

**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**

結核菌検査とくに薬剤感受性検査の信頼性に関する研究

分担研究者 御手洗聡 (財)結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター
細菌検査科長

研究要旨

抗酸菌検査は菌の性状の特殊性から、その検査に特有の困難がともなう。本研究班では最も精度の維持が困難と思われる薬剤感受性試験を中心として、抗酸菌検査の精度保証活動の実践性と有用性を評価する目的で研究を行った。

抗結核薬に対する薬剤感受性試験外部精度評価では、2003 年度に実施したアンケート調査結果から薬剤感受性試験実施件数の多い病院検査室および検査センター上位計 67 施設に対してパネルテストを実施した。平均として Isoniazid (INH)および Rifampicin (RFP)の結果は感度・特異度共に 95%を越えており、世界保健機関の示している基準に合うものであった。この方法によるパネルテストは 2003 年度から継続して実施しているが、精度の低い施設の検出や、検査精度改善に有用であることが示された。しかし、被験菌 20 株を用いた現行の方法では実施施設での負担が大きく、参加対象施設の拡大に支障となる可能性が高い。今後は効率を維持しながら省力化を図る必要がある。

抗酸菌塗抹検査の精度保証では、ポリアクリルアミドを基質とした人工喀痰を用いたパネルテスト用標本が実践的に利用可能であり、外部精度評価に有効であることが示された。同標本は外観、顕微鏡下での観察性、標本の均一性、作製上の安全性で優れており、大規模なコントロールサーベイにも利用可能と考えられる。今後は、スライド作製の効率化と集菌法への対応、培養・同定検査にも応用可能な生菌保持力のある媒体の開発が必要となる。クロスチェックによる外部精度評価は、実践可能であることは示されたが、労力や人員確保の面で困難があり、さらには個人情報保護の観点から検体の収集が不可能となる場合もある。外部精度評価の方法としてパネルテストの実践性が高いことが示された。

結核菌検査指針 2000 の精度管理項目の実践性を評価するため、病院検査室 7 施設で調査を行った。各施設で実施している検査内容に従って、精度管理内容を実施したかどうかをチェックしたところ、実施率は 11.8～100%と様々であった。試薬等の管理は高率になされているものの、機器の温度管理等が徹底されていない施設が多かった。またバイオセーフティ上重要と思われる安全キャビネットの管理が不十分であり、徹底されるべきものと考えられた。

薬剤感受性試験における液体培地迅速法(BACTEC MGIT 960)と小川培地標準法の INH 基準濃度判定の差違が指摘されていたため、2002 年度結核療法研究協議会の薬剤耐性調査にて全国より収集された結核菌について、療研共同研究施設の許可を受けた上で 1,122 株に関して BACTEC MGIT 960 および小川標準法による比較を行ったところ、小川を標準とした場合、MGIT の最終的な感度は 100%、特異度は 97.1%、判定一致率は 97.3%となった。これは薬剤感受性試験法として良好な成績であり、臨床上問題ないものと考えられた。

米国での抗酸菌検査精度保証システムについて CDC および New York 州保健局 Wadsworth center にて調査を行った。米国では精度保証は保険とリンクした認証システムとして確立しており、実施上のレファレンス機能も整備されている。活動に必要な費用も受益者負担を原則に徴収・確保されており、本邦でも応用可能な点が多くあるものと思われた。

A. 研究目的

結核をはじめとする抗酸菌検査について、現在国内では殆ど精度保証活動が行われていない。抗酸菌検査の精度は結核対策に直結しており、世界的には精度保証活動が強く進められている。品質保証はあらゆる分野での必須事項であり、抗酸菌検査の分野でもこれを確立することが必要である。

本研究では 2004 年度に主要な検査センターおよび病院検査室に対する結核菌薬剤感受性試験の外部精度評価を実施し、病院検査室に検査精度の低い施設が多いことを明らかにした。

今年度は、薬剤感受性試験外部精度評価の継続・拡大実施と共に、昨年度困難であった塗抹検査外部精度評価材料の開発と評価を行う事とした。また、薬剤感受性試験における問題点の一つである液体培地 (BACTEC MGIT 960) と固体培地による感受性試験の結果の差異について継続して研究を行った。さらに、一般病院検査室における内部精度管理の実践性の検討を行い、精度保証先進国である米国のシステムについても調査を行った。

B. 研究方法

以下 1~5 までの 5 つの課題を設定して研究を行った。

1. 抗結核薬薬剤感受性試験外部精度評価

【目的】結核菌薬剤感受性試験を実施している検査センター及び病院検査室を対象として、再現性や一致率を含む感受性試験の状況を評価・改善する事を目的とする。

【方法】

参加施設: 2003 年度に実施した抗酸菌検査に関するアンケート調査をもとに、結核菌薬剤感受性試験を実施している検査センター及び病院検査室

のうち上位各 60 施設を対象として参加を依頼した。基本的には参加は任意であり、参加を諾とした施設のみに試験用の検体を送付した。検体の準備、送付及びデータの取りまとめは結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科にて行った。

送付検体 (結核菌株): 結核菌 20 株を輸送用小川培地 (8ml ポリスチレン製透明チューブに 1% 小川培地を焼成したもの) 上に発育した状態で送付した。今回送付した菌株は Supranational Reference Laboratory Network (SRLN) で毎年実施されている薬剤感受性試験精度管理に使用された菌株のうち、基本的に高い施設間一致が得られているものを選定して、10 組 20 株を組み合わせて使用した。これらの株については、既に SRLN にて評価が定まっており、その最終的な評価を基準として感受性・耐性を判定した。結果として今回の試験パネルにおけるそれぞれの薬剤に対する耐性菌の割合は、INH に関して 70%、RFP、SM について 60%、EB について 50% となった。それぞれの施設に配付される検体には一つずつ異なる番号を割り振り、施設間で相互に結果が照会できないようにしている当然ながら菌株の中には薬剤耐性株が含まれているため、これらの菌株の取り扱いには十分なる注意を要することを明言し、薬剤感受性試験に安全キャビネットを使用していることを事前に確認している。

試験薬剤: 検査薬剤には、安定した結果が得られることを考慮して Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Streptomycin (SM) および Ethambutol (EB) を指定した。

感受性試験方法: 基本的に各施設で日常実施している方法により感受性試験を行った。菌株とともに送付した調査用紙に感受性試験結果、菌液調製法を記載し、コーディネーター (結核研究所・御

手洗聡)宛返送とした。尚、今回の研究では報告までの期間を検体受領後3ヶ月以内とした。

結果の評価:それぞれの菌株の薬剤感受性試験の結果は「耐性」あるいは「感受性」のいずれかとした。研究を実施した時点では比率法が薬剤感受性試験の標準とされており、各施設でも基本的に比率法が用いられるものと考えられたが、絶対濃度法を用いている場合は基準濃度への評価を用いることとした。最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)を用いて測定する場合は、各施設にて感受性・耐性の基準を定め、耐性あるいは感受性の判断をした上で結果を報告することとした。尚、報告用紙に記入する際は、感受性にはS、耐性にはRを用いて表記した。また、複数の方法についてアセスメントを希望する場合は、それぞれの結果を別々の用紙で報告することとした。

結果の解析:データについては「感度(sensitivity)」、「特異度(specificity)」、「耐性的中率(predictive value R)」、「感受性的中率(predictive value S)」、「一致率(accuracy)」、「再現性(reproducibility)」及び「指数(kappa coefficient)」を計算して評価した。ここで「感度」とは真の耐性のうちどれだけを検出(判定)しえたか、「特異度」とは真の感受性のうちどれだけを検出(判定)しえたかを示す。また「一致率」とは全体のうち真の耐性および感受性株を検出できた正解率を示す。「再現性」は、被験菌に含まれる同一株について、同一の判定を得る率を示している。指数は判定の一致の程度を示す指標の一つであり、偶然の一致以上に結果が一致しているかどうかを判定するために用いた。

解析結果については最終的にそれぞれの施設に通知することとした。発表および論文報告において施設名は匿名化し、個々の施設が特定されないよう配慮する。

経費:本研究に関して参加施設から費用を徴収しない。ただし、被験菌株の薬剤感受性試験と結果の送付に掛かる費用は各施設の負担とした。

被験菌の処理:被験菌については、今回の研究目的以外には使用せず、検査終了後に各施設にて滅菌し廃棄する様依頼した。

2. 抗酸菌塗抹検査の外部精度評価(外部精度ア

セスメント用人工喀痰作製に関する研究)

【目的】抗酸菌塗抹検査の外部精度評価では、日常検査されたスライドを無作為・二重盲験的に再検査する方法(クロスチェック)を用いるのが一般的であるが、評価対象となる検査室が増加すると再検査数も膨大になり、中央(あるいは上位施設)での再検査は物理的に極めて困難となる。今回、一般病院検査室の協力を得てクロスチェックの実践性を評価した。

もう一つの評価方法として、薬剤感受性試験の場合と同様に結果既知の検体を送付して試験を行う方法(パネルテスト)があるが、抗酸菌塗抹検査ではこれまで適切な標本作製する方法がなく、事実上全く実施されていなかった。2004年度までに本研究班において人工喀痰を用いた抗酸菌塗抹検査評価用スライドを作製しており、今回はスライドおよび評価の実践性についても検討した。

