

原 著

フィールドにおける結核菌塗抹検査の評価

— ネパール, イエメン, フィリピンの事例より —

藤 木 明 子

結核予防会結核研究所

受付 平成3年7月18日

EVALUATION OF SPUTUM SMEAR EXAMINATION

— From the Cases of Nepal, Yemen and the Philippines —

Akiko FUJIKI*

(Received for publication July 18, 1991)

Evaluation of sputum smear examination was carried out with smear slides stained by the Ziehl-Neelsen method, which were collected from Nepal, Yemen and the Philippines. The smear slides were checked macroscopically and microscopically according to the following points : 1) smear area size, 2) thickness of smear, 3) evenness of smear, 4) decolorizing condition by Ziehl-Neelsen stain, 5) smear cleanness, 6) presence of cells in sputum and 7) smear reading accuracy by cross-checking.

As the result of smear slide evaluation, it was concluded that proper sputum specimens have been smeared but smears were generally too thin and contaminated with too many dirt.

Agreement rate of the slide reading in Nepal, Yemen and the Philippines were 73%, 90% and 88% respectively. Disagreement cases were concentrated in the subtle number of acid-fast bacilli or (±) and (+) results. The cause of disagreement might be attributed to contamination with debris, deposit etc., which hindered reading or were misread as acid-fast bacilli.

Some improvement should be considered to eliminate the dirt, such as filtration of carbol fuchsin solution, preparation of proper quantity of carbol fuchsin solution to be consumed within three months, mixing the fuchsin stock solution and 5% carbol solution just before use, rinsing the mouth before sputum collection, usage of clean sputum container and slides, and smearing and drying of the slides within clean environment.

However, in many developing countries there are many difficulties for facilities, equipments, system and management. Some of these difficulties may be solved by the efforts of laboratory side but some are beyond the limits of their efforts. Under such circumstance, there should be limitation in keeping and maintaining the quality of the examination.

* From the The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose 204 Japan.

When evaluation or quality check of smear examination is attempted, the quality must be defined taking such background conditions into consideration.

Key words : AFB microscopy, Quality control, Sputum, Sputum smear examination, Smear slide evaluation, Tuberculosis

キーワード : 抗酸菌鏡検検査, 精度管理, 喀痰, 喀痰塗抹検査, 塗抹標本評価, 結核

緒 言

結核菌検査は、結核診断の重要な検査法であるが、特に喀痰塗抹検査は、開発途上国では中心的な患者発見法となっている¹⁾。そのため患者発見の成否は、検査の技術の質にかかっており、人材の質、量ともに不足している途上国ではその技術評価は、技術のレベル向上に反映させるためにも重要である。しかしながら、現状では検査の改善のための評価法は確立されていない。

喀痰塗抹検査技術は²⁾、大きく1) 喀痰検体採取、2) 塗抹標本作成、3) 染色、4) 鏡検の4つの段階から成り立っており、それぞれの段階の手技が適切に行われていなければ技術の質を保つことはできない。

ここでは、途上国のフィールド現場から集められた標本をもとに、塗抹標本作成の現状やその問題点を探るとともに、標本を通してみた検査の評価を試みた。

材料および方法

用いた塗抹標本検体は、ネパールおよびイエメンの結核対策プロジェクト、フィリピンの労働安全対策プロジェクトから集められた。ネパールの検体は、1989年6月～8月に検査されたもののうち、現地で抗酸菌陽性と判定された標本すべてと、抗酸菌陰性と判定された標本のうちの約1割の陰性標本である。イエメンの検体は、1990年6月～7月に検査された検体から無作為に集めた標本である。フィリピンの検体は、1990年8月～9月に検査されたすべての標本である。

