

体外診断用医薬品

インターフェロン - γ 遊離試験キット QuantiFERON® TB ゴールド プラス

* 使用前に本添付文書をよく読むこと

*【重要な基本的注意】

1. 採血時は室内温度（22±5℃）になった QuantiFERON TB ゴールド プラス チューブ（以下、QFT プラスチューブ）を使用すること。〔QFT プラスチューブの温度により QFT プラスチューブ内の圧力が変化し、QFT プラスチューブ内の内容物等が患者に逆流するおそれがある。また、採血時の温度が高いと、QFT プラスチューブの分離剤が軟化し、分離剤の成分と血液が混ざり誤った検査結果となるおそれがある。〕またはヘパリン真空採血管を使用して採血し、次いで QFT プラスチューブに血液を分注すること。
2. 採血量は、QFT プラスチューブを使用して採血する場合は、QFT プラスチューブラベル内の黒い印の範囲（0.8～1.2 mL）であること。血液の量がこの範囲を外れた場合は、再採血すること（【用法・用量】3. 操作法参照）。
3. QFT プラスチューブへの採血または分注後は各 QFT プラスチューブを上下に5秒間または10回振って混合すること。QFT プラスチューブの内表面全体が血液で覆われていることを確認すること。ただし、QFT プラスチューブを強く振りすぎないように注意すること（【用法・用量】3. 操作法参照）。
4. 培養前の血液検体は、QFT プラスチューブで移送の場合は22±5℃で保存し、冷蔵しないこと。採血後の血液検体は、できるだけ早く（採血後16時間以内に）37℃のインキュベーターに入れること〔T細胞の活性が低下しIFN- γ 産生応答が低くなる可能性がある。そのため感度が低下し正確な検査結果が得られないおそれがある。〕。ヘパリン真空採血管で移送の場合は、【操作上の注意】参照のこと。

*【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的に使用しないこと。
2. 本検査は結核感染の診断補助であり、診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて担当医師が総合的に判断すること。
3. 添付文書から逸脱した方法では、正しい結果が得られないので、使用前に添付文書をよく読むこと。添付文書以外の使用方法については保証しない。
4. 本検査は、細胞性免疫応答を利用した検査であり、HIV感染、AIDS、免疫系低下の可能性のある疾患、免疫抑制剤等により免疫抑制されている被検者では、本検査結果が偽陰性を示すことが考えられるので、判定に注意すること。
5. QuantiFERON TB ゴールド プラス チューブの添付文書およびマイクロプレートリーダー等の使用する機器の取扱説明書をよく読んでから使用すること。

*【形状・構造等（キットの構成）】

本品は下記試薬で構成されており、QFT プラスチューブ部は QuantiFERON TB ゴールド プラス チューブとして医療機器の認証を取得している（認証番号：229AFBZX00040000）。

ステージ1用（QFT プラスチューブ部）	
1. QFT TB1 チューブ（緑色キャップ） （QuantiFERON TB1） ・抗原（結核菌特異蛋白 ESAT-6、CFP-10の長鎖ペプチド） ・ヘパリンリチウム	25本・50本
2. QFT TB2 チューブ（黄色キャップ） （QuantiFERON TB2） ・抗原（結核菌特異蛋白 ESAT-6、CFP-10の長鎖ペプチド および CFP-10の短鎖ペプチド） ・ヘパリンリチウム	25本・50本
3. QFT Nil チューブ（灰色キャップ、陰性コントロール） （QuantiFERON Nil） ・ヘパリンリチウム	25本・50本
4. QFT Mitogen チューブ（紫色キャップ、陽性コントロール） （QuantiFERON Mitogen） ・ヘパリンリチウム	25本・50本
ステージ2用（ELISA 部）	
5. 抗ヒト IFN- γ 抗体固相化プレート （QuantiFERON Microplate Strips） ・抗ヒトインターフェロン - γ モノクローナル抗体 （動物種：マウス）	96ウェル × 2枚

6. ヒト IFN- γ 標準（凍結乾燥品） （QuantiFERON Interferon- γ Standard） ・遺伝子組換えヒトインターフェロン- γ ・チメロサル	1バイアル
7. 希釈緩衝液 （QuantiFERON Green Diluent） ・チメロサル	30 mL × 1本
8. HRP標識抗ヒト IFN- γ 抗体（凍結乾燥品） （QuantiFERON Conjugate） ・ペルオキシダーゼ標識抗ヒトインターフェロン - γ モノ クローナル抗体（動物種：マウス） ・チメロサル	1バイアル
9. 濃縮洗浄用緩衝液 （QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate）	100 mL × 1本
10. 酵素基質液 （QuantiFERON Enzyme Substrate Solution） ・3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン ・過酸化水素水	30 mL × 1本
11. 酵素反応停止液 （QuantiFERON Enzyme Stopping Solution） ・硫酸	15 mL × 1本

【使用目的】

全血の結核菌特異蛋白との共培養による遊離インターフェロン - γ の測定

1. 活動性結核の診断補助
X線所見や喀痰塗抹標本で結核を確定できず、他の臨床所見等で、結核を疑う者
2. 潜在結核の診断補助
(1) 接触者健康診断として、集団発生の際の感染性結核患者との接触者
(2) 感染性結核患者との接触機会の多い医療従事者