【方法】下記の方法により抗酸菌を含む人工喀痰による外部精度評価用スライドパネルを作製した。

細胞培養:THP-1細胞を、10%FBS加RPMI 1640培地を90ml加えた175cm²の培養フラスコにて約3週間37℃のCO₂インキュベータにて培養する。**抗酸菌の調整:**Middlebrook 7H9液体培地で約2週間培養したBCG-PasteurがOD=0.7程度になったところで、Acrodisk filter(#4650: pore size 5.0 μm, Pall Corporation, Cornway, UK)で濾過して、可能な限り単個菌を得る。濾過した菌液は氷上に起き、単個菌が再び菌塊を形成するのを防ぐ。菌液をクライオチューブに1mlずつ分注して凍結保存しておく。また、同時に1%小川培地に接種し、CFUを測定する。このCFU数が5×10⁷CFU/mlより少ない場合は、以降の実験に使用できないので、再度液体培地から作り直す。

人工基質の調整:アクリルアミドのストック液は、22.2gのアクリルアミド、0.6gのN,N'-methylenebisacrylamideに蒸留水100mlを加えて作製する。この溶液は遮光して4℃で保存する。ポリアクリルアミドゲルはこのストック液1.75ml、蒸留水8ml、TBE buffer(pH 8.0)2ml、10%過硫酸アンモニウム100 μlをよく混合して、最後にN,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine(TEMED)8 μlを加えて、よく混和し、氷上に静置する(遮

光)。

人工喀痰の調製：前述の THP-1 細胞を 50ml のポリプロピレン遠心管に移し、1,000rpm で 10 分遠心して上清を捨て、pore size 0.2 μ m の Millipore Millex filter で濾過したリン酸緩衝液で 3 回洗浄する。この時フラスコ 1 個分の細胞を 1 つの遠心管に集める。洗浄後、上清を捨て、遠心管の口を下にしてペーパータオル上に傾斜させ、安全キャビネット内で 10~15 分乾燥させる。水分が多く残っていると、最後の重合が正常に行われなことがあるので、十分乾燥させる。

ここに、調製した BCG Pasteur 菌液 ($>5 \times 10^7$ CFU/ml 以上) 250 μ l と、先に調製したゲル (未重合) 250 μ l を加えよく攪拌する。フラスコ 1 個分の細胞で約 50 枚の塗抹標本が作製可能である。

上記の方法で作製できる塗抹標本は 3+陽性用であり、2+陽性以下の塗抹を作製する場合は、BCG Pasteur 菌液を細胞、ゲルと混合する前にリン酸緩衝液で希釈しておく (10 倍希釈系列)。即ち、2+は 5×10^6 CFU/ml 相当、1+は 5×10^5 CFU/ml 相当、 \pm は 5×10^4 CFU/ml 相当の菌液を用いて調製する。残ったゲルはそのまま放置して重合が正常に起こることを確認する。

人工喀痰調製液は光重合により粘性が生じるのに 1 日~2 日かかるので、室温で間接光が当たる状態で放置する。

試験パネルの準備：前述の方法で作製した外部精度評価用スライド (パネルスライド) を表 1 の様に陽性度別に 10 枚組み合わせ、火災固定後未染色のまま対象検査室に送付した。

表 1 パネルスライドの構成

パネルスライド陽性度	枚数
3+	1
2+	1
1+	1
\pm	2
・ (陰性)	5

抗酸菌塗抹検査パネルテスト手順：各施設が通常実施している方法に従って抗酸菌染色 (チール・ネールゼン染色あるいは蛍光法) を実施し、それぞれの施設の基準 (簡易法あるいはガフキー号数) により結果を報告した。評価の方法はポイン

ト制とし、External quality assessment for AFB smear microscopy (Association for public health laboratories, 2002)の方法に従って、表 2 の様に判定した。正解には 10 点、量的な間違い及び小さな間違いには 5 点、偽陽性・偽陰性には 0 点を与えることとし、総合点 80 点以上を合格基準とした。

表 2 パネルテストの結果判定

パネル テスト	中央判定					
	・	\pm	1+	2+	3+	
被 験 者 判 定	・	Correct	LFN	HFN	HFN	HFN
	\pm	LFP	Correct	Correct	QE	QE
	1+	HFP	Correct	Correct	Correct	QE
	2+	HFP	QE	Correct	Correct	Correct
	3+	HFP	QE	QE	Correct	Correct

判定	意味	解釈
Correct	正解	間違いなし
QE	定量の間違い	小さな間違い
LFN	わずかな偽陰性	小さな間違い
LFP	わずかな偽陽性	小さな間違い
HFN	偽陰性	大きな間違い
HFP	偽陽性	大きな間違い

パネルテスト用スライドの臨床評価：8 施設 14 名の臨床検査技師の協力により、以下の四点について実際の塗抹標本と比較し、「良」「同程度」「不良」の三段階で各パネルテストスライドを評価した。

- 1) 細胞成分の状態
- 2) 菌の集塊形成の程度
- 3) 染色性
- 4) 観察しやすさ

もう一つの外部精度評価法として、塗抹検体のクロスチェックを試行した。

サンプリングの方法：

External quality assessment for AFB smear microscopy に示された Lot Quality Assurance System: LQAS に基づき、研究協力 7 施設における 2005 年 7 月の塗抹陽性率および検体数により必要なサンプリング数を統計的に算出し、再検査用検体を収集した。

クロスチェックと判定・評価法：収集された検体は、まず盲験的に第一検査者によって評価した。ここで各施設での判定と第一検査者の判定に齟齬が生じた場合、第二検査者（審判）が最終判定を行った。初回検査からの時間経過によって起こり得る標本の褪色による偽陽性結果を防ぐため、全ての検体について再染色を実施した。

結果の評価については表3に示すように判定を分類し、今回は正解には10点、量的な間違いには5点、偽陽性・偽陰性には0点を与えることとした。

表3 クロスチェックの結果判定

クロス チェック	第一・第二検査者判定					
	-	±	1+	2+	3+	
各 施 設 判 定	-	Correct	LFN	HFN	HFN	HFN
	±	LFP	Correct	QE	QE	QE
	1+	HFP	QE	Correct	QE	QE
	2+	HFP	QE	QE	Correct	QE
	3+	HFP	QE	QE	QE	Correct

3. 抗酸菌検査内部精度管理の実践性に関する評価

【目的】抗酸菌検査の精度保証において、外部精度評価とともに重要な因子として、内部精度管理が挙げられる。内部精度管理の具体的な指針は2000年に刊行された「新結核菌検査指針2000」に記載されたものしかない。今回、指針の実践性に関する評価を行った。

【方法】「新結核菌検査指針2000」の第8章・精度管理の項目に含まれる機器管理について、一般病院7施設に依頼し、2005年11月～12月にかけて実践してもらい、実際の実施状況を検討した。

4. 薬剤感受性検査における液体培地迅速法と固体培地標準法のINH基準濃度判定の差違に関する研究

【目的】新しい感受性検査法、特に液体培地による迅速診断法（Mycobacterium Growth Indicator Tube: MGIT, Becton Dickinson）と1%小川培地による標準法でのINH感受性結果に差異が認められる事が報告されている。今回は全国的に結核菌を収集し、INHに関するMGITの検査精度につい

て検討した。

【方法】

結核菌株：結核療法研究協議会が2002年度に実施した結核菌薬剤耐性サーベイランスで全国より収集した結核菌3,127株から、地域的な偏りがないように1,122株を選定し、被験菌とした。

薬剤感受性試験：日本ベクトンディッキンソンと共同でMGITによるINHの薬剤感受性試験を実施した。MGITによるINHの感受性試験方法についてはメーカーによる標準法に従った。MGITにおけるINHの濃度は0.1 µg/ml及び0.4 µg/mlについて検討した。MGITと1%小川培地標準法との結果の一致について、小川培地による方法の結果を標準として、感度、特異度、一致率を評価した。

5. 米国抗酸菌検査精度保証システム視察

【目的】抗酸菌検査精度保証の分野で実績のある米国のシステムについて調査する。

【方法】米国 Center for Disease Control and Prevention (US-CDC, Atlanta, GA)にて米国の抗酸菌検査精度保証システムについて視察する。また、実際の精度保証プログラムのひとつであるNew York州の精度保証活動を視察し、実際の方法について視察、意見交換を行う。

C. 研究結果

1. 抗結核薬薬剤感受性試験外部精度評価

研究への参加を要請した120施設のうち、検査センター28施設、病院検査室38施設、保健所検査室1施設から参加への同意を取得し、各施設に検体を送付した。平成18年2月20日現在検査センター27施設、病院36施設、保健所検査室1施設から結果が送付されている。検査センター1施設が途中で棄権した事から参加施設数は66となり、最終回収率は97.0%であった。

送付した菌株については、1施設から雑菌汚染と思われる発育不良が報告されたが、結果受領済の64施設からは被験菌の問題の指摘はなかった。

結果を受領した64施設について、感受性試験に使用された方法（製品）をみると、30施設（46.9%）がビットスペクトル-SR（極東製薬）、16施設（25.0%）がウエルパックS（ニチビー）、10施設（15.6%）がMycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT)、2施設（3.1%）が1%小川培地、6

施設(9.4%)がBrothMIC MTB-I(極東製薬)を使用していた。尚、ウエルパックSとMGITを実施している施設が2施設、BrothMIC MTB-IとウエルパックSの組み合わせが2施設、BrothMIC MTB-Iと小川標準法およびMGITとビットスペクトル-SRの組み合わせがそれぞれ1施設で実施されていた。2004年度の報告と同様に、解析についてはその施設で日常多く実施している方法による結果を使用した。耐性比率法(Resistant Ratio Method)及び絶対濃度法(Absolute Concentration Method)を使用した施設はなかった。

