が可能な方法(小児向け)の開発をはじめ、本法を利用者にさらに優しいものに改良する開発を行わなければならない。

A. 研究目的

BCG既接種者における信頼性のある結核感染の診断は長い間の結核対策上の深刻な課題であった。

近年結核菌に特異性の高い蛋白(ESAT-6およびCFP-10)が発見され、その生合成が可能になった。これを用いて感作リンパ球を刺激し、そのインターフェロン γ 応答を簡便に定量するキット(QuantiFERON-TB 第二世代、以下QFT)が開発された。本研究はこれを日本人の様々な集団に用い、診断特性を観察することを目的として行われた。この規模でこのような試験が行われるのはこれが世界で始めてである。

B. 研究方法

研究は一部平成14年度厚生労働科学研究(森班、最終年度)からの継続分をあわせて以下のように行われた。

- 1) 未治療結核患者対健常者における感度、特異度の観察。全国5病院の結核患者と4施設の看護学生に対して本法を用いた。
- 2) 医療職員における陽性率の観察と反応の妥当性の検討。結核予防会複十字病院の職員を対象としてQFTを行い、既往歴等と対比した。
- 3) 集団感染事例における陽性率の観察と反応の妥当性の検討。外国人労働者の多い職場での患者発生、若年者の多い専修学校における集団感染、および患者の多発があった精神病院の患者についてQFTを見た。
- 4) 高齢者における反応の検討。老人ホーム入居者について検査した。
- 5) 一般住民における反応の検討。群馬県市、農村の住民に検査し、既往歴・胸部X線所見と対比した。

4. 倫理面の配慮

患者、健常者を問わずすべての被験者に書面で説明による承諾をとりつけた。また結果の秘匿について注意した。

<研究協力者>本分担課題は以下の協力を得て行われた。樋口一恵・関谷幸江・御手洗聡・宍戸眞司(結核予防会結核研究所)、露口泉夫・高嶋哲也(大阪府立羽曳野病院)、山岸文雄・佐々木結花(国療千葉東病院)、川辺芳子(国療東京病院)、重藤えり子(国療広島病院)、坂谷光則・岡田全司、井上義一・鈴木克洋・露口一成(国療近畿中央病院)、長尾啓一(千葉大学)、鈴木公典(結核予防会千葉県支部)、中島由槻(結核予防会複十字病院)、長坂祐二(三重県四日市保健所)、Jim Rothel (Celestis)。

C. 研究結果

1) 結核患者と健常者における観察

感染の指標としては「未治療の菌陽性結核罹患状態」とし、参加5施設(国立近畿中央病院、大阪府立羽曳野病院、国療千葉東病院、国療東京病院、結核予防会複十字病院)の結核患者118人(平均年齢54.3歳)を対象とし、また未感染の集団としては新入学の看護学生(宮崎県立看護大学、国立広島病院附属看護学院、国立近畿中央病院附属看護学院、千葉大学医学部看護学部)220人を対象とした。

測定値のROC分析から偽の陽性・陰性を最小にするインターフェロン γ 量0.35IU/ml(ESAT-6、CFP-10のいずれかに対して)をカットオフとして陽性率をみると、結核患者では89%、健常者では98%となった。それぞれ感度、特異度を意味する。結核患者では発赤で見たツベルクリン反応陽性は

90%、また米国式に硬結 5mm 以上を陽性としてみると 82%であった。ツベルクリン反応群 (0-4mm、5-9mm、...) と陽性率の関係を見ると、ツベルクリン反応が強いほど陽性率が有意に高くなる。年齢別には明らかな陽性率の差は見られない。

また看護学生ではツベルクリン反応陽性率は 92%、30mm 以上者は 35%に達していた。つまり QFT は BCG 接種によるツベルクリン反応の影響を全く受けないことが確認された。QFT 陽性者はツベルクリン反応が発赤 20~30mm に 3 人、70mm で 1 名であった。

2) 医療従事者における観察

結核予防会複十字病院の職員 (大半が看護師、平均年齢 41.4 歳、総数 332 人) についてみると、全体の陽性率は 10%、年齢別に見ると 30 歳未満、30 歳代、40 歳代、50 歳代でそれぞれ 2%、4%、9%、20%となっており、60 歳代では 33%に達する。この陽性率は森による一般住民における結核既感染率の推定値とほぼ一致する。