これらの喀痰塗抹染色標本は、スライドケースに保管され東京(結核研究所)へ携行された。そして次の点について、肉眼および鏡検下でチェックされた。

1) 塗抹標本作成の質

肉眼的に塗抹部分の大きさ、厚さ、塗抹の均等性(塗抹ムラの有無)を観察した。塗抹部分の大きさの基準は、 $2 \times 1.5 \sim 3$ cm とし、厚さや均等性については、それぞれプリントされた新聞紙上4～5 cm から塗抹部分を通して文字が見えるか否か、また塗抹部分が偏らずにまんべんなく喀痰が塗布されているかを目安とした。

2) 染色技術の質

鏡検下(1000倍総合倍率)で塗抹材料部分の脱色に

よる染色分別の度合いを観察した。染色分別の度合いは、脱色十分、脱色不十分、脱色のしすぎの3段階に分けた。また染色液結晶沈殿物、食物残渣、外部からの混入物による標本の汚れも観察した。

3) 検体としての喀痰の質

鏡検下(100倍総合倍率)で好中球の有無を指標として、その数により観察した。数はGecklerの分類³⁾を基にして、好中球なし、10個以下、10～25個、25個以上、その他不明細胞の5段階に分類した。

4) 抗酸菌鏡検の質

評価者が標本の鏡検クロスチェックを行った結果を基準として、現地から報告された抗酸菌鏡検結果の一致/不一致を比較観察した。鏡検結果は、現地で用いられているものと同じスケールに従った。すなわち、300視野中抗酸菌なし(-)、1～2(±)、100視野に1～9(+), 10視野に平均抗酸菌数1～9(+)、各視野に平均抗酸菌数1～9(++)、9以上(+++)とした。ただしネパールを除いては、陽性のスケールの分類は(+++)までであった。