*【測定原理】

結核は、結核患者からの飛沫核に含まれる結核菌の感染によって起こる感染症である。しかし感染者のうち発病するのは一部で、その他の感染者は発病しない（潜在性結核感染）。体内に結核菌が侵入すると、結核菌はマクロファージに貪食され、その抗原情報がT細胞に提示される。これによりT細胞は結核菌の抗原で感作される。この結核感染者の血液を結核菌特異抗原とともに培養することにより、血液中の感作T細胞からインターフェロン - γ (IFN- γ) が分泌される。この分泌された IFN- γ を ELISA 法を用いて測定することにより、結核菌の感染の有無を診断する¹⁾。本品で使用する結核菌特異抗原（ESAT-6、CFP-10）は、すべての BCG 株と *M. kansasii*, *M. szulgai* および *M. marinum* を除くほとんどの非結核性抗酸菌には存在しない。このため BCG ワクチン接種の影響を受けずに、結核菌感染を診断することができる^{2)～6)}。

本品には QFT TB1 チューブおよび QFT TB2 チューブの2種類の QFT TB チューブがある。QFT TB1 チューブには CD4+T 細胞の細胞性免疫反応を誘導することを目的とした ESAT-6 および CFP-10 のペプチドが入っているのに対し、QFT TB2 チューブには QFT TB1 チューブに入っているペプチドの他に、CD8+細胞傷害性T細胞の細胞性免疫反応を誘導することを目的とした別のペプチドも入っている。結核感染の自然経過において、CD4+T細胞は IFN- γ の分泌を介して免疫制御の中できわめて重要な役割を果たしている。CD8+T細胞は、IFN- γ およびその他の可溶性因子を産生することによりマクロファージを活性化させ、結核菌の増殖を抑制し、感染細胞を死滅させ、細胞内の結核菌を直接的に溶解するという結核菌に対する宿主防御に関与している^{7)～9)}。

結核菌に特異的に反応する CD8+T 細胞は潜在性結核感染症患者および活動性結核患者において検出されており、IFN- γ を産生している^{10)～12)}。

さらに、ESAT-6 および CFP-10 特異的 CD8+T 細胞は潜在性結核感染症に対してより高頻度に活動性結核患者に認められ、また最近の結核菌への暴露との関連性があるとの報告がある^{13)～15)}。さらに、結核菌特異的 CD8+T 細胞の IFN- γ 産生は、HIV と重感染した活動性結核^{16), 17)} および小児の結核に認められてきた¹⁸⁾。

本品による測定は、2つのステージで行われる。ステージ1では、QFT プラスチューブ部の各 QFT プラスチューブに採取または分取した血液を静置培養する。被検者が結核菌に感染していると、感作T細胞がIFN- γ を産生する。ステージ2は、この全血から上清（血漿検体）を採取し、サンドイッチ酵素免疫測定（ELISA）法にてIFN- γ 量を測定する。予め、IFN- γ 標準希釈系列を作製しておき、検体と共に測定する。得られた吸光度から、IFN- γ の標準曲線を作成し、検体中のIFN- γ 量を算出する。血漿のIFN- γ 濃度（IU/mL）から、それぞれQFT Nil チューブ血漿のIFN- γ 濃度（IU/mL）を減じ、それらの測定値を結果の解釈に用いる。【測定結果の判定法】3. 結果の解釈参照。）

**【操作上の注意】

- 下記の留意事項から逸脱した検体は、本検査の結果が正しく得られないことがあるので使用しない。
 - QFT プラスチューブに採血した血液検体の移送は22±5℃で行うこと。QFT プラスチューブは出来るだけ早く（採血後16時間以内に）、37℃のインキュベーターに入れること。
 - ヘパリン真空採血管に採血した場合は3時間以内に2～8℃で冷蔵保存すること（48時間保存可）。冷蔵保存後は室温に戻し、QFT プラスチューブへ分注し、2時間以内に37℃のインキュベーターに入れること。
 - 分注操作は清浄な環境下で行うこと。
- 5%以上の溶血が見られる検体は本検査結果が偽陽性となる場合があるので使用しない。
- 妨害物質
本検査において、各妨害物質は以下の濃度まで影響を与えない。
ビリルビンF：19.7 mg/dL
ビリルビンC：21.8 mg/dL
乳び：1890 FTU
ヘモグロビン：487 mg/dL
- 交差反応性
IL-1 β は250 ng/mL、IL-2は50 U/mL、その他のサイトカイン（IL-1 α 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12）は50 ng/mLまで、本品の測定値に影響を与えない。

**【用法・用量（操作方法）】

- 試薬の調製方法
 - ステージ1
QFT プラスチューブは、そのまま用いる。
 - ステージ2
HRP 標識抗ヒトIFN- γ 抗体を除くすべての構成試薬は、使用する前に22±5℃に少なくとも60分間放置した後、調製する。
 - 抗ヒトIFN- γ 抗体固相化プレートの準備
開封し、そのまま用いる。使用しないストリップは枠からはずし、すみやかに乾燥剤入りの袋に戻し、密封して次回使用するまで2～8℃で保存する。
標準曲線作成用に少なくとも1ストリップ、被検者の数に十分なストリップ（プレートの配置例は図1を参照）が必要である。使用后、未使用のストリップが残る場合は、枠と蓋は次回の測定に必要であるため残す。