QFT 陽性に関連する要因をみるための多変量解析では、年齢はもちろんであるが、複十字病院勤務年数も陽性率に有意の関連がみられる。ツベルクリン反応との関連を見ると発赤 80mm 以上のような極端に反応の強い群では QFT 陽性率も高いが、それ以下のツベルクリン反応群では、反応の強さと QFT 陽性率の間に関連はない。

3) 集団感染等事例での観察

①ベトナム人研修生を抱えた職場で起こった患者発生に伴う検診において QFT をみた。曝露のあったベトナム人職員 22 人、日本人職員 16 人の QFT 陽性率はそれぞれ 27%、11%であり、この場合は患者への曝露以前に、日本とベトナムの一般人口における結核蔓延の程度がよく反映されているものと考えられる。

②某専修学校の講師が結核を発病した際にこの結果を接触者 (生徒、平均年齢 20.5 歳) でツベルクリン反応強陽性の者に対して

QFT を行った。この際、特に初発患者と濃厚な接触者があった群 (ハワイへの研修旅行に同行した)、それ以外の群に分けて観察したところ、前者では陽性率 44%で後者の 7%に比して明らかに高く、疫学的な感染リスクの違いがよく反映されている。

③結核患者が多発している某精神病院において患者および職員に対して検査を行った。その結果、陽性率は患者 32.4%、職員 7.5%で患者で圧倒的に高かった。大変両解析をすると、陽性率に有意の関連があるのは、年齢、病棟 (最も結核が多く出ている病棟のオッズ比 13.2、その次の病棟 4.5)、患者 (職員に対してオッズ比 11.9)、年齢(10 歳ごとにオッズ比 1.9)等となっており、これも陽性と感染の関連を強く支持する。

4) 老人における反応

ある老人施設入居高齢者 61 人 (平均年齢 79.9 歳) について本試験を行った。全体の陽性率は 26%であったが、80 歳未満 34.5%、80~89 歳 23.8%、90 歳以上 9.1%となっており、超高齢者における免疫抑制ないし感染からの期間の経過による免疫応答の低下がみられる。

5) 一般住民における反応

40~69 歳の受診者 1,565 人について調査が完了した。結核感染に対する通常の判定基準 (ESAT-6、CFP-10 の少なくともいずれかに対する数値が 0.35 以上) による QFT 陽性率は全体で 7.1%であった。これは対象者の年齢構成から推定される日本人の既感染率 (1973 年、78 年の沖縄結核実態調査におけるツベルクリン反応検査成績に基づき森が推定) 30.6%に比して明らかに低い。年齢階級別に見ると 40~49 歳 3.1% (一般人の推定 8.5%)、50~59 歳 6.0% (同 22.8%)、60~69 歳 9.8% (同 47.5%) であり、いずれの年齢においても推定よりもかなり低い。胸部 X 線所見を陳旧性結核確実度別に 3 段階に分け、QFT 陽性率をみるとより確実例で陽性率が高いが、いずれの年齢階級においても陽性率は 30%どまりで、かなりの偽

陽性がみられた。結核治療歴有無についても同様であった。QFT 陽性の判定基準を 0.05 まで引き下げても陽性率はたかだか 14% 止まりであった。このことから、QFT は感染後時間の経過と共にかなり応答は低下するものと考えられた。

D. 考察

このように QFT は、BCG 接種の影響を受けない結核感染の診断方法として良好なパフォーマンスを示し、有望な方法である。その特異性はもちろんのこと、感度についてもツベルクリン反応に劣らない。さらにこの方法の有利な点はツベルクリン反応のブースター現象のように検査の生体影響がないこと、被験者に 2 回受診を求めないこと、再現性が高いこと、大量処理が可能なこと、等が挙げられる。反面、経費が高いこと、採血が必要で、しかも即日処理する必要があること、技術的に煩瑣で技量を要すること、などが弱点としてあげられる。

