

2G群 活動性(15) N=171

T-SPOT		QFT		
		陽性	疑陽性 / 判定不可	陰性
QFT	陽性	12 21	1 ^{不可} 1	1
	疑陽性 / 判定不可	0	1	4 / 9
陰性		6	2	2 ² 126

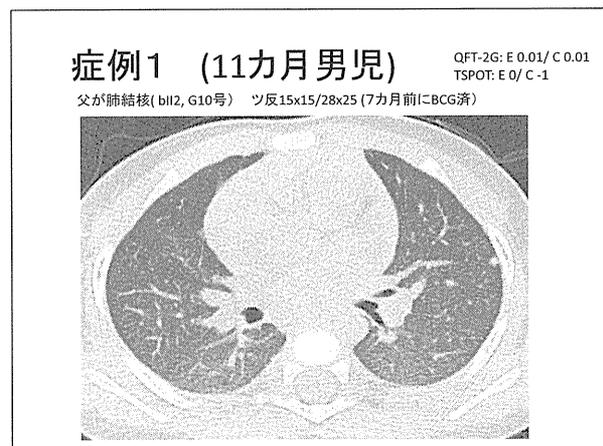
QFTとT-SPOTの一致・乖離を、2Gと3Gの間で比較した。2Gでは両者ともに陽性であったもの21例(12%)、乖離24例(14%)、両者陰性126例(74%)であり、3Gでは両者陽性9例(15%)、乖離10例(16%)、両者陰性43(69%)であったことから、2Gと3GはT-SPOTの結果とほぼ同じ一致・乖離であることが示された。

症例1は11カ月男児で、QFTとT-SPOTがともに陰性であった例である。父がガフキー10号(G10号)の肺結核で、接触者健診でツ反は15x15/28x25であったが、7カ月前にBCG接種が行われていたので臨床的に有意陽性とは判断できなかった。胸部CTで左上葉S4の胸膜直下に孤立性の結節影を認めた。

QFTとT-SPOTの一致・乖離

	QFT-2G vs. T-SPOT	QFT-3G vs. T-SPOT
両者陽性	21 (12%)	9 (15%)
乖離	24 (14%)	10 (16%)
両者陰性	126 (74%)	43 (69%)

QFT-3G n=62



2G群は活動性肺結核が15名含まれていた。そのうち、12名はQFTとT-SPOTともに陽性を示した。1名はQFT陽性・T-SPOT陰性で、残りの2名はQFTとT-SPOTともに陰性であった。

症例は2歳男児で、祖母がG9号の肺結核で接触者健診実施、QFTとT-SPOTはともに陰性であったが、右S2胸膜直下に結節陰影を認め、結核初期病巣と判断した。

症例2 (2歳男児)

QFT-2G: E 0.01 / C 0.01
TSPOT: E 0 / C 1

祖母(頻りに預けていた)が肺結核(rH3,G9) ツ反7x4/14x12 BCG済



症例3は10カ月男児で、母が肺結核(喀痰塗抹2+)のため接触者健診実施し、QFT・T-SPOTともに陽性であった。左下葉S8胸膜直下に結節性陰影を認めた。

症例3 (10カ月男児)

QFT-2G: E 14.19 / C 8.7
TSPOT: E 217 / C 18

母が肺結核(I-III2, 2+) 児のツ反15x15/20x20(32x28) BCG済



3G群には活動性肺結核が6名あり、うち5名はQFTとT-SPOTがともに陽性、1名はQFT陽性・T-SPOT陰性であった。QFTとT-SPOTがともに陰性の発病例は0名であった。

3G群 活動性(6) N=62

QFT \ T-SPOT	T-SPOT		
	陽性	疑陽性 / 判定不可	陰性
陽性	5 9	0	1 3*
疑陽性 / 判定不可	0	0	3 / 2
陰性	0	0 / 2	43

[備考] *については、年齢 11カ月、2歳、7歳

症例4は2歳男児で、父がG7号の肺結核と判明し接触者健診を実施した。QFT陽性・T-SPOT陰性で、右中葉S5に明瞭な結節性陰影を認めた。

症例4 (2歳男児)

QFT-3G: Ag 0.38
TSPOT: E 4 / C 1

父が肺結核(G7号) ツ反12x10/25x25



(2)の調査期間について、QFT-2Gから3Gに変更され、T-SPOTとの相関に変化が生じたか検討した。上述したものと同一手法で、期間を2008年2月から2011年7月まで延長し、QFT-3G群は112件として比較すると、QFT-2Gおよび3GのT-SPOTとの一致(陽性12%対12.5%、陰性74%対75%)・乖離(14%対12.5%)は同様の成績を示していた。

陽性・疑陽性・判定不可・陰性(件数)

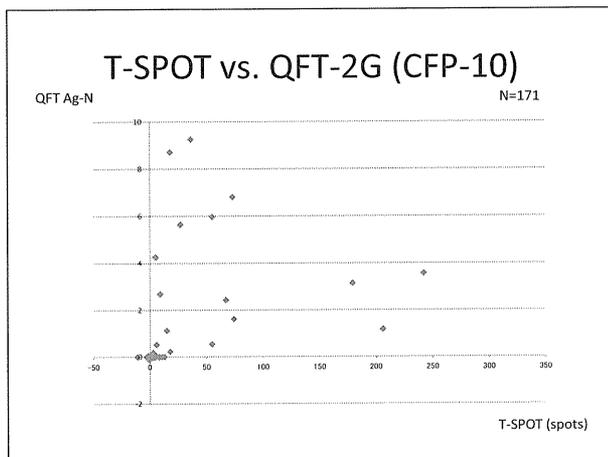
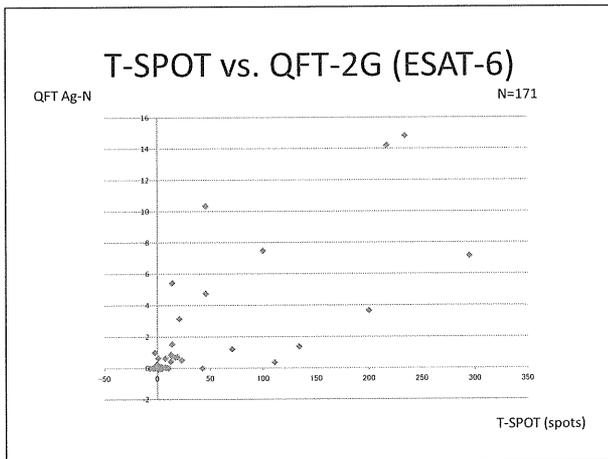
	QFT-2G	QFT-3G	T-SPOT
陽性	21	17	44
疑陽性 判定保留	4	5	0
判定不可	10	2	7
陰性	125	88	232
合計	171	112	283

QFTとT-SPOTの一致・乖離

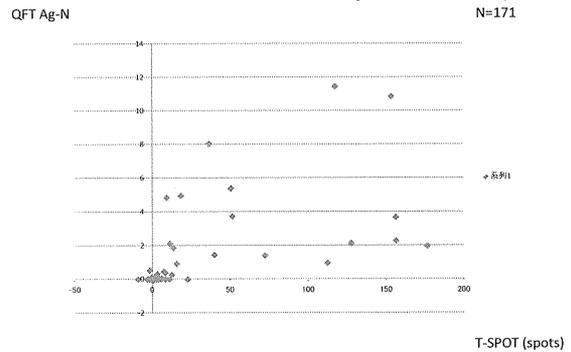
	QFT-2G vs. T-SPOT	QFT-3G vs. T-SPOT
両者陽性	21 (12%)	14 (12.5%)
乖離	24 (14%)	14 (12.5%)
両者陰性	126 (74%)	84 (75%)