菌液調整法についてみると、64施設中61施設(95.3%)が固体培地上に発育した菌から菌液を調製しており、内48施設は一旦液体培地で増殖させてから菌液を調整していた。他の3施設は液体培地から直接菌液を調製していた。菌の濃度調整については、53施設(82.8%)が目視あるいは濁度計で濃度を測定していたが、11施設(17.2%)は、濃度を確認していなかった。しかし、これら11施設中7施設はMGITを使用しており、メーカーの定める方法に従って、培養陽性となつてからの日数によって菌液の希釈倍率を設定していた。他の4施設は固体培地からかき取った菌の量をループサイズから推定し、後の菌液濃度を決定していた。

感受性試験結果について薬剤別にみた結果を示す。INHでは感度平均が99.9%(92.9~100)であり、95%以下の施設が1施設あった。特異度平均は99.7%(83.3~100)であり、95%以下の施設が2施設認められた。耐性的中率平均が99.9%(93.3~100)、感受性的中率平均が99.8%(85.7~100)、一致率平均が99.8%(95.0~100)であり、一致率が90%を下回る施設はなかった。再現性平均が99.8%(90~100)であった。指数は0.996であった。

RFPでは感度平均が96.9%(66.7~100)であり、95%以下の施設が13施設あった。特異度平均は99.6%(87.5~100)であり、95%以下の施設が4施設認められた。耐性的中率平均が99.8%(94.9~100)、感受性的中率平均が94.8%(56.3~100)、一致率平均が98.0%(80.0~100)であり、一致率90%以下の施設が1施設認められた。再現性平均が99.2%(90~100)であった。指数は0.958であった。

SMでは感度平均が92.8%(66.7~100)、特異度平均が98.2%(75.0~100)、耐性的中率平均が99.3%(90.3~100)、感受性的中率平均が88.9%(54.3~100)、一致率平均が95.0%(75.0~100)であり、一致率が90%を下回る施設は9施設認められた。再現性平均は97.8%(80~100)であった。指数は0.897であった。

EBでは感度平均が99.1%(80.0~100)、特異度平均が98.6%(80.0~100)、耐性的中率平均が99.4%(92.1~100)、感受性的中率平均が98.3%(68.2~100)、一致率平均が98.8%(90.0~100)であり、一致率が90%を下回る施設はなかった。再現性平均は99.2%(80~100)であった。指数は0.976を示した(資料1表4)。

試験法別に相互比較すると(資料1表4)MGITのINHに関する一致率、再現性がビットスペクトル-SRのそれに対して有意に低かった($p=0.011$)。また、ビットスペクトル-SRのRFP感度がウエルパックSに対して有意に低かった($p=0.037$)。さらに1%小川標準法のRFP再現性がビットスペクトル-SRに対して有意に低かった($p=0.043$)。

個々の菌株についてSRLNでの判定結果と、今回参加施設との判定の一致率を示した(資料1表5)。今回は-8563株について被験施設でRFP及びSM感受性と判定される場合が多く見られた。また、XI-5048株についてもSMでの一致率が低めであった。しかしながら、X-8563 4b株を除いて施設間一致率は80%を超えていた。

施設分類別にみると、病院検査室と検査センターの間でパネルテストの結果に有意な差は認められなかった(資料1表6)。しかしながら、資料1図1に示すように病院検査室の精度のばらつきが検査センターに比べて多いように思われた。それぞれの評価因子について0.9(90%)を下回る施設の割合を各グラフの右側に示したが、検査センターにRFP感度が低い施設が多くあることが示された。

2004年度と今回2005年度の結果の比較を資料1表7に示した。感度および特異度については95%以下の施設数とその割合を、また一致率と再現性については90%以下の施設数とその割合を示し、指数についても0.8以下の施設数とその割合を示している。今回のパネルにはRFPで一致率の低い株が含まれていたため、2004年に比較し

て 2005 年度の成績は悪化している。しかし、その他の薬剤についてはほぼ成績が改善していた。

2. 抗酸菌塗抹検査の外部精度評価（外部精度アセスメント用人工喀痰作製に関する研究）
パネルテスト及びテスト用塗抹標本の評価

人工喀痰を用いた試験用塗抹標本を用いたパネルテストを実施すると同時に、臨床検査技師による塗抹標本そのものの評価を行った。

微生物検査室を有する一般病院 8 施設の臨床検査技師 14 名に対してパネルテストを実施した結果を表 8 に示した。得点は全ての被験者で 95 点以上であり、偽陽性・偽陰性は見られなかった。LFP が 1 件、LFN が 4 件認められたが、LFP の原因は染色液中の夾雑物であり、LFN となったのは全て ± 陽性の検体であった。陽性度が二段階以上異なる定量の間違いは見られなかった。

表8 人工喀痰によるパネルテスト結果

Hospital	Total slides	Indicators						score
		HFP	HFN	LFP	LFN	QE	Cor	
A	10	0	0	0	0	0	10	100
B-1	10	0	0	0	0	0	10	100
B-2	10	0	0	0	0	0	10	100
C	10	0	0	0	0	0	10	100
D	10	0	0	0	0	0	10	100
E-1	10	0	0	0	0	0	10	100
E-2	10	0	0	0	0	0	10	100
E-3	10	0	0	0	1	0	9	95
E-4	10	0	0	0	1	0	9	95
E-5	10	0	0	0	0	0	10	100
E-6	10	0	0	1	0	0	9	95
F	10	0	0	0	0	0	10	100
G	10	0	0	0	1	0	9	95
H	10	0	0	0	1	0	9	95

HFP: High False Positive HFN: High False Negative
LFP: Low False Positive LFN: Low False Negative
QE: Quantification Error Cor: Correct

同じ被験者による塗抹標本の評価を表 9 に示した。細胞成分の状態、菌の分散、染色性、観察の容易さのいずれについても患者検体と同等か、それよりも良いとする評価が 90% 以上であった。

表9 塗抹標本の評価

	良い (%)	患者検体と同程度 (%)	悪い (%)
細胞成分の状態	58	35	7
菌の集塊の程度	57	33	10
染色性	57	33	10
観察の容易さ	55	40	5

パネルテスト用標本で最も問題になるのは、標本の陽性度の均一性（再現性）である。各陽性度の標本 19~25 枚を 100 視野ずつ検鏡し、認められた抗酸菌の数を表 10 に示した。この表から、

陽性度が二段階以上異なることはなく、標本の均一性は高いことが示された。

表 10 塗抹パネル標本の陽性度別均一性

陽性度	±	1+	2+	3+
平均菌数	3.5 (23)	46.2 (25)	520.7 (24)	>1,000 (19)
標準偏差	2.2	26.9	162.1	-

括弧内は被験枚数

クロスチェックによる外部精度評価

LQAS の方法に従って一般病院の 7 検査室について抗酸菌塗抹検体のクロスチェックを実施した。当初 8 施設に標本の提供を依頼したが、1 施設のみ個人情報保護を理由に標本の収集が出来なかった。今回は月単位で検体を収集し、7 施設から平均 15.3 枚（7~32）を収集した。一部の施設については適切なコーディネーターが見つからないため、検査技師自身が標本の選択・送付を実施した。送付中に一枚のスライドが破損したが、観察に支障はなかった。

再検査にあたっては、全ての標本を再染色した。複数の施設は蛍光染色を実施していたため、再染色も蛍光染色を実施したが、染色性が改善されないため、すべての再染色をチール・ネールゼン法で実施した。結果を表 11 に示す。

表11 クロスチェック結果

施設	スライド 総数	評価基準						点数
		HFP	HFN	LFP	LFN	QE	Cor	
A	7	0	0	0	0	0	7	100
B	12	0	0	0	0	0	12	100
C	10	0	0	0	0	0	10	100
D	13	0	0	0	0	0	13	100
E	32	0	0	0	0	1	31	100
F	24	0	0	0	0	0	24	100
G	9	0	0	0	0	1	8	95

HFP: High False Positive LFN: Low False Negative
HFN: High False Negative QE: Quantification Error
LFP: Low False Positive Cor: Correct

参加 7 施設のうち、何らかのエラーが認められたのは 2 施設のみであった。その 2 件の QE は、結果がガフキー号数（1 号及び 7 号）であったため、再検査もガフキー号数で評価した（再検査結果：2 号及び 10 号）ことによる差異であった。

3. 抗酸菌検査内部精度管理の実践性に関する評価

研究参加 7 施設の抗酸菌検査の実施状況は表 12

に示す通りであり、直接塗抹検査と塗抹至急検査は全ての施設で対応していた。他の検査について外注で対応している項目は、PCR 検査（4 施設）、培養検査（2 施設）、同定検査（4 施設）、薬剤感受性検査（5 施設）であり、結核病棟を有しない施設において、外注項目が多い傾向であった。

表 12 施設内容と抗酸菌検査実施内容

施設規模	施設 病床数 結核病棟	A	B	C	D	E	F	G
		1154	772	368	567	308	363	344
検査内容	直接塗抹 塗抹至急 PCR 培養 同定 薬剤感受性	無	有	有	無	無	無	無
実施	外注							

資料表 13 に施設毎にみた機器精度管理の結果を示した。A 施設は安全キャビネットの管理とふらん器や冷蔵庫等の温度管理が未実施のため 20%の実施率であった。C 施設は 85%の実施率であったが、安全キャビネットと遠心器の一部において実施できなかった。B 施設は C 施設に加えて PCR 検査機器の管理ができず 50%の実施率であった。D 施設は培養まで実施しているが安全キャビネットと顕微鏡の管理が若干実施できなかったため 82%の実施率であった。E 施設は安全キャビネット、遠心器の管理と各機器の温度管理が未実施のため約 12%の実施率であった。F 施設は塗抹検査以外は外注し、安全キャビネットがない施設である。設備を有しないため該当項目が評価項目から除外されたので実施率は 100%であった。G 施設は塗抹検査以外は外注し、安全キャビネットの設備を有するが、その管理が不十分なため、実