図1 検体配置例

列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	3N	5N	7N	9N	S1	S1	13N	15N	17N	19N	21N
B	1TB1	3TB1	5TB1	7TB1	9TB1	S2	S2	13TB1	15TB1	17TB1	19TB1	21TB1
C	1TB2	3TB2	5TB2	7TB2	9TB2	S3	S3	13TB2	15TB2	17TB2	19TB2	21TB2
D	1M	3M	5M	7M	9M	S4	S4	13M	15M	17M	19M	21M
E	2N	4N	6N	8N	10N	11N	12N	14N	16N	18N	20N	22N
F	2TB1	4TB1	6TB1	8TB1	10TB1	11TB1	12TB1	14TB1	16TB1	18TB1	20TB1	22TB1
G	2TB2	4TB2	6TB2	8TB2	10TB2	11TB2	12TB2	14TB2	16TB2	18TB2	20TB2	22TB2
H	2M	4M	6M	8M	10M	11M	12M	14M	16M	18M	20M	22M

S1：標準1、S2：標準2、S3：標準3、S4：標準4
1N：検体1のQFT Nil チューブ血漿
1TB1：検体1のQFT TB1 チューブ血漿
1TB2：検体1のQFT TB2 チューブ血漿
1M：検体1のQFT Mitogen チューブ血漿

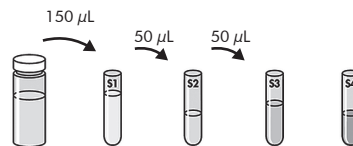
② ヒトIFN- γ 標準液の調製および希釈系列の調製

ヒトIFN- γ 標準をバイアルラベルに記載されている量の精製水で溶解し、「ヒトIFN- γ 標準液」を調製する。このとき泡立らないよう穏やかに攪拌し、完全に溶解させる。規定量で溶解したときのヒトIFN- γ 標準液の濃度は、8 IU/mL となる。

＜注意＞

- 溶解後のヒトIFN- γ 標準液の容量はロット毎に異なる。
- 希釈緩衝液を用いて、②で調製した「ヒトIFN- γ 標準液」から4希釈系列（S1～S4）を調製する。（図2参照）
S1（標準1）は4 IU/mL、S2（標準2）は1 IU/mL、S3（標準3）は0.25 IU/mL および S4（標準4）は0 IU/mL（希釈緩衝液のみ）のIFN- γ を含有する。標準は少なくとも二重測定する。
- ヒトIFN- γ 標準希釈系列はELISAを行う毎に作製する。
- 溶解後のヒトIFN- γ 標準液（8 IU/mL）は2～8℃で3ヵ月間保存できる。溶解日を記録しておく。

図2 標準希釈系列の調製



標準液の調製法

- 4本のサンプルチューブに「S1」、「S2」、「S3」、「S4」と記載する。
 - 150 μ Lの希釈緩衝液をS1、S2、S3、S4に加える。
 - 150 μ LのヒトIFN- γ 標準液をS1に加えよく攪拌する。
 - 50 μ LのS1をS2に加えよく攪拌する。
 - 50 μ LのS2をS3に加えよく攪拌する。
 - 希釈緩衝液のみをゼロ標準（S4）とする。
- ③ HRP 標識抗ヒトIFN- γ 抗体液の調製
HRP 標識抗ヒトIFN- γ 抗体を精製水0.3 mLで溶解し、HRP 標識抗ヒトIFN- γ 抗体濃縮液を調製する。このとき泡立ないように穏やかに攪拌して完全に溶解させる。使用濃度のHRP 標識抗ヒトIFN- γ 抗体液は、表1のHRP 標識抗ヒトIFN- γ 抗体液の調製表を参考に、HRP 標識抗ヒトIFN- γ 抗体濃縮液の必要量をスピッツ管に取り、希釈緩衝液で希釈し調製する。

表1 HRP標識抗ヒトIFN- γ 抗体液の調製表

ストリップの本数	濃縮液の量 (μ L)	希釈緩衝液の量 (mL)
2	10	1.0
3	15	1.5
4	20	2.0
5	25	2.5
6	30	3.0
7	35	3.5
8	40	4.0
9	45	4.5
10	50	5.0
11	55	5.5
12	60	6.0

＜注意＞

- 調製の際は、添付の希釈緩衝液のみを用いる。
 - 使用濃度に調製したHRP 標識抗ヒトIFN- γ 抗体液は、6時間以内に使用する。
 - 溶解後の残ったHRP 標識抗ヒトIFN- γ 抗体濃縮液は、使用后ただちに2～8℃に戻し、3ヵ月以内に使用する。溶解日を記録しておく。
- ④ 洗浄用緩衝液の調製
濃縮洗浄用緩衝液を精製水で20倍に希釈後、よく攪拌し洗浄用緩衝液とする。2Lの洗浄用緩衝液を調製するのに十分な量の濃縮洗浄用緩衝液が添付してある。
- ＜注意＞
- 使用濃度に調製した洗浄用緩衝液は、22±5℃で2週間保存できる。調製日を記録しておく。
- ⑤ 酵素基質液、酵素反応停止液、希釈緩衝液は、そのまま用いる。

2. 必要な器具・機器・試薬等

(1) ステージ1

- 直接QFT プラスチューブを用いて採血する場合は、翼状針あるいはシリッジ
- ヘパリン真空採血管を用いて採血する場合は、ヘパリン真空採血管、マイクロピペットおよびチップ
- 37℃インキュベーター（CO₂インキュベーターでなくてもよ

い)