当面、この検査法の最も効果的な利用方法について検討し、合意形成がなされる必要がある。たとえば接触者検診では、結核感染を疑われる人に対してまずツベルクリン反応検査を行い、発赤が 20mm 以上の者に本検査を行うとか、また個別のリスク検討（免疫抑制剤の使用にあたっての）ではツベルクリン反応検査なしに直ちに本検査を行う、など。医療従事者の採用時の二段階ツベルクリン反応検査は本検査に取って代わられるであろうが、その場合は予備的にツベルクリン反応検査を行い、発赤 10mm 以上に本検査を行うなども考えられる。いずれにせよ、この検査が適切に用いられるようになれば、接触者検診は化学予防の実践は大きく様変わりすることになるであろう。

しかしそのパフォーマンスに関して、今後は以下のような点をさらに明らかにする必要がある。これらの研究と並行して使用

経験を深めることによってこの検査が広くより効果的に用いられるようになるであろう。

① 結核の治癒所見のある人、遠い過去に感染を受けた人での反応

一般住民ににおける我々の観察、遠い過去に結核感染を受けた者においては応答が弱くなっている可能性がある。その減弱が具体的にどのように進行するのか、胸部 X 線所見との関連はどうか、など。

② 感染後の反応の推移、陽転時期、治療との関連

感染後、本検査で陽性と判定されるまでの時期について、ツベルクリン反応と同じと考えるのか否か、また治療の影響についても様々な見解や観察がある。

③ 反応強度別のその後の発病リスク

ツベルクリン反応で見られているように、感染と判明したときのインターフェロン γ 応答の強さとその後の発病リスクとの間にどのような関連が見られるのか。

④ CFP-10 と ESAT-6 の反応における特異性

CFP-10 と ESAT-6 に対するインターフェロン γ 応答はそれぞれによって微妙に異なっており（それ故に両者を組み合わせてもちいることが有用になる）、それぞれ異なる免疫機序を反映している可能性がある。

⑤ より少量の血液での検査の可能性など

現在のところでは本検査には血液 5ml が最低限必要とされている。乳幼児から 5ml の血液を採取することは、ときとして困難である。検査方法の改良については、他にも血液採取と同時に抗原刺激が行えるような、抗原を封入した採血管の使用（第 3 世代 QFT として治験中）なども期待される。

E. 結論

日本のように BCG 接種が広範に行われている国・地域で結核感染の診断を正確に行う上で、特異抗原をもちいた全血刺激によるインターフェロン γ 応答を定量する方

法 (QFT) は感度、特異度ともに優れた方法であり、実用化されるべきものと考え。より詳細な診断特性について今後さらに研究を重ねる必要がある。

F. 健康危機情報

とくになし。

G. 研究発表

- 1) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Okada M, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, Mazurek GH, Tsuyuguchi I. Specific Detection of Tuberculosis Infection with an Interferon- gamma Based Assay Using New Antigens. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2004 Apr 1.
- 1) 原田登之、樋口一恵、関谷幸江、御手洗聡、森 亨、川辺芳子、山岸文雄、佐々木結花、高嶋哲也、露口泉夫、重藤えり子、長尾啓一、鈴木公典、鈴木周雄、木藤 孝、Jim Rothel : 新規結核感染診断キットの評価. 第 78 回日本結核病学会総会、倉敷、2003. 4
- 2) 樋口一恵、原田登之、関谷幸江、御手洗聡、山岸文雄、佐々木結花、川辺芳子、高嶋哲也、露口泉夫、森 亨 : 結核菌特異抗原に対するヒトリンパ球の反応. 第 78 回日本結核病学会総会、倉敷、2003. 4
- 3) 関谷幸江、樋口一恵、原田登之 : PZA 誘導体に対する抗菌効果の評価. 第 78 回日本結核病学会総会、倉敷、2003. 4
- 4) 樋口一恵、原田登之、御手洗聡、関谷幸江 : 結核菌特異抗原を用いた結核診断法-接触者における TST との比較-. 第 143 回日本結核病学会関東支部会・第 154 回日本呼吸器学会関東地方会合同学会、東京、2003. 5
- 5) 原田登之、樋口一恵、関谷幸江、御手洗聡、宍戸眞司、森 亨、露口泉夫、高嶋

哲也、山岸文雄、佐々木結花、川辺芳子、重藤えり子、坂谷光則、岡田全司、長尾啓一、鈴木公典、Jim Rothel : 結核菌抗原 (ESAT-6/CFP-10) を用いた結核感染診断法. 第 29 回結核・非定型抗酸菌治療研究会、東京、2003. 6