施率が 50%であった。

4. 薬剤感受性検査における液体培地迅速法と固体培地標準法の INH 基準濃度判定の差に関する研究

検査対象結核菌 1,122 株のうち 11 株が発育不良あるいは雑菌汚染により除かれ、最終的に 1,111 株について MGIT および小川標準法による INH の感受性試験結果を得た（表 14）。

表 14 MGIT 及び標準法による INH 感受性試験結果比較

方法	濃度 (µg/ml)		感受性結果				
	R	S	R	S	R	S	S
MGIT	0.1	R	R	R	R	R	S
	0.4	R	R	S	S	S	S
小川	0.2	R	R	R	R	S	S
	1.0	R	S	R	S	S	S
株数		42	11	1	7	30	1020

表 14 の結果を下に MGIT 0.1 µg/ml と小川標準法 0.2 µg/ml の齟齬についてまとめると、表 15 の様になった。

表 15 MGIT 及び小川標準法の基準濃度での結果

		小川標準法(0.2µg/ml)		
		R	S	total
MGIT (0.1µg/ml)	R	61	30	91
	S	0	1020	1020
total		61	1050	1111

表 15 から、小川培地による標準法に対して MGIT の感度は 100%、特異度は 97.1%、一致率は 97.3% となった。

5. 米国抗酸菌検査精度保証システム視察

2005 年 11 月 28 日から 12 月 4 日の間に Georgia 州 Atlanta の米国 CDC および New York 州保健局 Wadsworth Center (Albany) を訪問した。

CDC では Dr John Ridderhof に面会し、米国の抗酸菌検査精度保証システムについて聞いた。米国では Center for Medicare and Medicaid Services (CMS) が、Clinical Laboratory Improvement

Amendments (CLIA)というヒト検体を取り扱うあらゆる検査施設に対する法律の下に、精度保証活動を行っている。CLIA は検査のマネージメント、内部精度管理、パネルテスト、人員管理、立入調査に関する内容を規定している。CLIA では検査の複雑さ (complexity) をもとに検査を 3 つに分類して、それぞれの検査に必要な精度保証内容を定めている。一つは基本的に精度保証活動を必要としない Waived test であり、二つ目は先に挙げた全ての規定因子と最少の人員を要する Moderate complexity tests、三つ目は全ての規定因子に Moderate よりも強力な人員を必要とする High Complexity tests である。これらは test categorization に規定されたスコアにより分類されている。詳細については添付の資料 (資料2 CLIA Regulations and Federal Register Documents, PART 493 Laboratory Requirements) を参考にされたい。

抗酸菌検査の外部精度評価 (Proficiency Testing: PT) についてみると、CLIA によって認可された認証組織が 6 つあり、PT プログラムを実施している。さらに Washington 州と New York 州は独自の精度保証プログラムを実施しており、Exempt States とされている。

実際に PT を行うにあたって、抗酸菌検査に関しては検査室を下記の 5 種類に分類している。

- 1) 抗酸染色のみを実施し、他の検査については外注する施設
- 2) 抗酸染色および一次培養を実施し、同定以降の検査を外注する施設
- 3) 抗酸染色、一次培養および結核菌の同定と薬剤感受性試験を実施するが、他の抗酸菌の同定・感受性試験は外注する施設
- 4) 抗酸染色、培養およびあらゆる抗酸菌の同定を実施するが、薬剤感受性試験を外注する施設
- 5) 抗酸染色、培養およびあらゆる抗酸菌の同定を実施し、薬剤感受性試験を実施する施設

プログラムの内容と頻度に関しては、最低 5 つのサンプルを提供しなければならないとされている。また、年につき少なくとも 2 回実施しなければならない。検体は、郵送あるいは HHS (Department of Health and Human Services) の立入調査時に配布される。これらの検体はヒト材料で遭遇する主な 5 つの抗酸菌群 complex を代表する菌

種を含んでいなければならないと規定されている。検体に含まれる抗酸菌は年々変化するが、内容については少なくとも予定の 6 ヶ月前に HHS に届ける必要がある。また、検体の少なくとも 50% は主要な抗酸菌と一般正常細菌との混合物でなければならない。さらに、日常よくみられる抗酸菌と新興の重要な抗酸菌も含んでいなければならないとされている。プログラムは報告可能な分離菌と、その正しい薬剤感受性検査結果を十市以前に決定しておく。

プログラムは時とともに変化するが、以下に示すような抗酸菌は検体に含まれると思われる。

TB

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium bovis

Group I

Mycobacterium kansasii

Group II

Mycobacterium szulgai

Group III

Mycobacterium avium-intracellulare

Mycobacterium terrae

Group IV

Mycobacterium fortuitum

薬剤感受性試験については、主要な抗結核薬に対する感受性パターンが既知である結核菌を少なくとも一株含む検体を準備するとされている。

分類 1 と 2 に該当する検査室に PT を実施する際には、抗酸性および非抗酸性の菌を含む検体を少なくとも 5 つ準備するよう規定している。

検査室のパフォーマンスの評価に関して、HHS は下記の 1~6 に従って検査の正確さを評価するプログラムのみを認定する。

- 1) プログラムは、抗酸染色、培養同定、薬剤感受性試験にて報告可能な抗酸菌を決定する。検査室の精度を検証するため、それぞれの検体について、10 あるいはそれ以上の数のレファレンス検査室の 80% の一致結果あるいは全ての参加施設の 80% 以上の一致した結果と、それぞれの検査室の結果を比較する。
- 2) 特定の検体に対する検査結果を評価するには、検査の実施内容から検査室を分類しなければならない。また、検査室は患者検体を扱うのと同じように抗酸染色を実施し、分離培養お

よび同定を行わなければならない。さらに検査室のパフォーマンスはその得点の平均を基礎として評価される。

- 3) 検査室は主要な病原体の存在以外に、誤った結果を報告する場合があるので、そのような場合の得点システムを準備しておかねばならない。そこで、正解の総数を存在する菌数と誤って報告された菌の数を合計したもので除し、これに 100 を掛けることにより点数を決定する。例えば、1 種類の菌を含む検体について、正解及び誤った菌を含む 2 種類の結果が報告された場合、 $1/(1+1) \times 100 = 50$ パーセントとなる。
- 4) 感受性試験に関して、各検査室は患者検体を試験するとき、どの薬剤が通常その検査パネルに含まれるかについて示さなければならない。各検査室が通常患者検体について実施している薬剤についてのみ、結果を評価する。結果の正否については既に述べた基準に従って判定する。評価については、各検査室が報告した正しい結果数を、レファレンスでの正解数で除し、100 を掛けて算出する。例えば、3 種類の薬剤の感受性試験結果のうち 2 種類について正解であれば、 $2/3 \times 100 = 67$ パーセントとなる。
- 5) 検査の定性的基準は、抗酸菌検出の可否で判断する。抗酸菌検出の点数は、正解を検体数で除して、100 を掛けることにより算出する。
- 6) 抗酸菌検査の試験ごとの点数は、3~5 で示した点数の平均である。

内部精度管理についても細かく規定しているが、特に以下の点が重要であると述べている。

- a) 検査ごとに、同定に使用する試薬および方法を確認する。また、陽性および陰性の抗酸菌コントロールを並行して実施する。
- b) 薬剤感受性試験について、感受性培地を最初に使用する場合は、適切なコントロール株を用いて、事前にあるいは同時に培地のバッチおよび薬剤のロット番号と製造日をチェックする。
 - 1) 各検査室はコントロール結果の受容限度を決めておく必要がある。
 - 2) 適切なコントロール菌株を用いて手順を

確認する。

- 3) コントロールの結果は、予め決められた許容範囲になければならない。
- c) ここで述べられた様に、各検査室は全てのコントロール手順を記録しなければならない。

CLIA による精度保証は認証プログラムであり、認証を受けていない（あるいは取り消された）検査室は、政府の医療保険制度からの支払いを受けることが出来ない。

CDC の次に New York 州 Albany にある Wadsworth Center を訪問した。ここは New York 州保健局の所有する検査機関であり、検査のレファレンス、研究、検査精度保証活動機能を有している。ここでは Clinical Mycobacteriology Laboratory の責任者である Dr Max Salfinger に実際の抗酸菌検査精度評価プログラムについて聞き、意見交換を行った。

New York 州での検査精度保証プログラム（Clinical Laboratory Evaluation Program: CLEP）は次の 6 つの要素から成り立っている。

- Permit & Certificate Issuance: 検査室責任者および副責任者の資格認定証の発行・検査室許可の発行
- Survey & Compliance Monitoring: 検査室の立入調査
- Method Validation: FDA によって認可されていない検査の有用性の確認
- Proficiency Testing: パネルテストの実施
- Data Systems and Network: 精度保証に関するデータの管理
- Laboratory Outreach Program: 臨床検査室の教育

具体的に PT を実施するにあたっては、New York 州では表 16 のように検査室を分類し、送付する検体を決定している。

被験菌を混入する模擬検体には、豚のムチンが使用されており、喀痰との類似性はないが、顕微鏡下では喀痰検体と同様の所見が得られていた。（具体的手順の詳細は添付資料 3：Mycobacteriology PT Procedural Manual を参照）