- ・遠心分離器
 - ・感染の危険性のある血液を取り扱うための手袋、作業衣服、保護眼鏡等
- (2) ステージ 2
- ・マイクロピペット (10 μ L ~ 1000 μ L 量りとれるもの) およびチップ
 - ・8 チャンネルマイクロピペット (50 μ L および 100 μ L) およびチップ
 - ・サンプルチューブおよびチューブ立てなど標準希釈系列の調製が可能なもの
 - ・スピッツ管
 - ・メスシリンダー (1 L または 2 L)
 - ・ポリプロピレン製リザーバー
 - ・滅菌済みメスピペット (5 mL または 10 mL)
 - ・ミキサー
 - ・タイマー
 - ・マイクロプレートシェーカー
 - ・マイクロプレートウォッシャー (自動ウォッシャーを推奨)
 - ・マイクロプレートリーダー (フィルター: 測定用 450 nm、対照用 620 ~ 650 nm)
 - ・感染の危険性のある血液を取り扱うための手袋、作業衣服、保護眼鏡等
 - ・精製水

3. 操作法

(1) ステージ 1

- ① 次の①-1 または①-2 のいずれかの方法にて、QFT プラスチューブに血液を採取する。
- ①-1 QFT プラスチューブへ直接採血の場合 (図 3 参照)
- 被検者の血液を直接静脈穿刺により、翼状針あるいはシリンジを用いて、各 QFT プラスチューブに 1 mL ずつ採取し、よく混和する。血液を採取した後はすみやかに②に移行する。
- ・翼状針を使用して採血する場合は以下の事項に注意すること。
- 1) QFT プラスチューブの位置が上下に動かないようにすること。[QFT プラスチューブ内圧と静脈圧の関係から QFT プラスチューブ内の内容物が逆流する可能性がある。]
 - 2) QFT プラスチューブで採血を開始する前に、他の一般的な真空採血管 (パージ用採血管) を用いて翼状針チューブ内の空気を抜き、翼状針チューブに血液が満たされていることを確認すること。
 - 3) QFT プラスチューブを QFT プラスチューブラベルの黒い印が見えるように立てた状態にし、この黒い印の範囲 (0.8 ~ 1.2 mL) まで採血された時に QFT プラスチューブをはずすこと。
- ・シリンジを使用して採血する場合は以下の事項に注意すること。
- 1) シリンジ採血後、直ちにそれぞれの QFT プラスチューブに黒い印の範囲 (0.8 ~ 1.2 mL) まで分注する。
 - 2) 分注時は針刺し事故および血液凝固に十分注意すること。
 - 3) 安全面から、注射針と QFT プラスチューブのキャップを外し、シリンジから QFT プラスチューブへ泡立てないように血液を分注する方法が望ましい。分注後、もとと同じキャップをしっかりと QFT プラスチューブに再装着してすみやかに②に移行する。(QFT プラスチューブの添付文書参照)
- ・QFT プラスチューブは出来るだけ早く (採血後 16 時間以内に)、37°C のインキュベーターに入れる。
 - ・ホルダーを使用した直接採血は、採血量が過剰、あるいは過少になることがあり推奨しない。

図3

各QFTプラスチューブへ1mLずつ採血	上下に5秒または10回振って混合	保存	上下に5秒または10回振って混合	培養	ELISA
		~16時間		16~24時間	
		22±5°C		37±1°C	

- ①-2 ヘパリン真空採血管による 1 本採血の場合 (図 4 参照)
- ヘパリン真空採血管 1 本に 5 mL 以上血液を採取し、転倒混和後、3 時間以内に冷蔵保管する。2 ~ 8°C で 48 時間まで保存できる。冷蔵保存した検体は室温に戻し、各 QFT プラスチューブそれぞれに 1 mL ずつ血液を分注する。

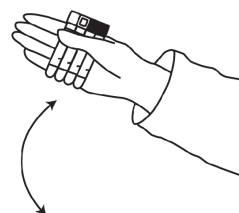
図4

ヘパリン真空採血管へ5mL以上採血	転倒混和	保存	室温に戻し転倒混和後、QFTプラスチューブへ1mLずつ分注	上下に5秒または10回振って混合	培養	ELISA
	~3時間	~48時間		~2時間	16~24時間	
	22±5°C	2~8°C		22±5°C	37±1°C	

- ・真空採血管はヘパリンリチウムまたはヘパリンナトリウム採血管を使用すること。
- ・ヘパリン以外の抗凝固剤は IFN- γ 産生への影響があるため使用しないこと。
- ・使用する真空採血管の添付文書に従い血液を採取すること。
- ・QFT プラスチューブに血液を分注する前に真空採血管を十分転倒混和し、血液を均等化すること。
- ・QFT プラスチューブへの分注については、【操作上の注意】を参照のこと。

- ② 血液が採取された QFT プラスチューブを上下に 5 秒間または 10 回振って混合する。QFT プラスチューブ内壁にコーティングされているヘパリンリチウムと抗原を、採血後すみやかに血液と完全に混合することが最も重要である。QFT プラスチューブを激しく振る必要はないが、QFT プラスチューブの内表面全体が血液で覆われていることを確認すること。血液が泡立つことがあるが、差し支えない。
- ・QFT プラスチューブを強く振りすぎると、分離剤の成分が血液と混ざり、誤った結果になることがあるので注意する。
 - ・QFT プラスチューブの振り方については、図 5 を参照のこと。