結 果

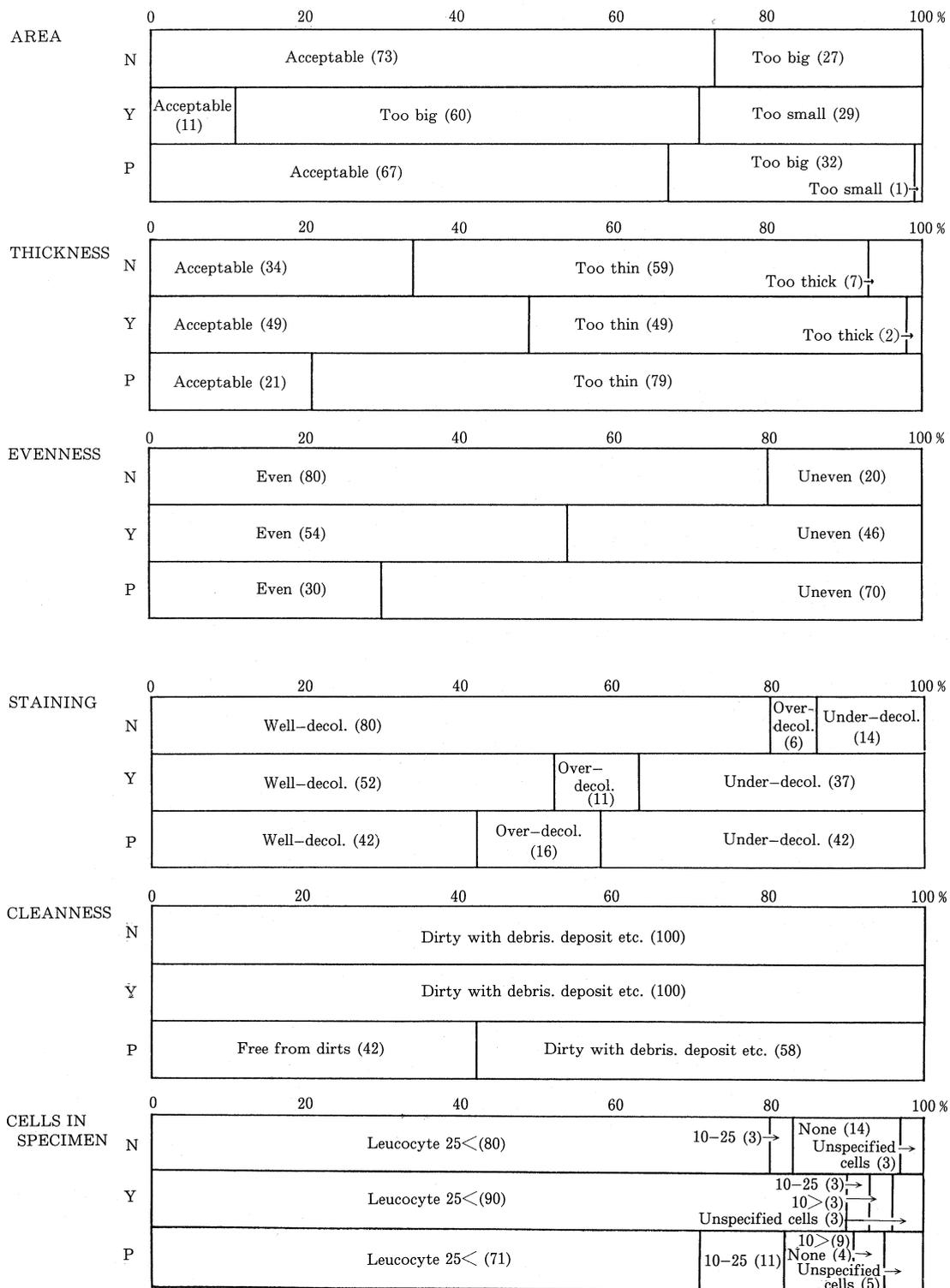
1) 標本数

Table 1 に示すとおり、集められた検体は、ネパール71検体、イエメン63検体、フィリピン76検体、総計標本数は、210検体であった。現地における抗酸菌鏡検結果は、(-)102検体(49%)、(±)5検体(2%)、(+)51検体(24%)、(++)32検体(15%)、(+++)19検体(9%)、(++++)1検体(1%)であった。陰性と陽性の割合はそれぞれ49%、51%であった。これら総検体のなかで、ネパール群の陽性率の占める割合が他の2群より高いのは「材料および方法」の項で述べたように、検体の集めかたの違いによるものである。

2) 塗抹、染色、喀痰の質

塗抹標本の評価結果をチェック項目毎に、Fig. 1 にまとめた。

「塗抹の大きさ」について、イエメン群には大きいサイズが60%と多数を占める一方、小さいサイズも29%あって、適切な大きさは11%にすぎないのが注目された。他の2群でも大きいサイズがほぼ30%にみられた。



(Note) Institutions where smear slides collected and total smear slides. N : Nepal (N=71), Y : Yemen (N=63), P : Philippines (N=76)

Fig. 1. Proportion of Evaluation Results for Stained Smears

Table 1. Number of the Sputum Smear Slides and Report of Examined Results by Institutions

Institutions	Total of Smear Slides (%)	Reported Smear Result					
		(-)	(±)	(+)	(++)	(###)	(####)
Total	210 (100.0)	102 (48.6)	5 (2.4)	51 (24.3)	32 (15.2)	19 (9.0)	1 (0.5)
1) Nepal	71 (100.0)	19 (26.8)	0	37 (52.1)	7 (9.9)	7 (9.9)	1 (1.4)
2) Yemen	63 (100.0)	36 (57.1)	0	9 (14.3)	10 (15.9)	8 (12.7)	0
3) Philippines	76 (100.0)	47 (61.8)	5 (6.6)	5 (6.6)	15 (19.7)	4 (5.3)	0

(Note) Reporting Scale : (-) : No AFB found/300VF, (±) : 1~2 AFB/300VF, (+) : 1~9 AFB/100VF
 (++) : 1~9 AFB/10VF, (###) : 1~9 AFB/1VF, (####) : 9≤/VF