PT の結果について、3 回実施した PT のうち 2 回以上、あるいは 2 回連続して成績不良の場合各施設は問題点を調査して、改善方法を含めて報告

表 16 New York 州での抗酸菌検査室の分類

分類	検査室機能と PT 用送付検体
Smears only	抗酸菌塗抹検査のみ 塗抹スライド 5 枚
Restricted	抗酸菌塗抹検査、培養および結核菌同定検査 塗抹スライド 5 枚 模擬臨床検体 5 検体（同定 2 検体含）
Restricted-S	抗酸菌塗抹検査、培養および結核菌同定・感受性検査 塗抹スライド 5 枚 模擬臨床検体 5 検体 （同定 2 検体+薬剤感受性 3 検体含）
General	抗酸菌塗抹検査、培養および抗酸菌同定 塗抹スライド 5 枚 模擬臨床検体 5 検体（同定 2 検体含）
General-S	抗酸菌塗抹検査、培養、抗酸菌同定及び薬剤感受性検査（全て） 塗抹スライド 5 枚 模擬臨床検体 5 検体 （同定 2 検体+薬剤感受性 3 検体含）
Reference	抗酸菌塗抹検査、培養、抗酸菌同定及び薬剤感受性検査（全て） 塗抹スライド 5 枚 模擬臨床検体 5 検体 （同定 4 検体+薬剤感受性 3 検体含）

しなければならない。また、改善を確認する PT あるいは実地調査を実施し、さらに引き続き 2 回の PT に合格する必要がある。当該の検査を中止させるかどうかの判断は、

- 患者の診療に危険を及ぼすか、
- 問題点を解決する能力があるか、
- 検査室の体質上の問題か、

Good Laboratory Practice の点から問題を起こしたことが過去にあるか、

過去 2 年間に同様の問題があったか、
を勘案してなされる。

これらの点について一つでも該当する項目がある場合は、基本的に検査を中止して改善活動を実施する。これらに対して該当する問題がない場合でも、問題の調査と改善案の提出を 2 週間以内に行わなければならないとされている。

PT を含む精度保証活動に必要な経費は、基本的に活動の対象となる検査室から、その歳入に応じて徴収されている。

D. 考察

【抗結核薬薬剤感受性試験外部精度評価】

WHO/IUATLD Stop TB Laboratory subgroup では基本的に INH および RFP に対して感度、特異度、再現性を 95% 以上に保つ事を基本とし、主要 4 剤について一致率 90% 以上を目標としている。今回の参加全施設の平均では、この基準を満たしていたものの、SM の感度が 95% を下回った。

SM における感度は平均 92.8% (66.7-100) であり、一致率は 95.0% (75.0-100) であったが、これはパネル内の 2 種の株 IX-8563 および XI-5048 での判定一致率が比較的低かった事による。IX-8563 株については SRLN での判定一致率が 95% であり、一致率の高いことが示されているが、XI-5048 株については、今回特に故意に SRLN でも一致率の比較的低い株 (65%) を選定した。これは 2003 年度及び 2004 年度に認められた SM の感受性結果に関する「過小評価 (耐性株を感受性に判定する)」傾向の原因について検討する事が目的であったが、この株に関する今回の研究参加施設間の一致率は 81.3% と SRLN よりも高く、一概に過小評価の傾向があるとは言えない結果であった。これまでは感受性に判定される傾向が培地に含まれる薬剤濃度に起因する可能性を考察していたが、検査手順 (技術) に問題があることも考慮すべき結果となった。しかもこの結果は、結核研究所で実施している SRLN での精度管理株の結果について、小川培地による標準法と L-J 培地による方法とで SM の感受性結果に差が無い (第 10 回及び 11 回) ことに矛盾せず、却って 2003 年度及び 2004 年度のパネルテスト成績に問題があることを明らかにした。さらには、繰返し実施した外部精度評価パネルテストによって、検査の精度が改善しているとも考えられた。

IX-8563 株については RFP でも 10 施設で耐性菌を感受性と判定していたが、SRLN では 100% の施設間一致を認めた菌株であった。この菌株については最小発育阻止濃度が 2.0µg/ml であり、耐性菌としては低い値であったためと考えられた。このため RFP の感度が平均的に低くなり、感度 95%

を下回る施設が 13 施設（病院 6 施設・検査センター 7 施設）認められた。

施設分類別に結果を比較したところ、病院検査室の精度のばらつきが検査センターに比較して大きいように思われたが、この差異は 2004 年度に病院検査室と検査センターを比較した時に比べて縮小しているように思われた。また、それぞれの施設で、それぞれの評価因子が 0.9 を下回る施設の割合も減少しており、精度の向上が認められる結果であった。

それぞれの評価因子の 2004 年度と 2005 年度の結果を比較しても、菌株の問題から精度が低下した RFP を除いて、他の薬剤については基準を下回る施設の割合が減少したことから、精度が改善したものと考えられた。しかしながら、二年連続で RFP の感度が 95% を下回った施設が 3 施設認められており、このような施設には立入調査が必要と考えられた。パネルの構成による評価の問題点を効率良く除去して精度の低い施設を検出するには、このように連続して低い精度を示すことを基準として用いるのが適当と考えられた。

今回の解析では新たな指標として 指数を導入した。これは判定の一致の程度を示す指標の一つであり、偶然の一致以上に結果が一致しているかどうかを判定するのに有用である。Landis によると $0 \leq \leq 0.2$ はごく軽度の一致、 $0.2 \leq \leq 0.4$ は軽度の一致、 $0.4 \leq \leq 0.6$ は中等度の一致、 $0.6 \leq \leq 0.8$ は高度の一致、 > 0.8 はほぼ完全な一致とされる 8)。指数を用いることにより、差異の原因は別として、感度・特異度の数値からは一見してわかりにくい全体の差異が明瞭に示されたものと思われた。

結果として示されていないが、今回の研究では、参加施設を募る段階でパネルテストの検体数の多さを理由に辞退された施設が多かった。実際にいくつかの施設では、パネルテストを実施するにあたり、業務時間内で 20 株一度に薬剤感受性試験を行うことはできず、一回に 5 株ずつ 4 回に分割して実施していた。

またパネルテストにかかる費用も大きな問題である。例えば MGIT で培養し、ビットスペクトル-SR で試験を実施すると、その他の機材も併せて、1 株あたり約 4,800 円の費用がかかり、パネルテスト一回あたりで約 96,000 円の費用負担が

生じる。これは検査室にとっては大きな負担であり、今後は一回あたりの検体数を減らし、年複数回実施することを検討する必要があると思われる。

【抗酸菌塗抹検査の外部精度評価（外部精度アセスメント用人工喀痰作製に関する研究）】

2004 年度に、ポリアクリルアミドを基質とし、培養細胞および弱毒抗酸菌を使用した人工喀痰を作製したが（資料 1 図 2）、2005 年度は精度保証活動上の実践性について一般の検査室にて評価を行った。

スライドに含まれる細胞成分の状態、菌の分散度、染色性、患者検体と比較した場合の観察の容易さ、及び外観について 8 施設 14 名の検査技師にて評価したところ、菌の分散がやや不十分であった点以外は、90% 以上患者検体と同程度あるいはそれ以上という評価であった。

菌の分散性については二つの意味があり、使用した菌株（BCG Pasteur）が集塊を形成することによる単個菌を得にくいという意味と、小さな集塊を含む全ての菌が媒体中に均一に分散している必要があるという意味である。前者を解決するには二つの方法が考えられる。一つは解釈による解決であり、小さな集塊は「一個」と数えることにより陽性度のばらつきを解決する方法である。もう一つは、もともと集塊性のない非結核性抗酸菌を用いる方法である。これについては現在結核菌に近い形態・染色性を有しているいくつかの非結核性抗酸菌について検討している。結果にも示したように、媒体中へ菌を均一に分散させることは可能であり、容易に単個菌が得られればパネルテスト用標本としては十分と考えられる。

上記の他に今後解決すべき問題として、作製法を簡素化することが挙げられる。材料としての人工喀痰は臨床検体に近い性質を持っており、これを塗抹標本として作製する過程は通常の白金耳による塗抹法である。従って大量に産生するには多くの労力を必要とし、大規模に外部精度活動を実施するにはあまり適当でない。今後は、塗抹過程を省力化する必要があると思われる。

もう一つの問題として、集菌法および培養法の外部精度評価に対応する、加水分解可能な人工喀痰作製がある。数種類のポリマーについて検討し

ており、塗抹標本の外観及び加水分解性が問題であるが、8%のメチルセルロースを用いると生菌の保持性には問題がなく、NALC-NaOHを倍量添加することにより疑似的に粘性を低下させ、集菌法に用いることも可能である。他のポリマーについても引き続き検討を行う。

患者検体のクロスチェックについても実施したが、陽性率が極めて低い場合、大量の検体を再検査する必要があり、必ずしも実際的でなかった。また、実践上の具体的な問題として、検体の選択と収集を実施するコーディネーターの選定に困難があった。これは同一検査室以外から適切な人員を選定し、さらにLQASの概念と実際を理解させる必要があったが、実際にはそれだけの人員と時間の確保が困難であったためである。大規模にクロスチェックを実施するには後述する米国のシステムにもあるように、法的・財政的な背景が必要であると思われる。さらにもう一つ、もとの検体が蛍光染色されている際の再染色に関する問題があった。今回の検体は蛍光法で再染色しても染色性が改善せず、やむを得ず全てチール・ネールゼン染色で再染色を実施した。今回は問題なく評価が可能であったが、蛍光染色を実施多く実施している日本では、途上国の様にクロスチェックを実施することには困難が伴う。