QFT-3G n=102

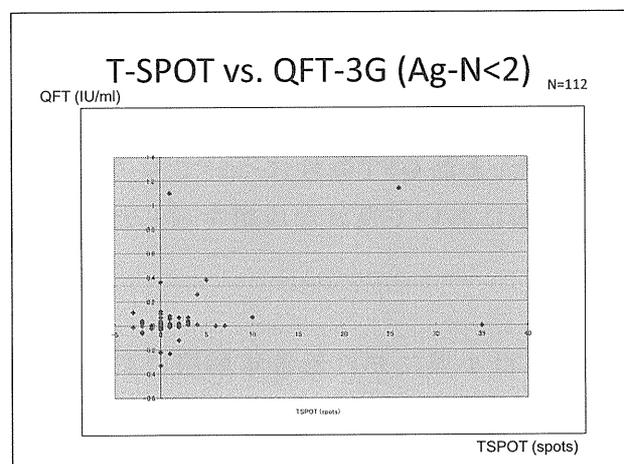
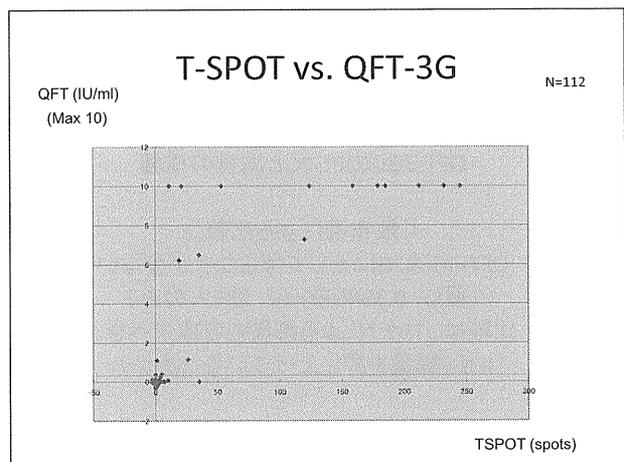
つぎに、2Gと3Gについて、T-SPOTの結果との相関をみる目的で散布図を作成した。
 (a) QFT-2G (ESAT-6)とT-SPOT：図は縦軸にQFT-2GのESAT-6による測定値を、横軸にT-SPOTのスポット数を示したものである。同様にCFP-10とT-SPOTについて図に示す。またESAT-6とCFP-10による測定値の平均とT-SPOTについて示す。どちらも、少数の点を除き、QFT測定値とT-SPOTのスポット数は、ばらつきながらは相関を示していた。



T-SPOT vs. QFT-2G (E/2+C/2)



(b) QFT-3GとT-SPOT：(a)の結果と異なる点として、QFTは測定上限の10 IU/mlに達しているものが目立つようになる。また、QFT-3Gの測定値が2未満のものについてだけみると、QFTのカットオフ値0.35未満のものについては狭い範囲に収まっていることが示された。



考察

以上の結果より、

- (1) QFT-2G と 3G は、それぞれ T-SPOT との陽性・陰性の一致を比較とすることにより、3G へ変更された後も一致・乖離は同等の傾向を示していた。ただし、自験例の検体は医師が結核研究所へ自ら運搬しているため、検体の取り扱いには細心の注意が払われていた。
- (2) QFT-2G と 3G について、それぞれ T-SPOT のスポット数と比較すると、3G では測定値報告の上限である 10 である例が多くなっており、これは ESAT-6 と CFP-10 による測定値の加算である上に、TB7.7 による測定値の押し上げが起こったものと推測した。また QFT 陰性の範囲についてみると、T-SPOT との相関は良好であった。

QFT-2G vs. QFT-3G

小児QFT-2G, QFT-3G, T-SPOTの比較

<陽性・陰性の一致>

QFT-3GはQFT-2Gと同様の成績

<散布図による比較>

QFT-3Gは2Gに比してばらつきが少ない
(但し 0.35<QFT<10 は6人のみ)
比較は、TB7.7による影響も考慮すべき
(IFN- γ 総量を押し上げているためか)

これらの結果より、われわれの施設における経験からは、QFT-2G から 3G に変更されたことによる欠点はなく、むしろ 3G は陽性例の測定値が明瞭に高くなる傾向にあることが分かった。また QFT 陰性についても、T-SPOT との比較において良好な成績を示した。

E. 結論

QFT は小児における各年齢層において陽性例が認められ、各年齢層で有用性があることが示された。しかし、2歳以下では判定不可がみられるので、QFT の有用性が必ずしも保証されているものではないと言える。QFT と T-SPOT の結果の比較し、その一致・乖離

は 2G と 3G の両方で同様の傾向を示した。画像診断で肺結核と診断された患者について、2G は陰性例がみられたが、3G では陰性例はなかった。IGRAs による小児肺結核の診断、特に発病早期の診断は今後も症例の蓄積が必要であると考えられた。

結論

小児結核診断におけるQFTとT-SPOTの有用性

- (1) QFTが使用できる年齢
全年齢で陽性、判定不可が0歳で多い
- (2) QFT-2Gから3Gに変更された影響
TSPOTとの整合性はほぼ同じ
(QFT-3GのTB7.7による影響も考慮すべき)
- (3) IGRAsの診断の限界
発病の早期診断は症例蓄積を必要とする

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
「小児結核対策・医療の評価」

研究分担報告書

(研究分担者 徳永 修 国立病院機構南京都病院 小児科医長)

小児接触者健診における肺結核初期病巣への対応
— 感染(LTBI)と発病の診断に関連して —

研究協力者

宮川 知士 東京都立小児総合医療センター 呼吸器科・結核科
石立 誠人 東京都立小児総合医療センター 呼吸器科・結核科

研究要旨

結核発病の定義は必ずしも小児結核にあてはまるものではなく、画像診断における近年の技術的進歩は感染（潜在性結核感染症 latent tuberculosis infection; LTBI）と発病の境界に関して再検討を必要とするものと思われる。胸部 CT によって小児結核の初期病巣と考えられる所見を有した小児について、画像所見・血清診断所見・治療について検討した。

A. 研究目的

結核が「発病」の状態であることの定義は、次のように考えられている。

- ① 結核に感染すると肺には小さな初感染病巣が出来、やがて所属リンパ節にも病変が出来が、この状態ではツ反応が陽性になるだけでなんの症状もなく、X線検査などでも異常は認められないので発病とはいわない。
- ② わが国では普通、「結核性と考えられる陰影が胸部X線写真で認められるか、結核性と考えられるなんらかの異常が臨床的に認められ、治療が必要と考えられる場合」、発病したという。
- ③ 大部分の小児結核症と肺外結核症は排菌を認めないので臨床的に診断されることが多いが、これらについては世界的に共通した「発病の定義」は確立していない。

結核「発病」の定義

結核に感染すると肺には小さな初感染病巣が出来、やがて所属リンパ節にも病変が出来が、この状態ではツ反応が陽性になるだけでなんの症状もなく、X線検査などでも異常は認められないので発病とはいわない。

中略

わが国では普通、「結核性と考えられる陰影が胸部X線写真で認められるか、結核性と考えられるなんらかの異常が臨床的に認められ、治療が必要と考えられる場合」、発病したという。

中略

世界的には肺結核症は「上述の条件があり、かつ結核菌が認められる場合を発病」と定義されている。

大部分の小児結核症と肺外結核症は排菌を認めないので臨床的に診断されることが多いが、これらについては世界的に共通した「発病の定義」は確立していない。

青木正和 医師・看護職のための結核病学 1. 基礎知識 (肺)結核予防会編

成人の場合であれば、発病の状態になっても、周囲への感染性が問題となる以前にこの考え方によって発病を診断して治療を開始すれば、少なくとも社会的な問題は発生しない。ところが、小児（特に乳幼児）の場合には、周囲への感染性は決して高くないが、病状が進行し肺門リンパ節腫脹がみられ、血行撒布による粟粒結核の状態となる直前においても

何ら症状がみられないことがある。しかも、胸部 CT で明らかな肺門リンパ節腫脹が確認出来る場合でも、胸部 X 線では無所見（いわゆる「ゼロ型」）であり、発病とは診断できないのが難点である。胸部 CT で肺内に初期病巣が確認できる場合でも、病巣が小さい結節程度の広がりであれば潜在性結核感染症 (LTBI) の治療で十分であると考えられるし、これまで胸部 X 線で無所見として、抗結核薬単剤による治療（かつて「予防内服」と呼ばれていた方法）を行えば失敗はない。ところが明らかに肺門リンパ節の腫脹があると判明した場合には、単剤による治療は危険であり、肺結核として多剤による化学療法を開始することとなる。その中間的存在、肺門リンパ節腫脹はないが、肺に病変微小な病変を明らかに有している場合に如何に対応すべきかは決められた方法がない。