「塗抹の厚さ」では3群を通じて薄すぎる塗抹が多く、特にネパール群の標本においては、塗抹が著しく薄く肉眼的に塗抹部分を見分けるのが困難なものであった。3群のなかで薄い標本の占める割合がフィリピン群に最も高くみられ、ほぼ80%が薄い塗抹であった。またネパール、イエメン群にもそれぞれおおよそ60%、50%の薄すぎる塗抹がみられた。

「塗抹の均等性」は、フィリピン群の標本に不均一が70%と目立って高かった。

「染色技術の質」に関しては塗抹材料部分の染色分別が適切に行われ、塗抹材料の無い部分では色素沈着がなく脱色が適切に行われているかどうかで評価すると、ネパール群では80%が適切に染色されていたが、イエメン、フィリピン群では脱色不十分が37%、42%と多く、適切な染色はそれぞれ52%、42%にすぎなかった。

「標本の汚染」についてみると、ネパール、イエメン

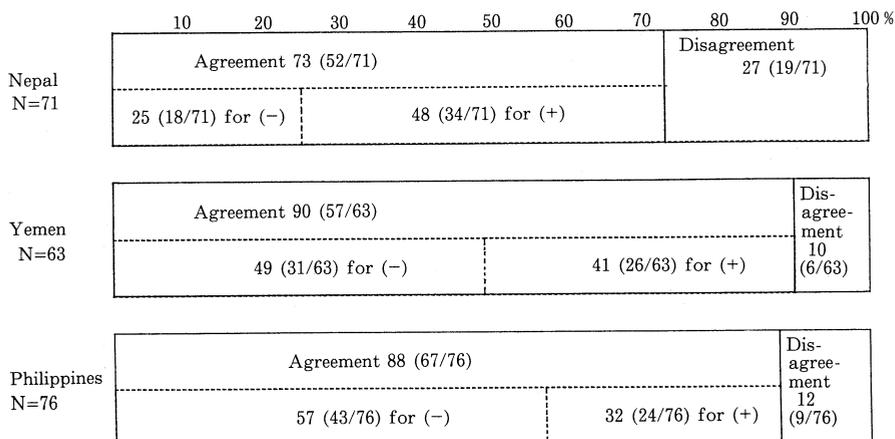
両群の全標本が大小さまざまの染色液の結晶沈殿物や食物残渣、外部から混入したと思われるゴミなどによって標本一面が汚れていた。フィリピン群の標本でさえほぼ60%が汚染されていた。

「喀痰の質」を好中球数を算定することによって唾液と区別した場合、フィリピン群の標本のおおよそ30%が好中球25個以下の材料であった。

3) 抗酸菌鏡検結果の一致と不一致

標本鏡検結果の一致率と不一致率の割合は、Fig. 2に示すとおりである。一致率はネパール、イエメン、フィリピンの3群では、それぞれ73% (52/71)、90% (57/63)、88% (67/76)であった。

次に不一致例をみると、Fig. 3に示すようにネパールとフィリピン群では、陰性を陽性と判定した読みすぎ例(偽陽性)がそれぞれ18/19 (95%)、5/9 (56%)が多かったが、イエメンでは逆に陽性を陰性と判定した



(Parenthesis indicates the actual number)