【抗酸菌検査内部精度管理の実践性に関する評価】

今回、機器・設備の精度管理を実施し、その実践性を評価した。

まず機器の温度管理について、確認する時間帯に制約があることが明らかとなった。これは、ふらん器や冷蔵庫等、日中開閉が頻繁な時間帯は温度が安定しないためである。朝一番や午後の安定した時間帯に決めて実施することで実践可能となる。また冷蔵庫については、異常温度を知らせるアラームを設置する、あるいは最高・最低温度記録の温度計で管理する方法もあり、これを明確に示す必要がある。

遠心器の回転数の確認は、日常の繁多な業務中には規定回転数になるまで意外と待ちきれない。毎日初回だけとするか、あるいは遠心機の定常回転数を記録する装置があれば実践性は高まると思われる。同様にオートクレーブの到達温度は、

気付いた時に終了していることが多い。自動で記録できる機器は少なく、習慣にするまで時間がかかる。これも温度を記録する装置があれば実践性は高まると思われる。

安全キャビネットの設備は抗酸菌塗抹検査を実施している以上、必須である。日常吸気・排気圧などの表示を確認することは可能であるが、HEPA フィルターやUVランプの交換時期については明示されていない。これは内部管理事項に追加する必要がある。

検査指針にある10項目の機器管理は重要であるが、管理方法は各施設の運用と関係するため、各使用機器マニュアルに合わせて、まず温度管理を中心に実施することが実践性的と思われる。

【薬剤感受性検査における液体培地迅速法と固体培地標準法のINH基準濃度判定の差違に関する研究】

結核菌薬剤感受性試験を実施する上で液体培地を使った高感度培養法は迅速性の点で有用であり、MGITの利用は拡大している。2004年度の本研究でINHにおける薬剤感受性試験において、MGITによる迅速法と1%小川培地による標準法に差違が認められる例が12.6%あることを報告した。同様の結果の齟齬は2005年の日本結核病学会で他の施設からも報告されており、MGITにて耐性と判定され、標準法にて後日感受性と判定されるという経過である。この齟齬について臨床的に解決する必要がある。

2002年度結核療法研究協議会(療研)の入院時薬剤耐性調査にて全国より収集された結核菌について、療研共同研究施設の許可を受けた上で1,122株に関してBACTEC MGIT 960および小川標準法による比較を行ったところ、小川を標準とした場合、MGITの最終的な感度は100%、特異度は97.1%、一致率97.3%となり、全て95%を越えており、薬剤感受性試験法として良好な成績と考えられた。また、INH耐性菌と判定されて治療内容からINHを除外したとしても、臨床的な治療経過に与える影響は治療期間の延長のみであり、検査の迅速化が与える利益に鑑みて無視し得るものと考えられた。結果として、MGITの感受性試験結果をそのまま臨床的に利用することに問題はないと考えられた。

【米国抗酸菌検査精度保証システム視察】

今回、抗酸菌検査の精度保証に関して、米国のシステムを視察した。米国においては、抗酸菌検査のみではなく、あらゆる臨床検査について細かな精度保証手順が規定されており、法的拘束力を有している。これは病院検査室・検査センターの別なくヒト検体を扱う全ての検査施設に対して有効である。日本においては基本的に衛生検査所（検査センター）の精度保証に対する法的規制はあるものの、病院検査室に対する規制が不明確である。衛生検査所に対する日本の精度保証は米国同様であり、少なくとも同様の基準を病院検査室にも適用し、精度保証を日常的に実施すべき背景を確立する必要が感じられた。

また、外部精度評価の実践について、その経費が「受益者負担」の原則により各検査室から徴収されている点に合理性が感じられた。特に New York 州の精度保証プログラムでは効果的な referral system（レファレンス検査所）が維持されており、日本においてもこのような referral system が少なくとも地域ブロック単位で必要であろうと考えられた。もちろん、そのためには検査施設を機能的に分類・登録し、可能であれば階層化することが必要と思われる。

E. 結論

抗酸菌検査の精度保証について、主に外部精度評価の面から研究した。抗酸菌検査については、その検査の特殊性から外部精度評価の実践が困難であるが、この研究を通して実践性のある方法の開発を含み、解決すべき問題点も明らかとなった。

抗酸菌塗抹検査については、少なくともパネルテストを実施するための材料と方法を確立した。方法的に改善すべき点はあるものの、短期間に検査能力を評価する方法として有用である。クロスチェック（再検査）については、実践のため精度管理責任者のトレーニングと、クロスチェックセンターとも言うべき施設の確保が必須である（衛生研究所あるいは大学がこれに相当するのだろうか）。

世界的には WHO 主導で抗酸菌塗抹検査の外部精度評価が推進されており、既にベトナム、フィ

リピン、モンゴル等 90%以上の施設にクロスチェックによる外部精度アセスメントを実施している国もある。DOTS 実施のプロセス目標である塗抹陽性患者の 70%発見、85%治療成功を達成するには抗酸菌検査室を有効に利用する必要があり、検査精度の確保が重要な課題となっている所以である。このように現在外部精度評価は途上国においてすら重要なキーワードであり、今後は塗抹検査だけでなく培養にも拡充される予定である。日本においても、培養、同定検査の精度保証の具体的方法について検討していく必要がある。

結核菌の薬剤感受性試験は複雑であり、精度を維持することが困難な検査法の一つであるが、本研究班で繰返し実施したパネルテストの結果、本法が精度の低い施設の検出と、検査精度の改善に有用であることが明確となった。今後も継続して実施することが必要と思われるが、実践上の問題点として費用・労力がかかりすぎるものが挙げられており、効果を低下させることなくこれらの問題を改善する必要がある。

米国では既に 1992 年に Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS) が Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)に基づいていくつかの組織（実施機関）を認証し、それらの組織が実施する精度保証プログラムに参加することを義務づけている。塗抹、薬剤感受性試験の外部精度評価だけでなく、今後は日本においても培養・同定・核酸増幅法に関連した外部精度評価を実施して行く必要があると思われる。

F. 健康危機情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 御手洗聡（日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会）: 検査センターを対象とした結核菌薬剤感受性試験外部精度アセスメント．結核 2005; 80: 349-358.
- 2) 御手洗聡（日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会）: 抗酸菌検査施設に対する結核菌薬剤感受性試験外部精度アセスメント．結核（校正中）
- 3) Yamada H, Mitarai S, Aguiman L, Matsumoto H,

and Fujiki A. A novel panel slide preparation method for the proficiency testing of tuberculosis microscopy with polyacrylamide gel, cultured cell and avirulent mycobacteria. Intl J Tuber Lung Dis. (*in revision*)

2. 学会発表

- 1) 御手洗聡：抗酸菌検査の精度保証（ワークショップ）. 臨床微生物学会 横浜市 2006年1月28日
- 2) Yamada H, Mitarai S, Aguilan L and Fujiki A. Evaluation of a novel artificial sputum developed for panel test slides to be used in external quality assessment. 36th World conference on IUATLD. Paris 2005.
- 3) Mitarai S (Tuberculosis Research Committee: Ryoken). Drug Resistance Surveillance to Major Anti-tuberculosis Drugs in Japan. 36th World conference on IUATLD. Paris 2005.
- 4) Mitarai S. Panel testing and supervision in external quality assessment of smear microscopy. AFB-Microscopy and EQA for Laboratory Consultants Workshop. Antwerp, Institute of Tropical Medicine. August 1 - 4, 2005.
- 5) 御手洗聡：結核菌薬剤感受性試験の現状．臨床抗酸菌研究会 さいたま市 2005年5月12日
- 6) 山田博之、御手洗聡、藤木明子：既存のパネルテストスライド作製法の検証と新規人工喀痰スライドの可能性．第80回日本結核病学会総会 さいたま市 2005年5月13日
- 7) 御手洗聡（日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会）：検査センターを対象とした結核菌薬剤感受性試験外部精度アセスメント．第80回日本結核病学会総会 さいたま市 2005年5月13日
- 8) 大友幸二（結核化学療法研究協議会）：2002年度療研結核菌薬剤耐性全国調査報告（2）．第80回日本結核病学会総会 さいたま市 2005年5月12日
- 9) 御手洗聡（結核化学療法研究協議会）：2002年度療研結核菌薬剤耐性全国調査報告（1）．第80回日本結核病学会総会 さいたま市 2005年5月12日

10) Yamada H, Mitarai S, and Fujiki A. Evaluation of two methods for preparation of panel test slides using NaOH or NALC. 35th World conference on IUATLD. Paris 2004.