背景と目的

潜在性結核感染症（“発病ではない”）の診断は、成人の「感染・発病の概念」によれば、単純 X 線異常なし（所謂「0（ゼロ）型」）で可能である。

しかし乳幼児については、胸部 CT を行わないと、肺門リンパ節腫脹を伴う発病を発見できないことが多く、重症結核へ進展する危険がある。

小児における「感染・発病の診断」は、胸部 CT 所見を考慮に入れる必要があるため、初期病変の評価と治療は重要である。

B. 研究方法

本研究では、小児結核初期病巣の実態を解明するために、東京都立小児総合医療センターにおいて過去 1 年間（QFT-3G 導入後）に接触者健診（またはコッホ現象に対する精査）目的で胸部 CT を実施した小児のうち、3 歳以下でありかつ QFT-3G 陽性であった 16 名を対象とし、胸部 X 線所見と胸部 CT の比較を行った。また、当センターで使用されている機種は東芝製の Aquilion ONE

(TSX-301A) であり、胸部 CT における初期病変の存在を示し、5mm スライスと 1mm スライスによる画像構築における所見の相違についても検討した。

対象と方法

【対象】

過去 1 年間（QFT-3G 導入後）に、接触者健診（Koch 現象を含む）目的で当院受診し胸部 CT 実施、そのうち 3 歳以下・QFT-3G 陽性であった 16 名

【方法】

胸部 X 線所見と胸部 CT の比較を行い、胸部 CT における初期微細病変の存在を示す

C. 研究結果

対象となった 16 名の内訳を表に示す。年齢は 4 カ月～3 歳 10 カ月（中央値 2 歳 2 カ月）であり、QFT-3G は全例で陽性、TSPOT は 12 例で陽性、6 例で陰性であった。感染源は 1 例（コッホ現象）を除いてすべて判明しており、母 7 名、父 3 名、祖父母（曾祖母を含む）3 名、保育士 1 名、知人 1 名であった。感染源の喀痰塗抹が陰性であったが、濃厚接触であると判断して胸部 CT を実施した 2 名はいずれも胸部 CT に異常を認めなかった。

明らかに肺結核の発病であると診断されたものが 2 名あり、1 名は両側肺門リンパ節腫脹、もう 1 名は右肺に空洞を伴う硬化像を認めた。6 名で肺結核初期病変と考えられる結節性病変を認め、うち 1 例は結節が多発性、1 例は結節に加えて撒布像を認めた。初期病変を認めた 6 名のうち、4 名が 2HRZ/4HR による治療を、2 名が 6H による治療を受けた。2HRZ/4HR の適応とした 4 名の内訳は、1. 結節が多発、2. 撒布像あり、3. 両側肺門リンパ節腫脹あり、4. 結節のみ、であった。

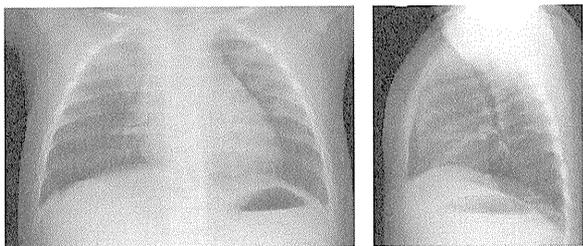
		age	gen.	QFT-3G	E/C	発端	菌量	CT findings	Tx
1	H.S.	2y5m	m	6.23	19/0	保育士	G5	(Lt-atelectasis)	H
2	C.S.R.	11m	m	0.36	neg	母	(-)	n.p.	H
3	H.S.	2y1m	m	0.38	neg	父	G7	Rt: multiple nodules	HRZ
4	S.K.	1y8m	m	>10	111/74	母	G5	Bil: LNs swelling	HRZ ₁₂
5	S.K.	3y1m	f	>10	79/45	母	G5	Lt: nodule (S10)	HRZ
6	T.K.	1y9m	f	>10	59/153	母	G5	n.p.	H
7	T.I.	4m	m	>10	3/8	祖父	3+	Rt: cons +cavity, LN	HRZ ₁₂
8	R.N.	1y11m	m	6.49	31/4	母	G6	n.p.	H
9	T.K.	2y3m	m	7.38	35/11	知人	G9	Rt: small nodule	H
10	S.Y.	4m	f	0.52	neg	Koch		n.p.	H
11	K.A.	3y5m	m	>10	neg	母	2+	susp. Rt LN swelling	H
12	Y.K.	2y10m	f	0.88	1/6	母	1+	Lt: nodule (S10)	H
13	S.H.	2y	f	0.86	neg	曾祖母	G0	n.p.	H
14	O.M.	2y7m	f	9.26	34/4	父	G5	n.p.	H
15	K.I.	3y10m	f	9.9	73/27	父	G2	Rt: nodule, +dissem.	HRZ
16	H.H.	2y7m	m	6.67	neg	祖母	G4	Rt: nodules, Bil:LN	HRZ

症例7は4カ月女児で、祖父が喀痰塗抹3+の肺結核と診断されて接触者健診となった。BCGは未接種で、ツ反7x7/16x12と陽性であり、QFTも陽性であった。胸部X線で右上肺野の濃度上昇を認め、胸部CTで右上葉S2における空洞を伴う硬化像を認めた。

症例7

4カ月 女児
 【発端者】祖父(同居); 病型 r-II-1、喀痰塗抹3+
 【児】無症状、BCGは未接種
 【家族情報】母・叔父2名・大祖父・祖母がQFT陽性

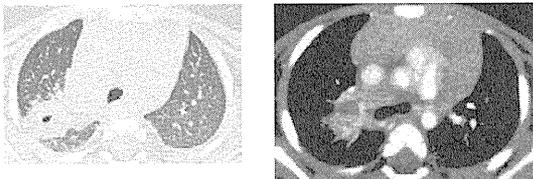
【検査】ツ反7x7/16x12: QFT 陽性; TSPOT E3/C8 (M85) 陽性; CSF WNL; 胃液SPCP
 胸部X線 RULの濃度上昇あり



5mm スライスの画像と、1mm スライスのものを比較すると、どちらも所見をとるには困難はない。本例はHRZによる治療を行った。

症例7

1mmスライス画像



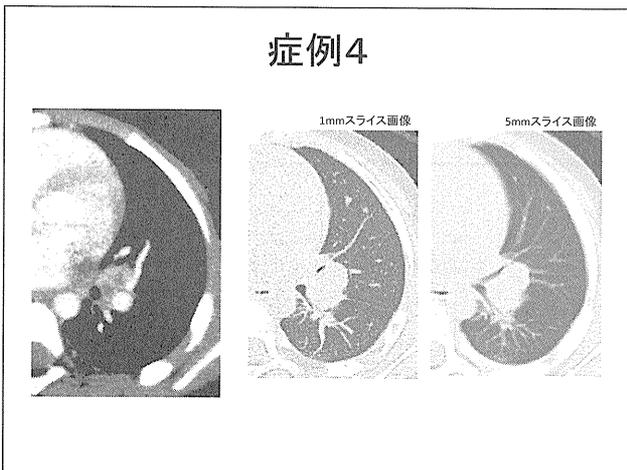
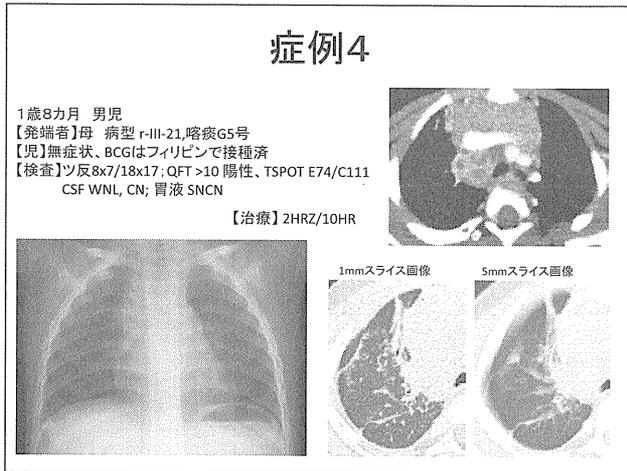
5mmスライス画像



【治療】2HRZ/10HR

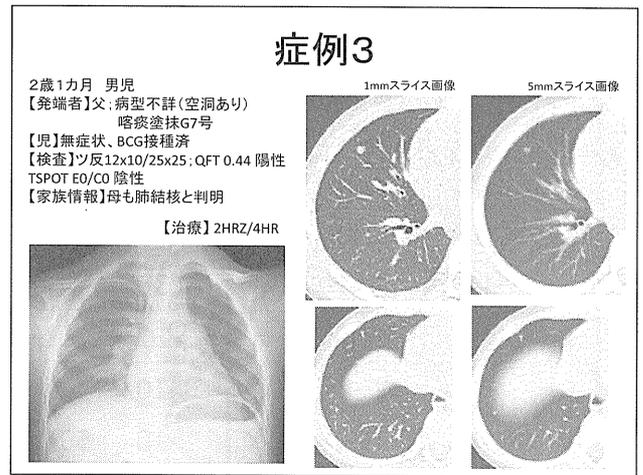
症例4は1歳8カ月女児で、母がG5号の肺結核であり健診となった。胸部X線で右縦隔陰影の