Fig. 2. Proportion of Agreement and Disagreement

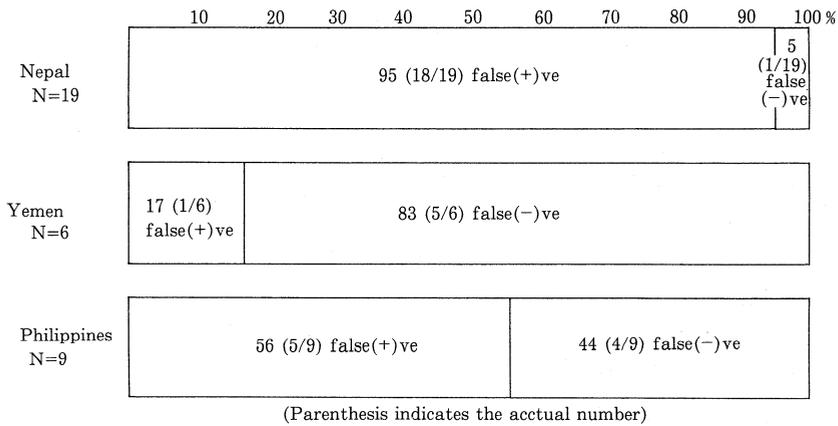


Fig. 3. Disagreement for Negative and Positive

Table 2. Comparison of Reported and Assessed Smear Results

Smear Result by Assessor	Reported in Nepal						Total	Reported in Yemen					Total
	(-)	(±)	(+)	(#)	(##)	(###)		(-)	(±)	(+)	(#)	(##)	
(-)	18	0	15	2	1	0	36	31	0	0	1	0	32
(±)	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
(+)	0	0	3	0	1	0	4	3	0	6	3	1	13
(#)	0	0	10	2	0	0	12	0	0	1	2	2	5
(##)	1	0	5	3	1	1	11	2	0	2	4	5	13
(###)	0	0	3	0	4	0	7						
Total	19	0	37	7	7	1	71	36	0	9	10	8	63

Smear Result by Assessor	Reported in Philippines					Total	Total						
	(-)	(±)	(+)	(#)	(##)		(-)	(±)	(+)	(#)	(##)	(###)	Total
(-)	43	4	1	0	0	48	92	4	16	3	1	0	116
(±)	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	2
(+)	2	1	2	1	0	6	5	1	11	4	2	0	23
(#)	1	0	2	11	0	14	1	0	13	15	2	0	31
(##)	0	0	0	3	4	7	3	0	7	10	10	1	31
(###)							0	0	3	0	4	0	7
Total	47	5	5	15	4	76	102	5	51	32	19	1	210

(Note) Agreement cases for positive were enclosed with dotted line.

見落とし例（偽陰性）が5/6（83%）と大部分であった。これら3群の不一致例をみると、評価者、報告者がともに（±）または（+）と判定している抗酸菌が少ない数の標本に集中していた。

また陽性のグレイドによる不一致例をみると、Table 2に示すように、現地の報告者は一般にグレイドを低く

読む傾向がみられた。

さらに鏡検結果の一致/不一致を塗抹標本評価チェック項目毎に観察したものがTable 3である。標本の評価チェック項目を適切なものと不適切なものとして分けてみた場合、ネパール群の陰性に対する塗抹の厚さの鏡検結果に有意の差がみられた。すなわち一致の75%が

Table 3. Evaluation Results of Stained Sputum Smears by Agreement and Disagreement Cases