- 6) 原田登之、樋口一恵、関谷幸江、御手洗聡 : 結核菌抗原 (ESAT-6/CFP-10) に対するヒトリンパ球の反応. 第 31 回日本臨床免疫学会総会、東京、2003. 10
- 7) Use of 2nd generation whole blood IFN-gamma assay measuring responses to CFP-10 and ESAT-6 to detect latent infection with *M. tuberculosis* among BCG vaccinated individuals. Meeting of Tuberculosis Surveillance Research Unit, 2003, Bagamoyo (Tanzania)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

分担研究課題 結核感染の診断技術の確立に関する研究 資料

新規抗原を用いたインターフェロン γ にもとづく結核感染の特異的検出

研究協力者

森 亨・原田登之・御手洗聡（結核予防会結核研究所）

坂谷光則・岡田全司・井上義一・鈴木克洋

露口一成（国療近畿中央病院）

山岸文雄・佐々木結花（国療千葉東病院）

川辺芳子（国療東京病院）

長尾啓一（千葉大学）

重藤えり子（国療広島病院）

露口泉夫・高嶋哲也（大阪府立羽曳野病院）

本資料は American Journal Respiratory & Critical Care Medicine に掲載予定で現在印刷中のため、事前刊行電子版を資料として掲げるものである。

Specific Detection of Tuberculosis Infection an Interferon-gamma Based Assay using New Antigens

Toru Mori, Mitsunori Sakatani, Fumio Yamagishi, Tetsuya Takashima, Yoshiko Kawabe, Keiji Nagao, Eriko Shigeto, Nobuyuki Harada, Satoshi Mitarai, Masaji Okada, Katsuhiko Suzuki, Yoshikazu Inoue, Kazunari Tsuyuguchi, Yuka Sasaki, Gerald H Mazurek, and Izuo Tsuyuguchi.

Research Institute of Tuberculosis, Tokyo, Japan; National Kinki Chuo Hospital for Chest Diseases, Osaka, Japan; Osaka Prefectural Habikino Hospital, Osaka, Japan; National Chiba Higashi Hospital, Chiba, Japan; National Tokyo Hospital, Tokyo, Japan; Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan; National Hiroshima Hospital, Hiroshima, Japan; and Centers for Disease Control and Prevention, and Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA

Correspondence and requests for reprints to: Dr T Mori, Director, Research Institute of Tuberculosis, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-8533, Japan. Email: tmori@jata.or.jp

This study was financially supported by the Research Project of Emerging and Re-emerging Diseases, Ministry of Health, Labour & Welfare, Japan (A Study for the Development of New Tuberculosis Control Strategy), Nichirei Corporation, Tokyo, Japan, and Cellestis R&D Pty. Ltd., Melbourne, Australia.

Running Title: Accurate TB Infection Diagnosis

AJRCCM descriptor: #124

Word Count: 3,382 excluding abstract, titles, acknowledgement, legends, and references.

ABSTRACT

The tuberculin skin test for immunologic diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection has many limitations, including being confounded by Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination or exposure to non-tuberculous mycobacteria. *M. tuberculosis*-specific antigens that are absent from BCG and most non-tuberculous mycobacteria have recently been identified. We examined the use of two of these antigens, CFP-10 and ESAT-6, in a whole blood interferon- γ assay as a diagnostic test for tuberculosis in BCG vaccinated individuals. Due to lack of an accurate standard with which to compare new tests for *M. tuberculosis* infection, specificity of the whole blood interferon(IFN)- γ assay was estimated using data from people with no identified risk for *M. tuberculosis* exposure (216 BCG vaccinated Japanese adults) and sensitivity was estimated using data from 118 patients with culture confirmed *M. tuberculosis* infection who had received less than one week of treatment. Using a combination of CFP-10 and ESAT-6 responses, the specificity of the test in the low risk people was 98.1% and the sensitivity in patients with *M. tuberculosis* infection was 89.0%. The results demonstrate that the whole blood IFN- γ assay using CFP-10 and ESAT-6 was highly specific and sensitive for *M. tuberculosis* infection and was unaffected by BCG vaccination status.