拡大を認め、胸部 CT 縦隔条件で傍気管リンパ節の腫大を認めた。右上葉の所見については、1mm・5mm スライスともに一応所見をとることが出来たが、左上葉の肺門リンパ節腫大の支配領域である S5 の小結節陰影は 1mm スライスの方がより明瞭に把握できた。

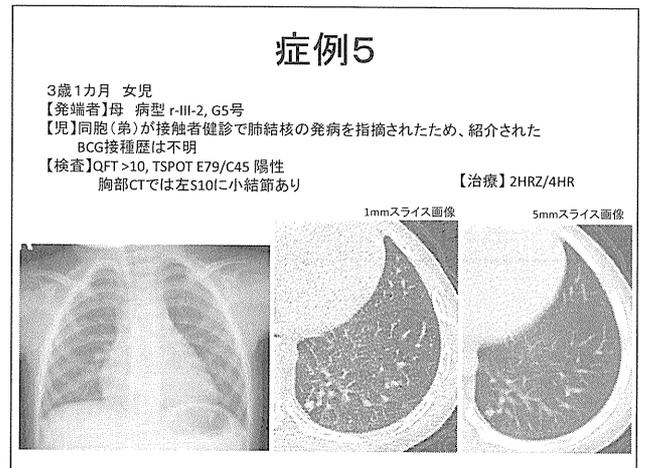


この症例は肺門リンパ節腫脹と肺野異常があったため、HRZ による治療を行った。

症例 3 は 2 歳 1 カ月男児で、父が G7 号の肺結核であり健診、QFT 陽性・TSPOT 陰性であった。胸部 X 線では異常を認めず、胸部 CT では右中葉 S4~5 に結節陰影を、また同じ領域の末梢にも楔形の小結節陰影を認めた。5mm スライスでは淡く確認できる程度であるが、1mm では明らかな結節として認められた。HRZ により治療した。



症例 5 は 3 歳女児で、母が G5 号の肺結核のため健診、QFT・TSPOT ともに陽性であり、胸部 X 線は異常なく、胸部 CT で左 S10 に結節陰影を認めた。HRZ による治療とした。

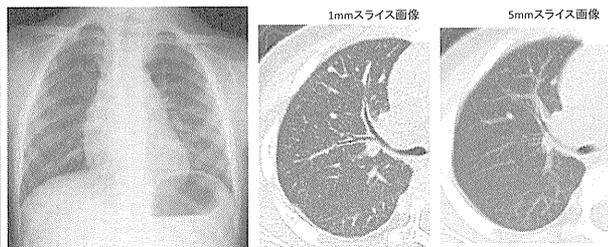


症例 9 は 2 歳男児、母の知人 (G9 号肺結核) との接触で健診、QFT・TSPOT ともに陽性であり、右上葉 S3 に結節陰影を認めた。1mm スライスでは明らかに認めたが、5mm では不明瞭であった。H による治療とした。

症例9

2歳3カ月 男児
【発端者】母の知人 病型b-II-3、G9号(震災で避難)
【児】無症状、BCG接種済
【検査】ツ反11x11/19x17、QFT 7.38 陽性、TSPOT E35/C11 陽性

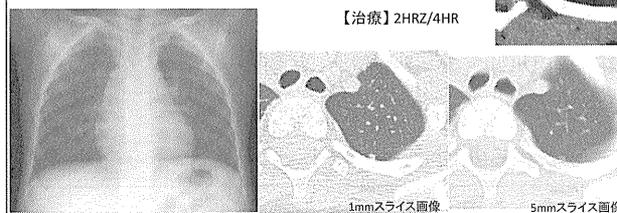
【治療】6H



症例16

2歳7カ月 男児
【発端者】母方祖父 病型 b-III-3rpl、喀痰塗抹G4号
【児】無症状、BCG接種済
祖父とは非同居だが、常に往来あり、預けられていた
【家族情報】母はQFT陽性
【検査】ツ反0x0/9x9(28x26): QFT 1.56 陽性、TSPOT E1/C1陰性
胸部CT右上葉・左上葉の小結節(+)、肺門リンパ節石灰化(+)

【治療】2HRZ/4HR

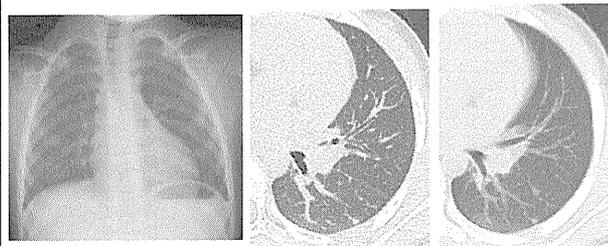


症例12は2歳女児で、母が喀痰塗抹1+の肺結核と判明し健診、QFT・TSPOTともに陽性、左S6胸膜直下に小結節陰影を認めた。Hによる治療を行った。

症例12

2歳10カ月 女児
【発端者】母 病型r-II-2、喀痰塗抹1+
【児】無症状、BCG接種済
ツ反12x10/12x10、QFT 0.88、TSPOT E1/C6 陽性

【治療】6H

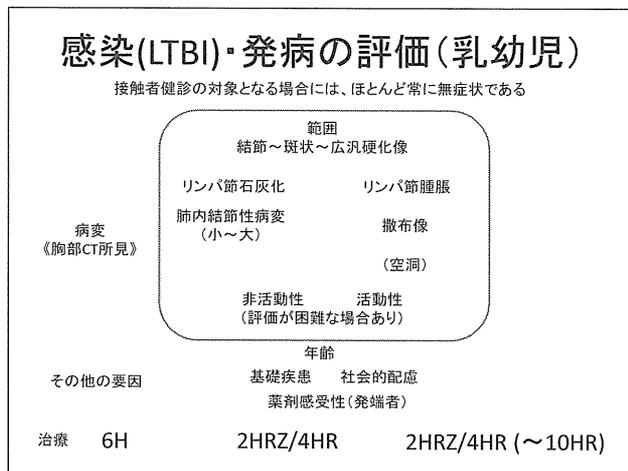


症例16は2歳男児で、母方祖父がG4号の肺結核で、QFT陽性、TSPOT陰性であった。胸部X線は異常を認めず、胸部CTで左肺門リンパ節の小石灰化を認め、左S1+2胸膜直下に小結節陰影を認めた。5mmスライスよりも1mmの方が明瞭に確認できた。本児は結節陰影とともに肺門リンパ節の石灰化を認めたためにHRZによる治療とした。

考察

小児における、感染(潜在性結核感染症 LTBI)と発病の評価は、特に乳幼児において課題と考えられる。この年齢層においては、すでに重症結核となっていて有症状受診する場合を除くと、ほぼ全例が接触者健診として受診する。症状はなく、菌検査でも結核を証明できない場合が多いので、感染診断で異常(ツ反有意陽性、またはQFT陽性)と判定された場合には、画像診断が重要となる。胸部X線では初期病変および肺門・縦隔リンパ節腫脹を正確に評価することが困難であることが多いので、胸部CTを含めた精査が必要である。近年、胸部CTの技術的進歩により、従来標準であった5mmスライスによる画像構築から、1mmスライスによる画像構築が可能になったため、より微小な初期病変でも明瞭に検出できるようになった。胸部CTの評価に必要な画像上の要因は、異常陰影の範囲(結節、斑状、広汎硬化像)であり、後者になるほど発病と診断して十分な治療を行うべきである。しかし、前者であれば胸部X線でゼロ型であるから、潜在性結核感染症としての治療も可能と考えられる。リンパ節についても石灰化であれば既に器質化して非活動性となったと考えてLTBI治療が可能であるが、腫脹がある場合は多剤による治療が必要である。その他の要素として、空洞や撒布像がある場合は、活動性病変を有すると考えるべきであり、LTBIの治療では不

十分な可能性が強い。このようにして、胸部 CT 所見からみた、病変の活動性を評価するが、その他の要因として年齢、基礎疾患、発端者の薬剤感受性、社会的配慮などを加味して治療方針を決定している。今回検討した症例については、おおむね上記と矛盾はない。しかし、これを一般医療機関でも判断できるようにするには、より明確な判断基準が必要であると考えられるので、今後基準の整備が必要である。