図 5 QFT プラスチューブの振り方



- ・QFT プラスチューブのラベルに適宜被検者の情報を記入する。
- ③ QFT プラスチューブを立てた状態で 37°C のインキュベーターで 16 ~ 24 時間静置培養する。
- ・培養直前に再度チューブを上下に 5 秒間または 10 回振る、あるいは 10 回転倒攪拌して再混合すること。
 - ・インキュベーターは、CO₂ あるいは加湿機能が必要としない。
- ④ 培養後 QFT プラスチューブを RCF 2,000 ~ 3,000 ($\times g$) で 15 分間遠心分離する。ゲルにより血漿と細胞を分離できる。もし分離できなかった場合は、QFT プラスチューブを再度高い回転数で遠心分離する。
- ・培養後の QFT プラスチューブは、遠心分離前に 4 ~ 27°C で 3 日間保存できる。
 - ・それぞれの採血管から培養上清 (血漿) を採取し、血漿検体とする。
 - ・血漿検体は、QFT プラスチューブから直接本品の ELISA に使用できる。
 - ・血漿検体は、2 ~ 8°C で 28 日間、-20°C 以下 (好ましくは -70°C 以下) で少なくとも 3 ヶ月間保存可能である。
 - ・血漿検体は遠心分離後の QFT プラスチューブのまま、あるいはサンプルチューブに入れ、ELISA を行うまで保存することができる。ただし、血漿検体を QFT プラスチューブに入れたまま凍結保存しないこと。
 - ・血漿検体をサンプルチューブに移し替えるときは、分離剤および沈殿物を吸い上げないように注意する。また、検体の流出と蒸発防止のためにシールしておく。

(2) ステージ 2

- ① 測定前に血漿検体を 22±5°C に少なくとも 60 分間放置する。凍結保存されていた血漿検体はよく攪拌する。
- ② HRP 標識抗ヒト IFN- γ 抗体液を抗ヒト IFN- γ 抗体固相化プレートの各ウェルに 50 μ L ずつ分注する。
- ③ 血漿検体を 50 μ L ずつ分注する。QFT プラスチューブから直接血漿検体を採取するときは、分離剤および沈殿物が混入しないように注意する。汚染を防ぐため、チップはウェルごとに交換する。次にヒト IFN- γ 標準液の各希釈濃度 (S1 ~ S4) を 50 μ L ずつ分注する (配置例は図 1 を参照)。
- ④ プレートに蓋をし、マイクロプレートシェーカーを用いて 1 分間よく混合する。内容物が飛散しないよう注意する。

- ⑤ 蓋をしたまま、22±5℃で 120±5 分間反応させる。反応中は直射日光を避けること。
- ⑥ 反応終了後に、各ウェルを 400 μL の洗浄用緩衝液で少なくとも 6 回洗浄する。自動プレートウォッシャーの使用を推奨する。
・洗浄は非常に重要である。洗浄は各サイクルで各ウェルの最上部まで洗浄用緩衝液を完全に満たす。各サイクルで少なくとも 5 秒間浸漬すること。
- ⑦ プレートを逆さにしてペーパータオルの上で軽く叩いて洗浄用緩衝液を完全に除去する。
- ⑧ 各ウェルに酵素基質液を 100 μL ずつ添加し、プレートに蓋をし、マイクロプレートシェーカーを用いて 1 分間よく混合する。
- ⑨ 蓋をしたまま、22±5℃で 30 分間反応させる。この際、直射日光を避けること。
- ⑩ 反応終了後、⑧で酵素基質液を添加した時と同じ順序と時間間隔で各ウェルに酵素反応停止液を 50 μL ずつ加えてよく混合する。
- ⑪ 反応停止後 5 分以内に各ウェルの吸光度（OD）（測定波長：450 nm、対照：620～650 nm）をマイクロプレートリーダーで測定する。この吸光度の値から IFN-γ の標準曲線を作成し、検体中の IFN-γ の濃度を算出する。