Abstract Word Count: 196

Tuberculosis, Diagnostics, Infection, Interferon- γ , Bacillus Calmette-Guerin

INTRODUCTION

Tuberculosis continues to be a heavy burden on human health with the World Health Organization estimating that one third of the world's population is infected with *M. tuberculosis*. [1] Detection and treatment of latent tuberculosis infection is an important measure to fight this epidemic, especially in industrialized countries. The tuberculin skin test (TST) has been the only practical means of detecting latent *M. tuberculosis* infection in the past century. Unfortunately, the TST suffers from a number of well-documented performance and logistical problems, the most serious being false-positive responses due to reactivity caused either by infection with non-tuberculous mycobacteria (NTM), or by BCG vaccination.[2;3]

Recently, an in vitro whole blood test that detects *M. tuberculosis* infection by measuring interferon- γ (IFN- γ) responses to tuberculin purified protein derivative (PPD) was approved in the USA. While this assay may be less affected by BCG vaccination than the TST,[3] it is falsely positive in some BCG vaccinated individuals[4] as many PPD antigens are similar or identical to antigens in BCG and NTM. Over the past few years, parts of the *M. tuberculosis* genome that are absent from the genomes of all BCG sub-strains and most NTM have been identified.[5] These *M. tuberculosis* specific regions encode a number of proteins including CFP-10 and ESAT-6. Cell-mediated responses to these antigens have been shown to correlate with both proven *M. tuberculosis* infection and a high risk of infection.[4;5-10] The application of CFP-10 and ESAT-6 to the whole blood IFN- γ assay should allow specific and sensitive diagnosis of *M. tuberculosis* infection in a relatively simple test format.

Thus, the aim of this study was to estimate the specificity and sensitivity of a whole blood IFN- γ assay employing CFP-10 and ESAT-6, for the detection of *M. tuberculosis* infection in a predominately BCG vaccinated population. Estimates of sensitivity and specificity of tests for *M. tuberculosis* infection are hampered by the lack of a "gold standard"; one cannot prove the presence or absence of latent TB infection. In this study, sensitivity was determined in untreated culture proven tuberculosis patients, which although definitive for active tuberculosis requires extrapolation to equate to latent tuberculosis infection. Specificity was estimated in a group of BCG-vaccinated individuals with no known risks for *M. tuberculosis* exposure.

METHODS

Participants

Patients and student nurses consenting to the study were enrolled in Tokyo (National Tokyo Hospital; Fukujuji Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association), Osaka (National Kinki Chuo Hospital; Osaka Prefectural Habikino Hospital), Chiba (National Chiba Higashi Hospital; Nursing College, Chiba University), Miyazaki (Miyazaki Prefectural Nursing University), and Hiroshima (National Hiroshima Hospital), Japan after the protocol was approved by each institution's ethical review committee. Subjects were enrolled into one of two groups: Group 1 consisted of student nurses (greater than 17 years of age) who were enrolled at the beginning of their training and had no identified risk for *M. tuberculosis* exposure; and Group 2 consisted of patients clinically suspected to have active tuberculosis who had received less than one week of anti-tuberculosis treatment.

After giving written consent, subjects were asked to complete a questionnaire about possible risk factors for exposure to *M. tuberculosis*. For low risk subjects enrolled into Group 1, data were collected on their country of birth, history of prior tuberculosis or exposure to a person with tuberculosis, and other tuberculosis risk factors such as having an immunosuppressive condition (i.e. HIV, leukemia, lymphoma, diabetes mellitus, or renal failure) or having taken immune suppressive drugs in the 3 months prior to enrollment. Information regarding any previous Mantoux TST results and BCG vaccination status was also collected. For patients recruited into Group 2, information on their clinical symptoms of active tuberculosis and chest x-ray findings were collected at the time of enrollment. Sputa or other appropriate non-respiratory samples were collected from Group 2 patients and cultured for mycobacteria.

Sample Collection and Tuberculin Skin Testing

A heparinized blood sample was collected for the whole blood IFN- γ assay from each subject by venipuncture. Blood was collected prior to administration of Mantoux TSTs when the latter test was performed. For the TST, 0.1ml of tuberculin PPD (Nippon BCG Manufacturing Ltd, Tokyo; equivalent to approximately 3 TU of PPD-S) was injected intradermally into the volar aspect of the forearm and transverse induration diameter was measured 48 hours later.