E. 結論

小児の肺結核は、特に乳幼児では症状に乏しく、菌が検出しにくいこともあり、画像診断が重要となる。しかし画像診断においても、胸部X線では異常を認めず、胸部 CT ではじめて肺門リンパ節腫大や肺野病巣が明らかになる場合が多い。これらの理由から、成人において従来考えられてきた「発病」の定義が、小児（特に乳幼児）においては当てはまらない事が多くなる。従って、今後は小児結核の発病をいかに定義するか、ガイドライン作成が重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
研究分担報告書

「免疫脆弱集団（高齢者・小児・HIV等）における感染診断の評価」

研究分担者

原田 登之 結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンス部長

研究要旨

高齢者・小児・HIV感染者等の免疫的に脆弱である結核リスク集団における、クオンティフェロン（QFT）および T-SPOT.TB を含む Interferon-Gamma Release Assays（IGRA）の特性は十分明らかにされていない。また IGRA の特性として、潜在性結核感染（Latent TB Infection; LTBI）と活動性結核の区別は出来ないことや、さらに休眠性結核感染（Dormant TB Infection; DTBI）の検出も出来ないことが知られている。特に、日本における結核患者の約半数が高齢者であるため、高齢者における IGRA の特性を知ることは、効果的な結核対策を行う上で必須である。実際に、IGRA の一つであるクオンティフェロン[®]TB-2G（QFT-2G）の陽性率は、高齢者の推定既感染率を大きく下回っている。この乖離の原因の可能性として、高齢者では結核菌が殆ど増殖しない、いわゆる休眠状態になっているのか、あるいは自己の免疫能により結核菌を体内から消滅させたということが考えられる。しかし何れの場合にしろ、多くの IGRA 検査陰性で結核既感染高齢者における結核菌抗原特異的 T 細胞は、effector T 細胞ではなく central memory T 細胞が主な集団であると予想される。このように、effector T 細胞と central memory T 細胞の反応が区別できる方法を開発することは、高齢者における結核感染の実態を把握する上で重要な情報を得ることにつながると考えられる。これらの T 細胞亜集団を解析するため、二重蛍光染色 Fluorospot 法の確立と、その評価を行った。

研究協力者

樋口 一恵（結核予防会結核研究所酸抗菌レファレンス部主任研究員）

関谷 幸江（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部免疫検査科研究員）

れておらず、多くの課題を持つことも知られている。それらの課題の一つである免疫脆弱集団における診断特性、特に高齢者での診断特性を検討することは、現在日本の結核患者の半数が高齢者であることからきわめて重要であると考えられる。これまでの我々の研究結果から、日本の高齢者集団において IGRA の一つであるクオンティフェロン[®]TB-2G（QFT-2G）の陽性率と推定既感染率には大きな乖離が見られている。この乖離の原因を解明することは、高齢者における結核感染の実態を明らかにし、ひいては効果的な高齢者結核の対策を作成する上で非常に重要である。

IGRA において、インターフェロン- γ （IFN- γ ）を産生する T 細胞は effector T 細胞であり、IGRA 検査結果が陽性であるという意味は、IGRA に使用されている結核菌特異抗原である ESAT-6 およ

A. 研究目的

BCG 接種や大多数の非結核性抗酸菌感染による影響を受けない免疫学的結核感染診断法 IGRAs（Interferon-Gamma Release Assays）の診断特性として、潜在性結核感染（Latent TB Infection; LTBI）と活動性結核の区別は出来ないことが知られており、また休眠性結核感染（Dormant TB Infection; DTBI）の検出も出来ないと考えられている。しかし、その診断特性については未だ十分明らかにさ

び CFP-10 を産生している結核菌が現在体内に存在することを示唆していると考えられている。一方、結核菌はマクロファージ内部で長期にわたり生存可能であり、このような条件では ESAT-6 や CFP-10 等の結核菌分裂期に分泌される抗原を産生しない、いわゆる休眠期の状態になると考えられている。このような休眠期の結核菌は、ESAT-6 および CFP-10 を産生しないため IGRA 検査では陰性になると考えられる。高齢者における結核既感染率と実際の QFT-2G 陽性率の乖離は、多くの高齢者において結核菌が休眠期に入っている事が原因の一つである可能性が考えられる。もう一つの乖離の原因としては、自己の防御免疫機構により結核菌が完全に体内から除去された結果である可能性が考えられる。何れの場合においても、多くの IGRA 検査陰性の結核既感染高齢者における結核菌抗原特異的 T 細胞は、抗原に感作された effector T 細胞ではなく、抗原が消滅した際に生じる central memory T 細胞が主な集団であると予想される。このように、effector T 細胞と central memory T 細胞の反応が区別できる方法を開発することにより、高齢者における結核感染の実態を把握する上で重要な情報を得ることが可能になると考えられる。このように本研究の目的は、effector T 細胞と central memory T 細胞の反応を区別することにより、結核菌の感染状況を把握する方法の開発にある。

B. 研究方法

結核菌が休眠期に入るか、あるいは体内から消滅した状態では、ESAT-6 や CFP-10 に特異的な T 細胞は主に central memory T 細胞として存在し、この T 細胞は主に IL-2 を産生すると報告されている。一方、活動期の結核菌が存在すると central memory T 細胞数が減少し、IFN- γ 単独を産生する effector T 細胞、あるいは IL-2 と IFN- γ を同時に産生する effector memory T 細胞が主に存在することが報告されている。すなわち、これらの T 細胞亜集団を解析することにより、結核菌の存在状況を知ることが可能になると考えられる。このような複数のサイトカイン産生細胞を解析するために、ELISPOT 法を応用した蛍光色素を用いる二重蛍光発色 Fluorospot のシステムを検討した。

まず、Fluorospot 用マイクロプレートに抗ヒト IFN- γ 抗体と、抗ヒト IL-2 抗体を結合後、ブロッキング処理を行ったものを準備した。次に、結核未感染者および感染者（ボランティア）より血液を採取し、Ficoll を用いた密度勾配遠心により末梢血単核球 (PBMC) を調整した。調整した PBMC 2.5×10^5 個を、ESAT-6 および CFP-10 を予め添加しておいた抗体コーティングした Fluorospot 用マイクロプレートに添加後、18 時間前後培養した。培養後、IFN- γ 単独産生 T 細胞 (IFN- γ T 細胞)、IL-2 単独産生 T 細胞 (IL-2 T 細胞)、およびの IFN- γ と IL-2 の両者を産生する T 細胞 ($\gamma/2$ T 細胞) の個数をエリスポットリーダーにより計測した。

C. 研究結果

蛍光色素を用いる二重染色 Fluorospot のシステムを用い、11 人の LTBI を持つボランティアを対象に各サイトカイン産生細胞数を解析した。本法において、IFN- γ 産生 T 細胞 (effector T 細胞) は緑色に、IL-2 産生 T 細胞 (central memory T 細胞) は赤色に、また両サイトカインを産生する T 細胞 (effector-memory T 細胞) は画像処理することにより図 1 に示すように黄色に発光する。表 1 は、11 人の ESAT-6 と CFP-10 に対する各 effector T 細胞、effector-memory T 細胞および central memory T 細胞の応答数を表している。これをグラフにしたものが図 2 である。図に見るように、effector T 細胞が約 70%程度と高く、central memory T 細胞と effector-memory T 細胞がそれぞれ 15%程度であった。

D. 考察

二重蛍光染色 Fluorospot 法により、今回対象とした結核感染者においては、主に effector T 細胞が存在している事が示された。実際に、今回の対象者は全て IGRA 検査において陽性反応を示していることから、結核菌がある程度活動していると考えられるため、予想される結果が得られた。すなわち、現段階で本法はある程度正確に結核感染の状況を反映する可能性はあるが、例えば結核既感染者で現在 IGRA 検査陰性者や、活動性結核患者等における反応性をさらに検討し、本法に対する評価を今後も続ける必要があると考えられる。

E. 結論

結核菌の存在状態を解析するため、二重染色 Fluorospot を用い潜在性結核感染者を対象に、抗原特異的 IFN- γ および IL-2 産生細胞の解析を試みた結果、IFN- γ 単独産生細胞が約 70% で、IL-2 単独と IFN- γ および IL-2 の両者の産生細胞がそれぞれ 15% 程度であった。今後、本法を用いた活動性結核患者を含めた、より大規模で詳細な検討が必要と思われる。また、新たな潜在性結核感染特異的抗原も報告されており、これらの抗原を含めた新たな診断法の確立は今後の重要な課題であると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