＊【測定結果の判定法】

1. 解析ソフトウェアを使用する場合
本検査の測定結果とデータの計算結果の解析に用いる QuantiFERON TB ゴールド プラス解析ソフトは弊社の「QFT ウェブサイト」から入手できる。
このソフトは、測定の品質管理評価、標準曲線の作成とそれぞれの被検者の結果を基に判定を行う（詳細は 3. 結果の解釈参照）。
2. 解析ソフトを使用せず、市販の表計算プログラムを使用する場合
- (1) 標準曲線の作成と検体の値
- ① それぞれのプレートで 2 重測定したヒト IFN-γ 標準液（S1～S4）の吸光度の平均値を計算する。
- ② 標準の IFN-γ 濃度（IU/mL）の自然対数値（x 軸）に対応する平均吸光度の自然対数値を y 軸にプロットし、log-log 標準曲線を作図する。このとき S4（0 IU/mL）は除外する。
- ③ 回帰分析により最適な標準曲線を求める。最適な回帰式は $Y = a(X) + b$ で表される。Y は各血漿検体の吸光度の自然対数値、X は IFN-γ 濃度（IU/mL）の自然対数値、a は変数 X に対する傾き、b は Y 軸の切片である。
- ④ 標準曲線から、それぞれの検体の吸光度に対する IFN-γ 濃度（IU/mL）を計算する。
- ⑤ これらの計算は、マイクロプレートリーダー付属のソフト、標準的な表計算ソフトあるいは統計ソフトで行うこともできる。
- ⑥ これらのソフトで回帰式、標準の変動係数（%CV）および標準曲線の相関係数（r）を計算することを推奨する。
- (2) 試験の品質管理
以下の基準に適合しなかった場合は再試験を実施すること。解析ソフトは、これらの試験の検証を行うことができる。
- ① ヒト IFN-γ 標準液（S1）の吸光度は 0.600 以上である。
- ② ヒト IFN-γ 標準液（S1）と（S2）の吸光度の変動係数（%CV）は 15% 以下である。
- ③ ヒト IFN-γ 標準液（S3）と希釈緩衝液（S4）の吸光度は、それぞれの吸光度の平均の ±0.040 以内である。
- ④ IFN-γ の標準曲線の相関係数（r）は 0.98 以上である。希釈緩衝液（S4）の平均吸光度は 0.150 以下である。平均吸光度が 0.150 より大きい場合はプレートの洗浄工程を検証すること。
- (3) 結果の計算
各検体の測定値は、QFT TB1 チューブ血漿、QFT TB2 チューブ血漿と QFT Mitogen チューブ血漿の IFN-γ 濃度（IU/mL）から、それぞれ QFT Nil チューブ血漿の IFN-γ 濃度（IU/mL）を減じて求める。これらの測定値を結果の解釈に用いる。
 $TB1 \text{ 値 (IU/mL)} = \text{IFN-}\gamma \text{ TB1}^{\text{注1)}} - \text{IFN-}\gamma \text{ N}^{\text{注4)}} \\ TB2 \text{ 値 (IU/mL)} = \text{IFN-}\gamma \text{ TB2}^{\text{注2)}} - \text{IFN-}\gamma \text{ N}^{\text{注4)}} \\ \text{Mitogen 値 (IU/mL)} = \text{IFN-}\gamma \text{ M}^{\text{注3)}} - \text{IFN-}\gamma \text{ N}^{\text{注4)}} \\ \text{Nil 値 (IU/mL)} = \text{IFN-}\gamma \text{ N}$

注 1) IFN-γ TB1：QFT TB1 チューブ血漿の IFN-γ 濃度（IU/mL）
注 2) IFN-γ TB2：QFT TB2 チューブ血漿の IFN-γ 濃度（IU/mL）
注 3) IFN-γ M：QFT Mitogen チューブ血漿の IFN-γ 濃度（IU/mL）
注 4) IFN-γ N：QFT Nil チューブ血漿の IFN-γ 濃度（IU/mL）

3. 結果の解釈

本検査の判定方法ならびに結果は、以下の基準による：

Nil値 (IU/mL)	TB1値 (IU/mL)	TB2値 (IU/mL)	Mitogen値 (IU/mL) *1	結果	解釈
8.0 以下	0.35以上 かつNil値 の25%以上	不問	不問	陽性	結核感染を 疑う
	不問	0.35以上 かつNil値 の25%以上			
	0.35未満、あるいは 0.35 以上かつNil値の25%未満		0.5以上	陰性	結核感染し ていない
			0.5未満	判定 不可	結核感染の 有無につい て判定でき ない
8.0を 超える*2	不問				

*1 QFT Mitogen（場合によっては QFT TB 抗原）の応答は、通常マイクロプレートリーダーの測定範囲外であっても、これは試験結果に影響はない。10 IU/mL を超える値は、解析ソフトでは >10 IU/mL と報告される。
*2 Nil 値が 8.0IU/mL を超える場合は、測定範囲外である可能性があり、判定不可とする。

4. 判定上の注意
- (1) 本検査の結果が陰性の場合であっても、潜在性結核感染あるいは結核の可能性を否定するものではない。感染の段階（例えば、細胞性免疫応答が進展する前に得られた検体）、合併症により免疫機能に影響を受けている状態、採血後の検体の不適切な取り扱い、測定操作の間違いや他の免疫学的要因により、偽陰性を示すことがある。
- (2) 本検査の結果が陽性の場合であっても、被検者の病歴、臨床所見に基づいて、総合的に判断すること。不適切な試験操作により、偽陽性を示すことがある。
- (3) 本検査の結果が陽性であった場合、塗抹検査や培養検査、胸部 X 線検査等により活動性結核の診断を行うこと。
- (4) ESAT-6 および CFP-10 は、すべての BCG 株とほとんどの非結核性抗酸菌に存在しないが、*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* には ESAT-6、CFP-10 の存在が知られているため、これらの感染によっても、本検査結果が陽性となることがある。結核菌と非結核性抗酸菌との鑑別をするためには、別の方法により菌の同定を行うこと。
- (5) 本検査から得られた結果は、各被検者の疫学的背景、現在の臨床所見および他の検査結果と併せて判断しなければならない。
- (6) 血中 IFN-γ 値が異常に高い場合、異好性抗体が存在する場合は、正しい測定結果を示さないことがある。