***M. tuberculosis* - Specific Antigens**

Pools of overlapping peptides representing CFP-10 and ESAT-6 were used as TB-specific antigens in the whole blood IFN- γ assay. The sequence of 6 peptides representing CFP-10 and 7 peptides representing ESAT-6 are shown in Table 1. Peptides, manufactured by either Mimotopes Pty. Ltd. (Clayton, Australia) or Schafer-N (Copenhagen, Denmark), were at least 79% pure as determined by HPLC analysis. Peptides were solubilized in phosphate buffered saline and aliquots (10 μ g/ml of each peptide) were stored at -70°C, prior to use in the whole blood IFN- γ assay.

Whole Blood IFN- γ Assay

The whole blood IFN- γ assay (QuantiFERON[®]; QFT, Cellestis Limited, Carnegie, Australia) involves two stages: 1) overnight incubation of whole blood with antigens; and 2) measurement of IFN- γ production in harvested plasma samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Within 12 hours of collection, 1ml aliquots of blood samples were dispensed into 24-well tissue culture plates and antigens were added to appropriate wells. Three drops of saline (Nil control) and phytohemagglutinin (5 μ g/ml; Mitogen positive control), and 100 μ l of ESAT-6 and CFP-10 peptide cocktails were added to separate wells to give a final concentration of 1 μ g/ml per peptide. Blood samples were incubated with antigens for 16 to 24 hours at 37°C

before harvesting of approximately 300µl of plasma from above the settled blood cells.

The concentration of IFN- γ in the four plasma samples from each subject was determined using the QuantiFERON[®]-CMI ELISA as per the manufacturer's instructions. This ELISA is reported by the manufacturer to have a limit of detection of 0.05 IU/ml of IFN- γ . Samples from up to 16 subjects were tested in each ELISA run, which also included a set of standards that were measured in duplicate. For an ELISA run to be valid, strict performance criteria (Coefficient of Variation <15% and correlation coefficient for the standard curve greater than 0.98) had to be met. ELISA data for the *M. tuberculosis*-specific antigens CFP-10 and ESAT-6 and the Nil and Mitogen controls were converted to IU/ml based on the IFN- γ standard curve generated for each ELISA plate. For an individual's test to be deemed valid, their response to at least one of ESAT-6, CFP-10, or Mitogen had to be at least 0.25 IU/ml of IFN- γ above that of their Nil control (5 times the limit of detection for the ELISA). Results for ESAT-6 and CFP-10 are expressed as the concentration of IFN- γ detected minus the concentration of IFN- γ in the respective Nil control plasma.

Data Management and Analysis

Information from the questionnaires, TST results, and whole blood IFN- γ assay results were entered into Microsoft Excel 2000 and transferred to Stata[®]V7.0 for statistical analysis. Analysis consisted of t-tests for differences in means based on logarithmic transformation of the IFN- γ measurements, Chi-square test for testing difference in proportions, exact binomial methods to compute confidence intervals for proportions, and maximum-likelihood logistic regression to estimate the strength of the relation between age and response to the whole blood IFN- γ assay

and the TST.

RESULTS

Subjects were enrolled into the study over a four-month period from July to October 2002. There were 216 people with no identified risk of *M. tuberculosis* exposure enrolled into Group 1 and 152 tuberculosis suspects enrolled into Group 2. The mean age for Group 1 subjects was 20 years (range 18-33) and for Group 2, 54 years (range 13-86, age was not recorded for 8 people). Group 1 subjects were predominantly female (92.7%), whereas Group 2 subjects were predominantly male (66.4%). No subjects in Group 1 reported any history of contact with tuberculosis patient or of working in any health care setting.

The majority of Group 1 subjects had last been screened with the TST when entering junior high school, 6 years prior to the current study. None of these subjects reported having an immunosuppressive condition such as HIV, leukemia, lymphoma, diabetes mellitus, or renal failure; and none reported having taken immune suppressive drugs in the 3 months prior to enrollment. TST results were available for 113 of the 216 Group 1 subjects; of them 97 (85.8%) had induration \geq 5mm, 73 (64.6%) had induration \geq 10mm, and 36 (31.9%) had induration \geq 15mm. Thus, taking 10mm induration as the cut-off, specificity of tuberculin skin testing is 35.4%. The mean age and its standard error of those without TST were 19.5 years and 0.266, which compared to those with TST, 19.2 and 0.238, respectively. All group 1 subjects reported having received BCG vaccination at least once by the time of graduating from junior high school.