Performance of a Whole-Blood Interferon-Gamma Release Assay with Mycobacterium RD1-Specific Antigens among HIV-Infected Persons. Fujita A, Ajisawa A, Harada N, et al. Clin Dev Immunol. 2011; 2011. pii: 325295

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

なし

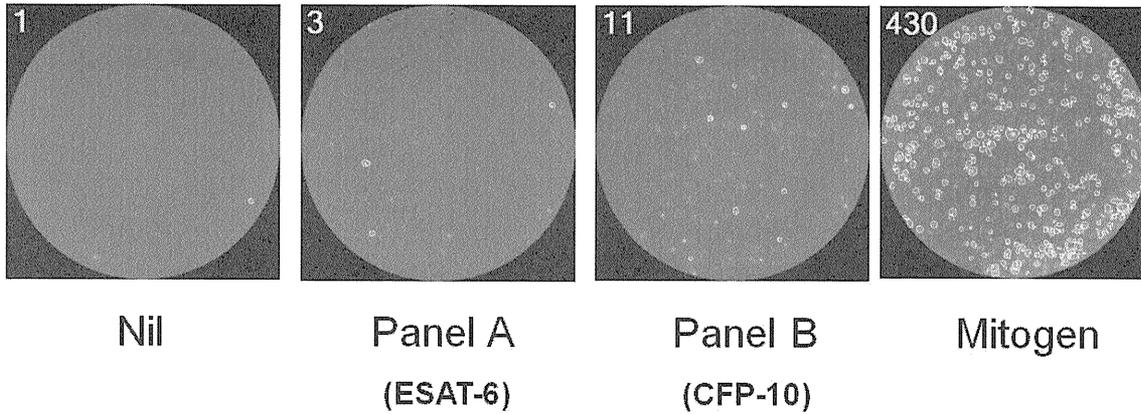


図 1. Fluorospot のイメージ

IFN- γ と IL-2 産生の画像を合成した画像であり、IFN- γ 産生 T 細胞は緑色、IL-2 産生 T 細胞は赤色、両者産生 T 細胞（サークルで囲まれたスポット）は黄色で示される。

表 1. 潜在性結核感染者における各サイトカイン産生 T 細胞亜集団の比率

ID	IFN- γ only		IFN- γ /IL-2		IL-2 only	
	E	C	E	C	E	C
2	11 (84.6%)	4 (100%)	1 (7.7%)	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)
3	23 (95.8%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)	0 (0%)
4	69 (68.3%)	11 (25.6%)	16 (15.8%)	7 (16.3%)	16 (15.8%)	25 (58.1%)
5	14 (73.7%)	0	4 (21.0%)	0	1 (5.3%)	0
6	20 (80.0%)	99 (79.2%)	2 (8.0%)	11 (8.8%)	3 (12.0%)	15 (12.0%)
7	48 (76.2%)	9 (75.0%)	6 (9.5%)	1 (8.3%)	9 (14.3%)	2 (16.7%)
8	14 (58.3%)	0	5 (20.8%)	0	5 (20.8%)	0
9	10 (47.6%)	1 (100%)	5 (23.8%)	0 (0%)	6 (28.6%)	0 (0%)
11	9 (36.0%)	4 (44.4%)	7 (28.0%)	1 (11.1%)	9 (36.0%)	4 (44.4%)
12	9 (81.8%)	11 (68.8%)	1 (9.1%)	3 (18.8%)	1 (9.1%)	2 (12.5%)
16	15 (57.7%)	25 (75.8%)	5 (19.2%)	3 (9.1%)	6 (23.1%)	5 (15.2%)

潜在性結核感染者 11 人における結核菌特異抗原 ESAT-6、CFP-10 に対する各 effector T 細胞（IFN- γ only）、effector-memory T 細胞（IFN- γ /IL-2）および central memory T 細胞（IL-2 only）の応答。

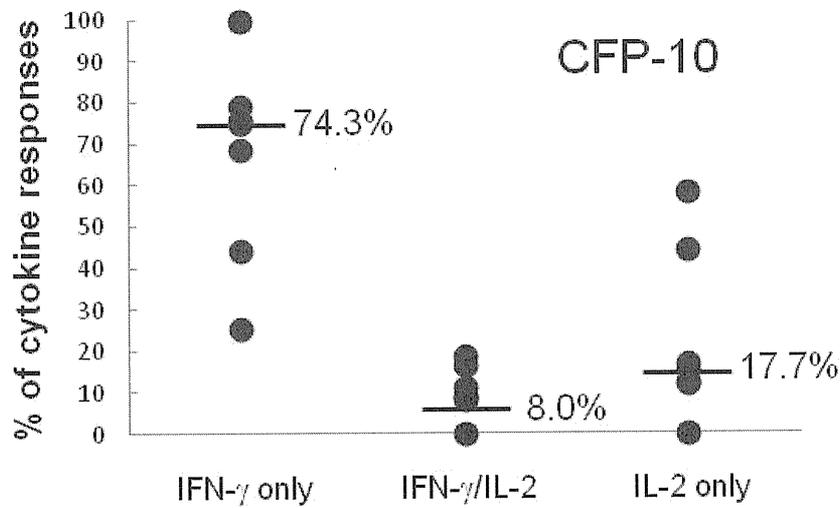
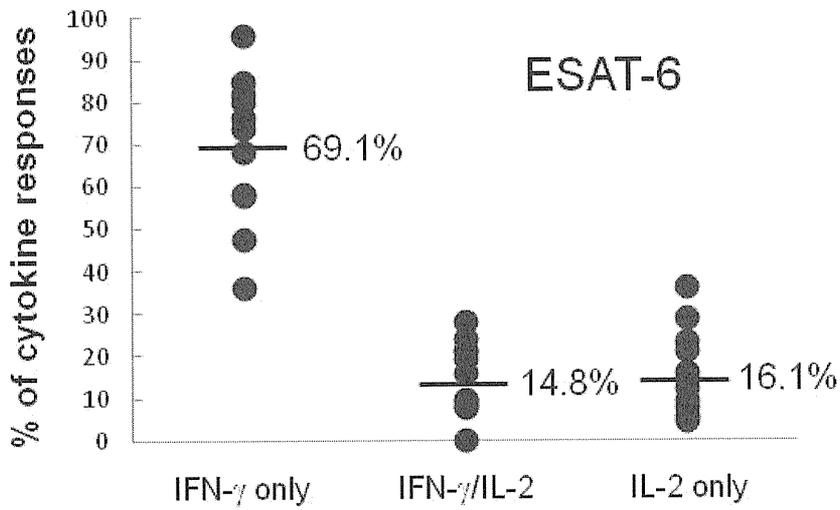


図2. 表1の数値をグラフ化した図。横線は、それぞれの平均値を表す。

研究分担者

御手洗聡 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科

研究要旨

結核患者との接触に由来する結核菌感染の可能性の判断や発病リスクの評価に関しては、結核菌の臨床的な毒力の強弱に関する情報が必要であるが、現状では接触時間や塗抹陽性度等の環境や宿主側の情報しか得られず、接触者健診の範囲の決定などに苦慮することが多い。今回結核菌の感染力及び増殖力を、標準株との相対性において評価することを目標として研究を開始した。また、毒力因子の一つである薬剤耐性について従来よりも迅速に診断可能な方法について検討した。

THP-1 細胞 (2×10^5 /ml) を phorbol myristate acetate (PMA) で活性化し、評価対象とする臨床分離結核菌を *M. tuberculosis* H37Rv と等量混合し、MOI 1 で活性化 THP-1 細胞と感染させ、0-5 日間共培養し、回収して CFU をカウントし、混合した結核菌の混合率を VNTR アリルプロファイルの違いから算出した。結果として、0-72 h 及び 0-120 h の時間範囲における混合比率の変化が臨床株のクラスターサイズと相関することを再確認し、さらに大規模な集団感染株が同じ評価系で「強毒性」と評価されることを確認した。

PMA 活性化 THP-1 細胞を使用した結核菌競合感染による *in vitro* 毒力評価系を確立し、全国から収集した臨床分離株によって、クラスターサイズと相対毒力の相関を示した。また非病原性株と集団感染株を使用した評価を実施し、一般的な疫学的概念に相応する毒力差を確認した。実験系の欠点としての相対比率測定にかかる時間（培養時間）の短縮についての技術開発は、目的の精度が得られなかったため、別の方法を検討中である。