11) 御手洗聡：液体培地や遺伝子を用いた新しい薬剤感受性試験（シンポジウム）. 第79回日本結核病学会総会 名古屋 2004年4月20日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

< 研究協力者 >

山田博之

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター病理検査科

大友幸二

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科

水野和重

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科

藤木明子

結核研究所研究部

秋谷逸雄

東京都立墨東病院臨床検査科細菌検査室

赤津義文

日立製作所日立総合病院検査技術科微生物検査室

石川恵子

浦安市市川市病院組合浦安市川市民病院検査科細菌検査室

板垣智之

立正佼成会附属佼成病院臨床研究技術部微生物検査室

近松絹代

帝京大学医学部附属病院中央検査部細菌検査室

伊藤真浩

東芝林間病院臨床検査科細菌検査室

吉岡浩明

埼玉県立循環器・呼吸器センター検査技術部細菌検査室

米澤 仁

川崎社会保険病院検査部細菌検査室

和田雅子

結核予防会結核研究所研究部

阿部千代治

日本ベクトンディッキンソン

手塚隆善

日本ベクトンディッキンソン

小林郁夫

日本ベクトンディッキンソン

樋口武史

京都大学医学部附属病院臨床検査部

分担研究課題 結核患者収容のための施設基準の策定に関する研究
資料 1

表4 薬剤感受性試験の薬剤別・試験法別パネルテスト成績

指標	方法別成績(平均値・最小値・最大値)																	
	ピットスベクトル-SR			ウエルバックS			MGIT		BrothMIC MTB-I			1%小川標準法			総計			
	n=30	最小値	最大値	n=16	最小値	最大値	n=10	最小値	最大値	n=6	最小値	最大値	n=2	最小値	最大値	n=64	最小値	最大値
INH																		
感度	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.993	0.929	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.929	1.000
特異度	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.983	0.833	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.997	0.833	1.000
耐性的中率	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.993	0.933	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.933	1.000
感受性的中率	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.983	0.857	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	0.857	1.000
一致率	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	0.950	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	0.950	1.000
再現性	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	0.900	1.000
指数	1.000			1.000			0.976			1.000			1.000			0.996		
RFP																		
感度	0.955	0.833	1.000	0.995	0.917	1.000	0.983	0.833	1.000	0.933	0.667	1.000	0.958	0.917	1.000	0.969	0.667	1.000
特異度	1.000	1.000	1.000	0.992	0.875	1.000	0.988	0.875	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.996	0.875	1.000
耐性的中率	1.000	1.000	1.000	0.995	0.949	1.000	0.991	0.949	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	0.949	1.000
感受性的中率	0.938	0.720	1.000	0.992	0.837	1.000	0.975	0.720	1.000	0.909	0.563	1.000	0.941	0.837	1.000	0.948	0.563	1.000
一致率	0.973	0.900	1.000	0.994	0.950	1.000	0.985	0.900	1.000	0.960	0.800	1.000	0.975	0.950	1.000	0.980	0.800	1.000
再現性	0.996	0.900	1.000	0.992	0.900	1.000	0.986	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	0.950	0.900	1.000	0.992	0.900	1.000
指数	0.945			0.987			0.968			0.918			0.948			0.958		
SM																		
感度	0.939	0.667	1.000	0.979	0.750	1.000	0.856	0.667	1.000	0.867	0.667	1.000	1.000	1.000	1.000	0.928	0.667	1.000
特異度	1.000	1.000	1.000	0.938	0.750	1.000	0.987	0.833	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.982	0.750	1.000
耐性的中率	1.000	1.000	1.000	0.959	0.903	1.000	0.990	0.907	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.993	0.903	1.000
感受性的中率	0.916	0.563	1.000	0.968	0.632	1.000	0.819	0.543	1.000	0.833	0.563	1.000	1.000	1.000	1.000	0.889	0.543	1.000
一致率	0.963	0.800	1.000	0.963	0.850	1.000	0.908	0.750	1.000	0.920	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	0.950	0.750	1.000
再現性	0.996	0.900	1.000	0.969	0.800	1.000	0.929	0.800	1.000	0.975	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	0.978	0.800	1.000
指数	0.925			0.921			0.815			0.839			1.000			0.897		
EB																		
感度	0.987	0.800	1.000	0.994	0.900	1.000	0.990	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.991	0.800	1.000
特異度	0.983	0.800	1.000	0.975	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986	0.800	1.000
耐性的中率	0.983	0.921	1.000	0.975	0.921	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.994	0.921	1.000
感受性的中率	0.987	0.682	1.000	0.994	0.811	1.000	0.990	0.811	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.983	0.682	1.000
一致率	0.985	0.900	1.000	0.984	0.900	1.000	0.995	0.950	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.988	0.900	1.000
再現性	0.992	0.800	1.000	0.992	0.900	1.000	0.986	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.992	0.800	1.000
指数	0.970			0.969			0.990			1.000			1.000			0.976		

表5 被験菌株ごとの施設間一致率

菌株	ID	INH		RFP		SM		EB	
		標準判定	一致率	標準判定	一致率	標準判定	一致率	標準判定	一致率
XI-5064	1a	R	0.984	R	0.969	R	0.984	R	0.953
XI-5064	1b	R	0.984	R	0.984	R	0.984	R	0.953
IX-9094	2a	S	1.000	S	1.000	R	1.000	S	1.000
IX-9094	2b	S	0.984	S	0.984	R	0.984	S	1.000
V-59	3a	R	0.984	R	0.984	S	0.938	S	0.953
V-59	3b	R	0.984	R	0.984	S	0.953	S	0.922
IX-8563	4a	R	1.000	R	0.844	R	0.813	S	1.000
IX-8563	4b	R	1.000	R	0.844	R	0.750	S	1.000
XI-44	5a	S	1.000	R	0.984	S	0.969	S	1.000
XI-44	5b	S	1.000	R	0.969	S	1.000	S	1.000
XI-5048	6a	R	1.000	R	1.000	R	0.813	R	1.000
XI-5048	6b	R	1.000	R	1.000	R	0.813	R	1.000
X-1649	7a	R	1.000	S	1.000	S	1.000	R	1.000
X-1649	7b	R	1.000	S	1.000	S	1.000	R	1.000
V-58	8a	R	1.000	S	1.000	R	1.000	R	1.000
V-58	8b	R	0.984	S	0.984	R	0.969	R	0.969
VIII-475	9a	R	0.984	R	0.984	R	0.984	R	0.984
VIII-475	9b	R	0.984	R	0.984	R	0.984	R	0.984
IV-83	10a	S	1.000	S	1.000	S	1.000	S	0.984
IV-83	10b	S	1.000	S	1.000	S	1.000	S	1.000

表6 施設分類別に応じたパネルテスト成績

検査室分類	薬剤	感度			特異度			一致率			再現性			指数
		平均値	最小値	最大値	平均値	最小値	最大値	平均値	最小値	最大値	平均値	最小値	最大値	
病院検査室 (n=37)	INH	0.998	0.929	1.000	0.995	0.833	1.000	0.997	0.950	1.000	0.996	0.900	1.000	0.994
	RFP	0.975	0.667	1.000	0.997	0.875	1.000	0.984	0.800	1.000	0.991	0.900	1.000	0.966
	SM	0.923	0.667	1.000	0.990	0.750	1.000	0.950	0.750	1.000	0.974	0.800	1.000	0.897
	EB	0.989	0.800	1.000	0.981	0.800	1.000	0.985	0.900	1.000	0.991	0.800	1.000	0.970
検査センター (n=27)	INH	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	RFP	0.960	0.833	1.000	0.995	0.875	1.000	0.974	0.900	1.000	0.993	0.900	1.000	0.946
	SM	0.935	0.667	1.000	0.972	0.750	1.000	0.950	0.800	1.000	0.981	0.800	1.000	0.897
	EB	0.993	0.900	1.000	0.993	0.800	1.000	0.993	0.900	1.000	0.993	0.900	1.000	0.985

表7 感受性試験パネルテスト成績の推移

薬剤	INH				RFP				SM				EB			
	2004		2005		2004		2005		2004		2005		2004		2005	
	検査室数	比率	検査室数	比率	検査室数	比率	検査室数	比率	検査室数	比率	検査室数	比率	検査室数	比率		
感度95%以下	0	0.000	1	0.016	9	0.188	13	0.203	29	0.604	24	0.375	1	0.021	5	0.078
特異度95%以下	2	0.042	1	0.016	0	0.000	2	0.031	4	0.083	5	0.078	7	0.146	5	0.078
一致率90%以下	1	0.021	0	0.000	0	0.000	1	0.016	11	0.229	9	0.141	2	0.042	0	0.000
再現性90%以下	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	1	0.021	2	0.031	2	0.042	1	0.016
指数0.8以下	1	0.019	0	0.000	0	0.000	1	0.016	11	0.212	13	0.203	3	0.058	0	0.000