＊【性能】

1. 感度試験
- (1) 4 IU/mL の IFN-γ 標準液（S1）を試料として測定するとき、その吸光度は 0.600 以上である。
- (2) 0 IU/mL の希釈緩衝液（S4）を試料として測定するとき、その吸光度は 0.150 以下である。
2. 正確性試験
- (1) 4 IU/mL の IFN-γ 標準液（S1）を試料として測定するとき、その吸光度は 0.600 以上である。
- (2) 1 IU/mL の IFN-γ 標準液（S2）を試料として測定するとき、その吸光度は 0.200 以上である。
- (3) 0.25 IU/mL の IFN-γ 標準液（S3）を試料として測定するとき、その吸光度は 0.050 以上である。
3. 同時再現性試験
- (1) 4 IU/mL の IFN-γ 標準液（S1）を試料として 6 回同時に測定するとき、吸光度の変動係数（CV（%））は 15% 以下である。
- (2) 1 IU/mL の IFN-γ 標準液（S2）を試料として 6 回同時に測定するとき、吸光度の変動係数（CV（%））は 15% 以下である。
- (3) 0.25 IU/mL の IFN-γ 標準液（S3）を試料として 6 回同時に測定するとき、吸光度はその平均値の ±0.040 以内である。
- (4) 0 IU/mL の希釈緩衝液（S4）を試料として 6 回同時に測定するとき、吸光度はその平均値の ±0.040 以内である。
4. 測定範囲
0.05 ～ 10.0 IU/mL
5. 較正用基準物質
ヒト IFN-γ 標準：米国国立衛生研究所（NIH：National Institutes of Health）の標準品（カタログ番号：Gxg01-902-535）

6. 相関性
- 598 例の全血検体を用いて本品と既承認品（自社、クオンティフェロン®TB ゴールド、QFT 法）との相関性を検討したところ、良好な相関性が得られた。

		QFT法				
		陽性	判定保留	判定不可	陰性	合計
本 品	陽性	253	3	1	5	262
	判定不可	0	0	5	0	5
	陰性	7	16	0	308	331
	合計	260	19	6	313	598

一致率：93.8%（561/598）

205 例の全血検体を用いて本品と既承認品（他社）との相関性を検討したところ、良好な相関性が得られた。

		既承認品（他社）				
		陽性	判定保留	判定不可	陰性	合計
本 品	陽性	96	1	1	2	100
	判定不可	0	0	0	0	0
	陰性	0	2	0	103	105
	合計	96	3	1	105	205

一致率：97.1%（199/205）

***【使用上または取扱い上の注意】

- 取扱い上の注意
 - ヒト由来の検体は、感染を引き起こす可能性があるものとして取り扱いに注意し、適切に廃棄する。
 - 感染を避けるため、口によるピペッティングを行わないこと。
 - 酵素基質液は、摂取、吸入および皮膚接触すると軽度の皮膚刺激を起こす可能性がある。皮膚や目を刺激から避けるため、保護眼鏡、手袋、白衣、マスクを着用し、取り扱うこと。
 - 酵素反応停止液は硫酸を含有しており、金属腐食を起こす可能性がある。摂取、吸入あるいは目、皮膚に接触すると皮膚刺激を起こす恐れがある。保護眼鏡、手袋、白衣、マスクを着用し、取り扱う。
 - 希釈緩衝液はタートラジンを含有しており、アレルギー反応を引き起こすことがあるため皮膚への接触を避ける。保護眼鏡、手袋、白衣、マスクを着用し、取り扱う。
 - もし、試薬が皮膚や目に触れたときは水でくり返し洗浄し、医師に相談すること。
 - 使用前に試薬容器を確認し、もし容器やキャップのシールに漏れや破損が認められた場合は使用しないこと。
 - バイアルのキャップを外す際は、金属キャップで負傷することのないよう、十分に注意すること。
- 使用上の注意
 - 酵素基質液は常に直射日光を避ける。
 - 異なるロット番号のキットの ELISA 試薬を組み合わせで用いてはならない。
 - 使用期限を過ぎた QFT プラスチューブや試薬は使用しないこと。
- 廃棄上の注意
 - 濃縮洗浄用緩衝液は、水生生物への長期的な影響を避けるため、環境中に廃棄しないこと。
 - 残った試薬、生物試料、血液および血液製剤を扱った資材は、各種法規に従って廃棄すること。
- その他の注意
 - 試験器具・機器が較正および検証されていることを確認すること。
 - 判定不可結果
判定不可結果はまれであり、被検者の免疫状態に関連すると思われるが、いくつかの技術的な要因も関連している可能性がある。
 - QFT プラスチューブ内での血液の保存が、採血から 37℃培養まで規定の温度範囲（22±5℃）の逸脱あるいは 16 時間以上経過した。
 - ヘパリン真空採血管内での血液の保存が、採血から 37℃培養まで規定の温度範囲（2～8℃）の逸脱あるいは 48 時間以上経過した。
 - QFT プラスチューブの混合が不十分であった。
 - ELISA プレートの洗浄が不十分であった。
 - 血液検体の採取または取り扱いで技術的な問題が疑われた場合は、新しい血液検体で本品での検査を再度行う。抗原刺激後の血漿での再 ELISA 検査は、ELISA 検査において不適

切な洗浄や他の操作法の逸脱が疑われた場合に行う。低い Mitogen 値による判定不可は、ELISA 検査の失敗でない限り、再検査による変化は期待できない。

- 凝固した血漿検体
血漿検体の長期間保存によりフィブリンクローットが生じた場合は、検体を遠心分離して血漿を採取する。
- トラブル解決法
非特異的な発色がある。

考えられる原因	解決方法
プレートの不十分な洗浄	プレートの洗浄は400 μL/ウェルで最低 6 回行うこと。使用する洗浄機によっては、6 回以上の洗浄サイクルが必要な場合もある。各サイクル間の浸漬時間を 5 秒以上にする。
ELISAウェルの交差汚染	検体の分注および混和に注意を払ってリスクを最小限にする。
試薬の期限切れ	本品は使用期限内に使用する。溶解したIFN - γ 標準および標識抗体濃縮液は、溶解日から 3 ヶ月以内に使用する。
酵素基質液の汚染	基質が青色になっていたら廃棄する。汚染のない試薬を用いる。