疫学的状況を反映しうる比較的簡易な毒力評価系が確立した。今後は、接触者健診などの対策に必要なカットオフ値の設定などの検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

結核の感染や発病は宿主の免疫状態に強く影響されるが、結核菌側の因子はあまり評価されていない。結核感染の判断や治療に関して臨床的な毒力の強弱の評価が必要であるが、現状では接触時間や塗抹陽性度、薬剤感受性等の情報しか得られず、客観的で単純な指標が存在しない。この状況を打開するため、簡易で迅速な毒力評価法を開発することを目的とする。

二種類の異なる結核菌を同数・同時感染させて相対的感染・増殖力を比較して有意性をみた報告があり (Garcia de Viedma D, et. al. J Infect Dis. 2005; 192: 2059-65.)、*ex vivo* での毒力評価に利用できる可能性

が示されている。概念としては、二つの異なる菌株をマクロファージ等に同時に感染させ、相対的感染・増殖力を比較するものであり、感染性が相対的に高ければ、細胞への感染後の細胞内寄生菌量に反映される。また、細胞内部での増殖の差異を観察するため、感染7日後の相対的菌量を測定している。

今回の研究では、臨床分離結核菌の相対的感染力を *ex vivo/in vitro* での競合アッセイ（発育競合、感染競合、細胞内生存競合）を確立し評価することを最終目標とする。一次目標として、結核菌の競合感染評価系の確立を行う。二種以上の異なる結核菌を特定の細胞（マクロファージ等）に等量同時に感染させて培養し、最終的な増殖の差異を Genotyping を用

いて定量的に評価する。二次目標として、臨床的に感染性や増殖性の差異が疑われる二種類以上の結核菌について相対感染力・増殖力を評価し、臨床情報との相関性を検討する。

昨年度までに phorbol myristate acetate (PMA)及び IFN-gamma を用いて THP-1 細胞を活性化し、H37Rv をレファレンスとして臨床分離株と競合感染させる系を作製したが、今年度は実験系の簡素化と非病原性株及び大規模な集団感染をおこした結核菌株を使用するとの評価を実施した。

B. 研究方法

[細胞内競合感染による結核菌毒力評価の検討]

昨年度は THP-1 細胞 (RCB1189, 理研 BRC) を phorbol myristate acetate (PMA)及び IFN-gamma にて活性化したが、今回実験系の簡素化のため、PMA 100nM のみで THP-1 細胞を活性化した。その後二種類の異なる結核菌株を混合した上で感染させ、菌株間の競合を評価した。具体的には以下の様に実施した。

1. THP-1 細胞を RPMI1640+FBS にて培養し、 2×10^5 /ml 程度に調製する。
2. 24 ウェルのマイクロプレートに 2ml ずつ分注する。
3. THP-1 細胞を 100nM の PMA 存在下で 3 日間培養する (RPMI 1640+10% FCS)。
4. 細胞が接着していることを確認する。
5. Binding medium (138mM NaCl, 8.1mM Na_2HPO_4 , 1.5mM KH_2PO_4 , 2.7mM KCl, 0.6mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 5.5mM D-glucose) 2ml で 2 回洗滌する。3 回目に 2ml 加える。
6. 細胞の接着を確認する。
7. プレート一枚を 0.25%トリプシンで 37°C、30 分間処理し、細胞数を確認する。
8. H37Rv と臨床分離結核菌株を基本的に Middlebrook7H9/OADC+Tween80 培地にて振盪しながら OD 1.0 まで培養し、5.0 μm の親水性フィルターを通して分散させた後、それぞれ OD 0.2 に調製する。
9. それぞれの結核菌株と H37Rv を等量混合した

菌液を MOI 1 にて活性化した THP-1 細胞と混合する。37°Cで 3 時間培養する。

10. 接着していない結核菌を Binding medium で 1 回洗滌して除去する。
11. 新しい RPMI-1640+FBS 培地を 2ml 加える。
12. CO_2 5%存在下で 37°Cで培養する。
13. 0 (3h)、1、3、5 日目に 4 ウェルずつ培地を除去し、0.1% SDS 2ml で細胞を融解し、7H9 培地で 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} 希釈液を作製し、100 μl ずつ 7H10+OADC プレートで培養して菌量を測定する。
14. 20 コロニーを無作為に釣菌し、核酸を抽出した後二種の菌株間で VNTR のコピー数が異なるローカスについて PCR を行い、コピー数の差から二種類の結核菌の存在比率を算出する。

結核菌には、基準結核菌株である H37Rv を比較の基本株とし、対象として 5 種類の異なる臨床分離株を使用した。臨床分離株を選択するにあたり、日本全国から収集された結核菌 325 株の Supply-15 による VNTR の結果から、クラスターサイズの違いにより 5 種類の結核菌株を選択した (クラスターサイズ: 3-6)。また、クラスターを形成していない株も 1 株使用した。さらに非病原性株として *M. tuberculosis* H37Ra と過去に大規模な集団感染を引き起こした結核菌臨床分離株を使用した。この集団感染株は戦後最大とされる集団感染を引き起こした株であり、健診対象者 366 名、発病者と感染者併せて 178 名が報告されている。

[Real-Time PCR を用いた結核菌比定量系の検討]

一般に二種類以上の混合感染を分離・定量しようとする場合、検体を一度 Middlebrook 7H10 などの平板培地で培養し、発育したコロニーを数十個クロニングし、それぞれの生物学的特徴 (Phenotype/Genotype) を個々に調べることにより、相対的な含有量を推定する。しかし、この方法では固形培地上での培養に時間がかかるため、迅速な結果が得られない。そこで今回は、Real-time PCR による定量法を利用し、混合感染を相対的に定量する方

法を検討した。

VNTR は理論的にそれぞれの Locus における反復配列のコピー数を定量する方法である。この情報はデジタルな数字であり、各反復配列を 1 単位とすれば、これを 1 単位として反映するリポーターを設定し、複数の Locus を利用することで二つの未知数(二種の結核菌のそれぞれの菌量)に関する連立方程式を作成できる。

Strain A と Strain B のそれぞれについて、培養 t 時間後の菌の実数を $Ma(t)$ 及び $Mb(t)$ とする。さらに VNTR Locus 1 と Locus 2 の Strain A と Strain B における反復配列コピー数をそれぞれ a と c、及び b と d とする (表 1)。

表 1 VNTR Locus とコピー数

	Locus 1	Locus 2
Strain A	a	c
Strain B	b	d

a: strain A の Locus 1 のコピー数 (VNTR) b: strain B の Locus 1 のコピー数 (VNTR) c: strain A の Locus 2 のコピー数 (VNTR) d: strain B の Locus 2 のコピー数 (VNTR)

ここで、Real-time PCR から得られる情報としての Ct 値について、 Ct_1 : Locus 1 の Ct 値、 Ct_2 : Locus 2 の Ct 値とする。これらの値の関係は、理論上以下のようになる。

$$\text{Log}(Ma(t) \cdot a + Mb(t) \cdot b) = Ct_1 \cdot e_1 + f_1 \quad (\text{等式 1})$$

$$\text{Log}(Ma(t) \cdot c + Mb(t) \cdot d) = Ct_2 \cdot e_2 + f_2 \quad (\text{等式 2})$$

e_1 : Locus 1 の等式 1 に関する傾き

e_2 : Locus 2 の等式 2 に関する傾き

f_1 : Locus 1 の等式 1 に関する切片

f_2 : Locus 2 の等式 2 に関する切片

これにより、

$$Ma(t)/Mb(t) =$$

$$\frac{[d \cdot 10^{(e_1 \cdot Ct_1 + f_1)} - b \cdot 10^{(e_2 \cdot Ct_2 + f_2)}]}{[a \cdot 10^{(e_2 \cdot Ct_2 + f_2)} - c \cdot 10^{(e_1 \cdot Ct_1 + f_1)}]}$$

$$-c \cdot 10^{(e_1 \cdot Ct_1 + f_1)}$$

となる。

ローカス毎に TaqMan probe を設計し、それぞれのプライマーで Real-time PCR を実施した。今年度は

使用する試薬を変更し、Taqman universal mastermix II を使用した。

C. 結果

[細胞内競合感染による結核菌毒力評価の検討]

対象として使用した結核菌株は昨年とおなじであり、表 2 の通りである。

表 2 競合感染に使用した臨床分離株のクラスターサイズ

菌株名	クラスターサイズ
2E-1-9	1 (クラスター形成なし)
2A-3-6	3
2U-11-2	4
2I-1-3	5
2U-5-12	6 (評価対象中最大)