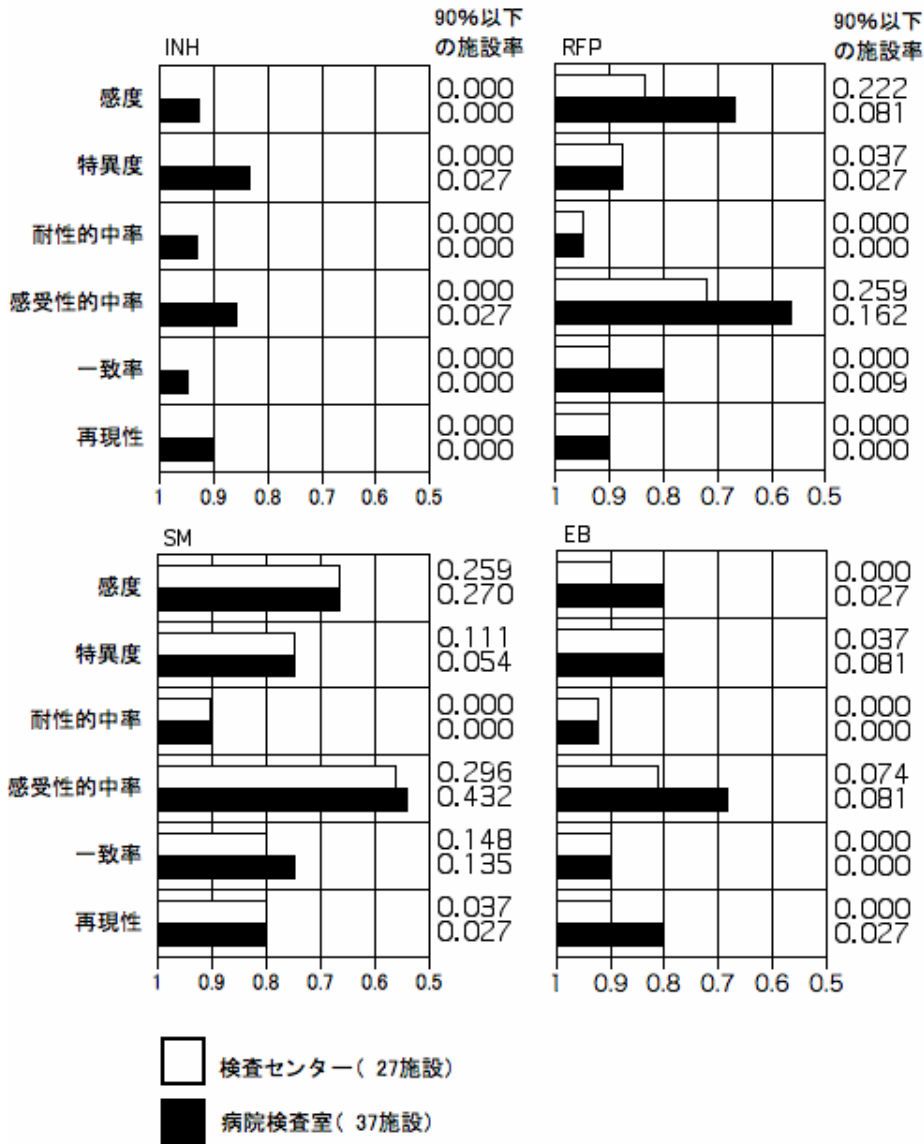


図1 検査センターおよび病院検査室への薬剤感受性試験パネルテスト結果の比較

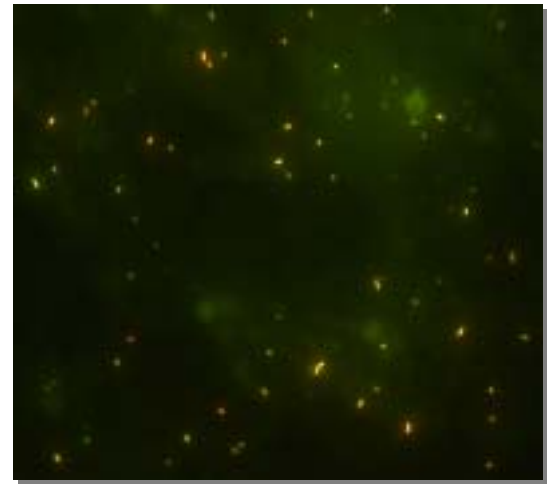
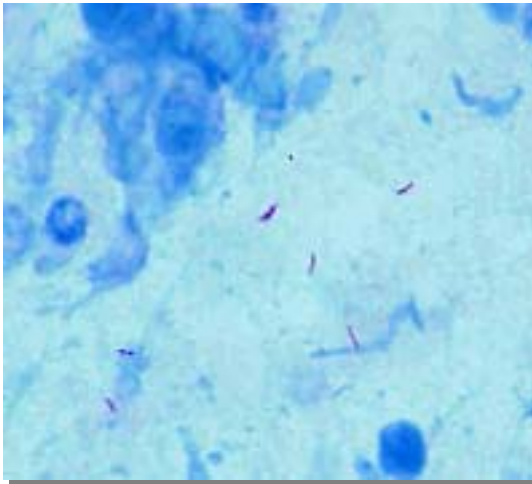
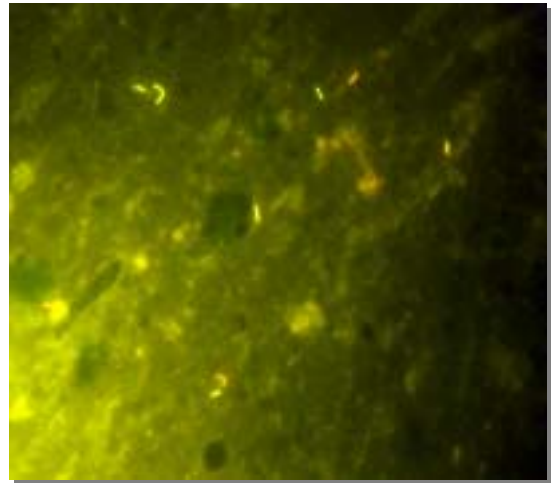
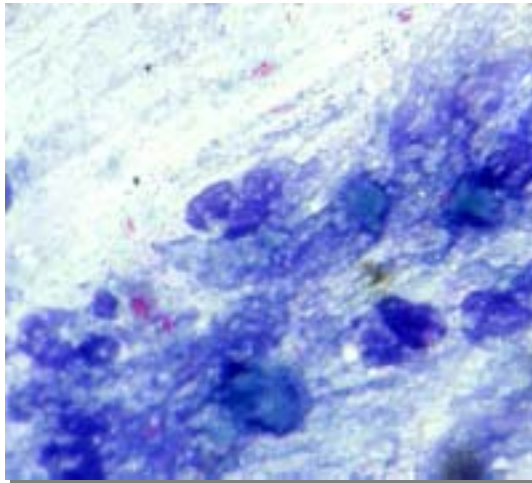
表 13 一般病院検査室での検査機器に関する内部精度管理実施状況（7施設）

施設規模	分類								評価対象項目数	実施項目数	未実施項目数×	実施成功率 %	未実施率 %	
	A	C	B	D	E	F	G							
施設規模	施設													
	病床数	1154	368	772	567	308	363	344						
	検査技師数	50	30	44	42	18	33	18						
	結核病棟数	0	100	10	0	0	0	0						
	微生物担当技師数	6	3	6	4	1.5	3	2						
検査内容	直接塗抹検査	塗抹至急対応												
	PCR検査													
	培養検査	液体・固形培地 MGIT MGIT MGIT ビット培地 小川・工藤												
	同定検査	イムノクロマト法 (キャピリアTB)												
		DNAプローブ法 ×												
	ハイブリダイゼーション法 (DDH)													
	その他													
	薬剤感受性検査	マイコドット												
一般的注意	全ての記録の保存	2年間 × × × × × × × ×												
	在庫管理	培地(購入日・出庫日)	購	購	購・出	購	購	購	未					
		染色液(購入日・出庫日)	購	購	購・出	購	作	購	購					
		試薬(購入日・出庫日)	購	購	購・出	購	購	購	購					
検診	定期的な検診 × ×													
機器・設備	安全キャビネット	毎日の消毒						未	6	6	0	100	0	
		吸気・排気量の記録	×		×		×	未	×	6	2	4	33.3	66.7
		向内流圧	×	×	×		×	未	×	6	1	5	16.7	83.3
		気流パターン	×	×	×	×	×	未	×	6	0	6	0	100
		漏電	×		×		×	未	×	6	2	4	33.3	66.7
		異常振動・騒音	×				×	未	×	6	3	3	50	50
		UVランプのチェック	×				×	未		6	4	2	66.7	33.3
	バイオハザード遠心器	定期的なフィルター交換	×		×	×	×	未	×	6	1	5	16.7	83.3
		回転数					×	未	未	5	4	1	80	20
		温度					×	未	未	5	4	1	80	20
	pHメーター	ヘアリング	×	×	×		×	未	未	5	1	4	20	80
		標準液購入日と使用開始日の記録	未	未	未	未	未	未	未					
	顕微鏡	油浸レンズの清掃				×				7	6	1	85.7	14.3
	M G I T	LEDランプ			×	未	未	未	未	3	2	1	66.7	33.3
		温度記録	MGIT				未	未	未	未	3	3	0	100
ふらん器			×				×			7	5	2	71.4	28.6
オートクレーブ (到達温度)			×		×		×			7	4	3	57.1	42.9
冷蔵庫			×				×			7	5	2	71.4	28.6
恒温槽(使用前後)			×		未		未		未	4	3	1	75	25
超音波恒温槽 (温度・水面の波動・水位)			未		未	未	未	未	未	1	1	0	100	0
バイオハザード低温遠心器			×				未	未	未	4	3	1	75	25
ヒートブロック内部	×	未	×	未	×	未	未	3	0	3	0	100		
サーマルサイクラー	未	未	×	未	×	未	未	2	0	2	0	100		
機器・設備の評価 (4領域)	評価対象項目数	20	20	20	17	17	5	12	111	60	51	54.1	45.9	
	実施項目数	6	17	10	14	2	5	6	60					
	未実施項目数	14	3	10	3	15	0	6	51					
	実施成功率 (%)	30	85	50	82.4	11.8	100	50	54.1					
	未実施率 (%)	70	15	50	17.6	88.2	0	50	45.9					

分類

- ： 薬剤感受性検査まで実施
- ： 同定検査まで実施（結核菌のみを含む）
- ： 培養検査まで実施
- ： 直接塗抹検査のみ実施
- 直接塗抹検査と PCR 検査のみ実施
- ： 実施
- ： 外注
- ×： 実施せず
- 未： 未使用
- 購： 購入日のみ記録
- 購・出： 購入日と出庫日を記録
- 作： 作製日を記録
- ： 不定期

図2 人工喀痰による塗抹標本と患者検体



左上：患者喀痰検体（チール・ネールゼン染色）
右上：患者喀痰検体（蛍光染色）
左下：人工喀痰標本（チール・ネールゼン）染色
右下：人工喀痰標本（蛍光染色）