Of the 152 TB suspects in Group 2, 119 were proven to have *M. tuberculosis* infection (and active tuberculosis) by culture of the organism from sputum or other bodily samples. Sputum acid-fast smear results were available for only 78 of the 119 persons with culture-proven tuberculosis, as one hospital did not report smear results. Sixty-eight of 78 patients had positive smears. One person, whose culture was positive for *M. tuberculosis*, had an indeterminate QFT result due to insufficient IFN- γ production in response to the mitogen or TB-specific antigens. Results from this person were omitted from further analysis. *M. tuberculosis* was recovered from pleural fluid of four Group 2 subjects and from sputum of 114 subjects. All TB suspects had received less than 7 days of anti-tuberculous chemotherapy at the time of testing; 95 (80.5%) had received none. TST results were available for 76 of the 118 evaluable Group 2 subjects; 50 of these (65.8%) displayed induration of 5mm or greater. The patients who had TST results had a mean age (+/- standard error) of 54.7+/-2.3 years, compared to 51.7+/-3.6 years for those in whom skin tests were not placed (p=0.74). Both groups had a similar sex distribution (65% and 66% males, respectively, p=0.96) and a similar percentage of patients with positive sputum acid-fast smears (92% and 82%, respectively, p=0.17).

No patients self reported to be seropositive for HIV, undergoing hemodialysis, currently being treated with corticosteroids, or known to have a malignant disease. There were 4 patients with diabetes mellitus. There were 33 people in Group 2 whose cultures were negative for *M. tuberculosis* despite symptoms and suspicion of active tuberculosis; *M. avium* complex (MAC) organisms were recovered from 5 of these people; *M. kansasii* was recovered from 3; and 25 had negative culture results for mycobacteria.

Response to specific antigens

All IFN- γ ELISA runs met the specified performance criteria and were deemed valid. The range

of responses in the whole blood IFN- γ assay for subjects in each study Group are shown in Figure 1. Patients with culture-proven tuberculosis had a significantly higher mean IFN- γ response than low-risk Group 1 subjects for both CFP-10 (geometric means being 0.657 and 0.010 IU/ml respectively, $p < 0.001$) and ESAT-6 (1.330 and 0.003 IU/ml respectively, $p < 0.001$).

Table 2 shows test specificities and sensitivities for CFP-10 and ESAT-6 at different cut-off concentrations. To estimate specificity, all 216 subjects in Group 1 were assumed not to be infected with *M. tuberculosis*. To estimate sensitivity, only QFT results from the 118 Group 2 subjects for whom *M. tuberculosis* infection was confirmed by culture were used. To ascertain appropriate cut-offs for the ESAT-6 and CFP-10 antigens, receiver operator characteristic (ROC) analysis was performed, based on data from Group 1 individuals for specificity and Group 2 patients with culture-confirmed *M. tuberculosis* infection for sensitivity. Receiver operator characteristic (ROC) analysis was performed with data from these subjects and confirmed that 0.35 IU/ml was an appropriate cut-off for both CFP-10 and ESAT-6. This cut-off was chosen to maximize specificity without significant loss of test sensitivity. Using this cut-off, the specificities (with 95% confidence intervals) for CFP-10 and ESAT-6 were 98.6% (96.0 to 99.7; $n = 213$, data for CFP-10 were unavailable for 3 people due to insufficient blood being collected) and 99.5% (97.5 to 100.0; $n = 216$) respectively and the sensitivities were 65.3% (55.9 to 73.8) and 81.4% (73.1 to 87.9) respectively. If the data from CFP-10 and ESAT-6 were combined such that a person positive to at least one of the two antigens is judged as test positive, a sensitivity of 89.0% (81.9 to 94.0) and a specificity of 98.1% (95.3 to 99.5; $n = 213$) were obtained.

Test results were positive in 60 (88%) of 68 patients with positive sputum acid-fast smears and 6