図 1 に Supply-15 による VNTR 結果から作製した Minimum spanning tree (MST) を示した。選択した株は比較的近縁の集団に属していた。

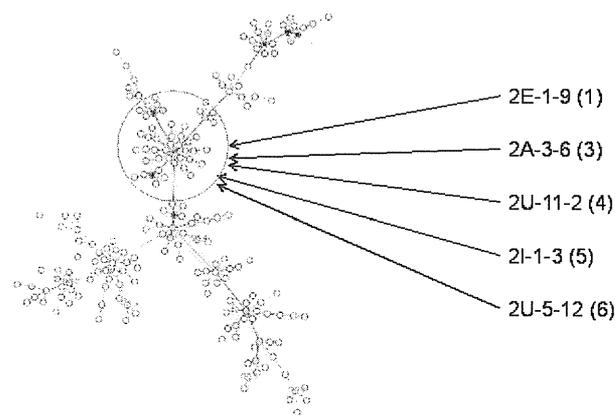


図 1 選択対象の臨床分離株の VNTR プロファイルによる MST

H37Rv との競合感染において、感染後 3 時間から 72 時間までの変化率とクラスターサイズをプロットすると、昨年の実験系と同様に図 2 の様な相関が認められた。(2I-1-3 についてはコロニー数少数につき解析より除外)

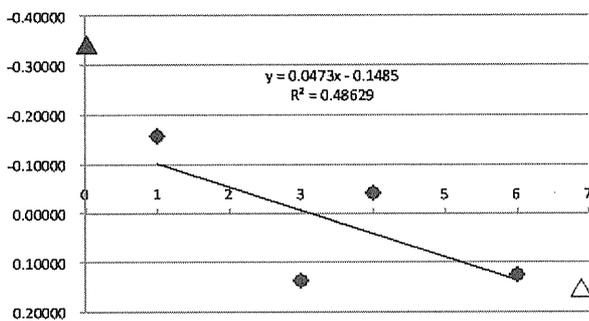


図2 クラスターサイズと比率変化率 (0-72h)

◆ 臨床分離菌 ▲ H37Ra △ 集団感染株 臨床分離株についてはクラスターサイズがわかっているので図上にプロット可能であるが、H37Ra と集団感染株のクラスターサイズはわからないためX軸上の位置は変化率からの推定

今回変更した実験系においても PMA と IFN-gamma による活性化 THP-1 細胞を使用した場合と同様の相関関係を認め、相関係数は $R^2=0.48629$ であった。この実験系において H37Ra の比率変化率 (0 - 72 h) は -0.337 であり、被検臨床分離株のいずれに対しても競合性が低かった。これに対して集団発生株では比率変化率 (0 - 72 h) は 0.15 であり、他の臨床分離株よりも H37Rv に対する競合性が強いという結果であった。

同様に 0-120 h での比率変化率についても検討し、図3のようになった。この場合は $R^2=0.77862$ となった。H37Ra は変化率 -0.537 であったが、集団感染株の変化率は -0.125 となり、中間程度の相対的競合性と評価された。

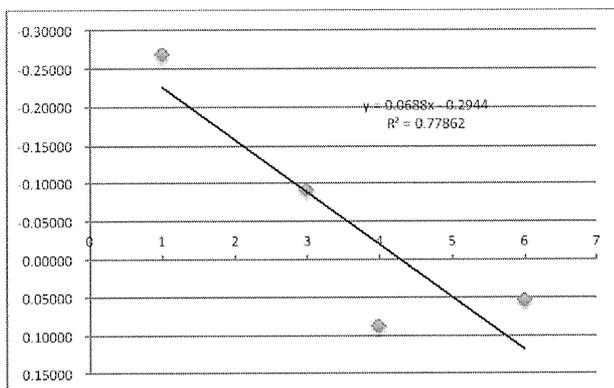


図3 クラスターサイズと比率変化率 (0-120h)

[Real-Time PCR を用いた結核菌比定量系の検討]

昨年同様 H37Rv を用いた増幅の安定性の検討から、MIRU 26 と VNTR 2074 を選択した。臨床分離株から抽出した DNA を定量後、等量混合してそれぞれのローカスについて Real-time PCR を実施した。

Strain 233 と 247 を DNA 量比 1.15 で混合して測定を行った。VNTR 2074 と MIRU26 における Strain 233 と 247 の VNTR コピー数は、それぞれ 3、5、3、7 であった。得られた Ct 値から算出した比率は再び 0 以下となり、目的とした精度は得られなかった。

D. 考察

結核菌の病原性 (毒力) を評価するための方法論として、競合感染実験系の検討を継続して実施した。

結果として、H37Rv を基準として被検臨床分離株の相対的な割合の変化をそれぞれの株のクラスターサイズと比較したところ、昨年同様に一定の相関 (クラスターサイズが大きいほど H37Rv に対して相対的な競合性が強い) が 0~72/120 時間の間で認められた。また、一般に「非病原性」とされている H37Ra 株は競合力が弱く、一方集団感染株は相対的競合力が強いという結果であった。昨年度の研究では 0-24h での変化 (減少あるいは増加) が相関していたことを考えると、競合性が明らかとなるまでの時間が長くなったことになる。これは THP-1 の活性化に IFN-gamma を使用しなかったことの影響と考えられたが、評価可能な時間の幅が広がったことは実践上有用であろうと考えられた。

今回の実験では、結核菌の「毒力」をどのように規定するかが問題であった。結核菌の毒力を感染→潜在→増殖→発病の全てのプロセスの結果として考えれば、特に現在日本の高齢者から分離される結核菌は、過去の結核高慢期に感染が成立して現在発病していると思われるため、上記のプロセスを反映していると考えられる。さらに過去の高蔓延期には感染機会が多かったと思われることから、異なる結核菌間での競合もあったと思われ、それらの過程を経過して現在分離され、なおかつ広域にクラスターを形成する結核菌株は「毒力」が強いと考えられる。この仮定にそって行った今回の実験はクラスターサイズと競合力の相関という形である程度仮説を

支持すると思われた。また同時に評価した非病原性株と集団感染株の競合力の結果も、上記のような概念としての毒力を反映したものとなっている。疫学的な状況との相関を *in vitro* で推定することを目的とすれば、今回の評価系は一定の価値を持つ可能性があると思われる。接触者健診の実施範囲の決定などに役立つ可能性があるが、今後の問題として「閾値」をどのように決定するか考える必要がある。例えば集団感染株とそれ以外の株を多数比較し、カットオフ値を決めるといった方法が考えられる。

技術的な問題として、二種の結核菌の存在比を算出するために VNTR アリルプロファイルを事前に調べておき、さらに競合感染後に結核菌を培養してコロニーをサンプリングし、アリルプロファイルの違いによって比率を決定するプロセスに時間がかかることが挙げられる。これを迅速化する目的で、やはりアリルプロファイルの違いに基づいたリアルタイム定量を試みたが、目的の精度が得られなかった。代替する方法として、蛍光色素を組み替えた H37Rv を使用し、顕微鏡下で菌数をランダムにカウントする方法を検討しており、引き続き評価を行いたい。

E. 結論

PMA 活性化 THP-1 細胞を使用した結核菌競合感染による *in vitro* 毒力評価系を確立し、全国から収集した臨床分離株によって、クラスターサイズと相対毒力の相関を示した。また非病原性株と集団感染株を使用した評価を実施し、一般的な疫学的概念に相応する毒力差を確認した。

実験系の欠点としての相対比率測定にかかる時間（培養時間）の短縮についての技術開発は、目的の精度が得られなかったため、別の方法を検討中である。

疫学的状況を反映しうる比較的簡易な毒力評価系が確立した。今後は、接触者健診などの対策に必要なカットオフ値の設定などの検討が必要と考えられた。

F. 健康危惧情報

本研究においては、結核菌の感染の危険があると考えられた。全ての結核菌（生菌）の取り扱いには感染症法及びバイオハザード指針に従って BSL3 レベルの実験室内で安全キャビネットを用いて行った。

G. 研究発表

西山裕之, 青野昭男, 菅本鉄広, 近松絹代, 水野和重, 山田博之, 御手洗聡. Microscopic Observation Drug-Susceptibility assay (MODS)による薬剤感受性検査の精度評価. 第86回日本結核病学会総会 東京 2011年6月2-3日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

<研究協力者>

青野昭男・近松絹代・山田博之

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科

西山裕之

結核予防会国際部