標準の吸光度が低い

考えられる原因	解決方法
IFN - γ 標準の希釈ミス	IFN - γ 標準は、添付文書に従って正しく希釈し調製する。
分注ミス	ピペットを使用説明書に従って較正して用いる。
反応温度が低い	ELISA法における反応は、22±5℃で行う。
反応時間が短い	標識抗体液、IFN - γ 標準、検体を入れたプレートを120±5分間反応させる。酵素基質液を添加したプレートを30分間反応させる。
誤ったプレートリーダーフィルタを使用している	620～650 nmの対照フィルターを用い、450 nmで吸光度測定を行う。
試薬温度が低い	標識抗体濃縮液以外の試薬はすべて、測定開始前に22±5℃に戻す必要がある。これには約 1 時間かかる。
試薬の期限切れ	本品は使用期限内に使用する。溶解したIFN - γ 標準および標識抗体濃縮液は、溶解日から 3 ヶ月以内に使用する。

バックグラウンドが高い

考えられる原因	解決方法
プレートの不十分な洗浄	プレートの洗浄は400 μL/ウェルで最低 6 回行うこと。使用する洗浄機によっては、6 回以上の洗浄サイクルが必要な場合もある。各サイクル間の浸漬時間を 5 秒以上にする。
反応温度が高い	ELISA法における反応は、22±5℃で行う。
試薬の期限切れ	本品は使用期限内に使用する。溶解したIFN - γ 標準および標識抗体濃縮液は、溶解日から 3 ヶ月以内に使用する。
酵素基質液の汚染	基質が青色になっていたら廃棄する。汚染のない試薬を用いる。

標準曲線の不良とバラツキ

考えられる原因	解決方法
プレートの不十分な洗浄	プレートの洗浄は400 μL/ウェルで最低 6 回行うこと。使用する洗浄機によっては、6 回以上の洗浄サイクルが必要な場合もある。各サイクル間の浸漬時間を 5 秒以上にする。
IFN - γ 標準の希釈ミス	IFN - γ 標準は、添付文書に従って正しく希釈し調製する。

試薬の混合不足	試薬をプレートに加える前に、転倒あるいは穏やかなボルテックスにより完全に混和する。
一貫性のないピペット技術あるいは試験準備の中断	検体とIFN - γ 標準の添加は連続的に行う。すべての試薬は試験前に準備する。

*【お問い合わせ先】

株式会社キアゲン
〒104-0054 東京都中央区勝どき 3-13-1
フォーフロント・タワー II
TEL : 03-6890-7300
E-mail : techservice-jp@qiagen.com
(問い合わせ先／テクニカルサポート)

*【保管方法および有効期間】

QFT プラスチューブ部の各チューブ :
4~25℃で保存 有効期間 15 ヶ月

ELISA 部の各構成試薬 :
2~8℃で保存 有効期間 24 ヶ月 (使用期限は外箱に表示)

*【製造販売業者の氏名または名称及び住所】

株式会社キアゲン
〒104-0054 東京都中央区勝どき 3-13-1
フォーフロント・タワー II

*【包装単位】

QFT プラスチューブ部 : 25 検体用・50 検体用
ELISA 部 : 192 テスト (最大 44 検体) 用

*【主要文献】

- 1) Laurens A.H., et al. (2000) Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP-10. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7(2),155-160.
- 2) Andersen P., et al. (1995) Recall of Long-Lived Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. J Immunol. 154(7),3359-3372.
- 3) Sørensen AL., et al. (1995) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-Cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 63(5),1710-1717.
- 4) Berthet FX., et al.(1998)A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein(CFP-10). Microbiology 144,3195-3203.
- 5) Brock I., et al.(2004) Specific T-Cell Epitopes for Immunoassay-Based Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. J. Clin. Microbiol. 42(6):2379-2387.
- 6) Andersen P., et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 356,1099-1104.
- 7) Turner, J., et al. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells *in vitro*. Immunology. 87(3), 339-342.
- 8) Brookes R.H., et al. (2003) CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. Eur. J. Immunol. 33, 3293-3302.
- 9) Stenger S., et al. (1998) An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin. Science 282, 121-125.
- 10) Lalvani A., et al. (1998) Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95(1),270-275.
- 11) Lewinsohn D.M., et al. (2001) Classically Restricted Human CD8+ T Lymphocytes Derived from *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Cells: Definition of Antigenic Specificity. J.Immunol. 166(1), 439-446.
- 12) Lewinsohn D.A., et al. (2007) Immunodominant Tuberculosis CD8 Antigens Preferentially Restricted by HLA-B. PLoS Pathol. 3(9), 1240-1249.
- 13) Day C.L., et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. J. Immunol. 187(5), 2222-2232.
- 14) Rozot V., et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur. J. Immunol. 43 (6)1568-1577.
- 15) Nikolova M., et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 75(3), 277-281.
- 16) Chiacchio T., et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. 69(6), 533-545.
- 17) Ongaya A., et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis 93(S1), S60-S65.
- 18) Lancioni C., et al. (2012) CD8+ T Cells Provide an Immunologic Signature of Tuberculosis in Young Children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 185(2), 206-212.