	Positive																	
	Nepal						Philippines											
	Yemen			Philippines			Nepal			Yemen			Philippines					
	Total	Agree	Disagree	Total	Agree	Disagree	Total	Agree	Disagree	Total	Agree	Disagree	Total	Agree	Disagree			
Total	36	18	18	32	31	1	48	43	5	35	34	1	31	26	5	28	24	4
1) Area	30 (100)	15 (50)	15 (50)	2 (100)	1 (50)	1 (50)	33 (100)	29 (87.9)	4 (12.1)	22 (100)	21 (95.5)	1 (4.5)	5 (100)	5 (100)	0	18 (100)	15 (83.3)	3 (16.7)
• Acceptable	6 (100)	3 (50)	3 (50)	19 (100)	19 (100)	0	14 (100)	13 (92.9)	1 (7.1)	13 (100)	13 (100)	0	19 (100)	16 (84.2)	3 (15.8)	10 (100)	9 (90)	1 (10)
• Too big	0	0	0	11 (100)	11 (100)	0	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0	7 (100)	5 (71.4)	2 (28.6)	0	0	0
• Too small																		
2) Thickness	16 (100)	12 (75)	4 (25)	11 (100)	11 (100)	0	11 (100)	11 (100)	0	8 (100)	8 (100)	0	20 (100)	18 (90)	2 (10)	5 (100)	5 (100)	0
• Acceptable	17 (100)	5 (29.4)	12 (70.6)	20 (100)	19 (95)	1 (5)	37 (100)	32 (86.5)	5 (13.5)	25 (100)	25 (100)	0	11 (100)	8 (72.7)	3 (27.3)	23 (100)	19 (82.6)	4 (17.4)
• Too thin	3 (100)	1 (33.3)	2 (66.7)	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0	2 (100)	1 (50)	1 (50)	0	0	0	0	0	0
• Too thick																		
3) Evenness	33 (100)	16 (48.5)	17 (51.5)	18 (100)	17 (94.4)	1 (5.6)	15 (100)	14 (93.3)	1 (6.7)	24 (100)	23 (95.8)	1 (4.2)	16 (100)	14 (87.5)	2 (12.5)	8 (100)	8 (100)	0
• Even	3 (100)	2 (66.7)	1 (33.3)	14 (100)	14 (100)	0	33 (100)	29 (87.9)	4 (12.1)	11 (100)	11 (100)	0	15 (100)	12 (80)	3 (20)	20 (100)	16 (80)	4 (20)
• Uneven																		
4) Staining	30 (100)	14 (46.7)	16 (53.3)	22 (100)	22 (100)	0	23 (100)	21 (91.3)	2 (8.7)	27 (100)	26 (96.3)	1 (3.7)	11 (100)	7 (63.6)	4 (36.4)	9 (100)	9 (100)	0
• Well-decol.	1 (100)	0	1 (100)	0	0	0	1 (100)	1 (100)	0	3 (100)	3 (100)	0	7 (100)	7 (100)	0	11 (100)	9 (81.8)	2 (18.2)
• Over-decol.	5 (100)	4 (80)	1 (20)	10 (100)	9 (90)	1 (10)	24 (100)	21 (87.5)	3 (12.5)	5 (100)	5 (100)	0	13 (100)	12 (92.3)	1 (7.7)	8 (100)	6 (75)	2 (25)
• Under-decol.																		
5) Cleanliness	0	0	0	0	0	0	13 (100)	13 (100)	0	0	0	0	0	0	0	19 (100)	15 (78.9)	4 (21.1)
• Free from dirt	36 (100)	18 (50)	18 (50)	32 (100)	31 (96.9)	1 (3.1)	35 (100)	30 (85.7)	5 (14.3)	35 (100)	34 (97.1)	1 (2.9)	31 (100)	26 (83.9)	5 (16.1)	9 (100)	9 (100)	0
• Dirty with debris deposit, etc.																		
6) Cells in Specimen	25 (100)	13 (52)	12 (48)	28 (100)	27 (96.4)	1 (3.6)	29 (100)	26 (89.7)	3 (10.3)	32 (100)	31 (96.9)	1 (3.1)	29 (100)	24 (82.8)	5 (17.2)	25 (100)	22 (88)	3 (12)
• Leucocyte 25<	2 (100)	1 (50)	1 (50)	1 (100)	1 (100)	0	6 (100)	6 (100)	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)	0	2 (100)	2 (100)	0
• 10~25	0	0	0	1 (100)	1 (100)	0	7 (100)	6 (85.7)	1 (14.3)	0	0	0	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0
• 10>	8 (100)	3 (37.5)	5 (62.5)	0	0	0	3 (100)	3 (100)	0	2 (100)	2 (100)	0	0	0	0	0	0	0
• None	1 (100)	1 (100)	0	2 (100)	2 (100)	0	3 (100)	2 (66.7)	1 (33.3)	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0	1 (100)	0	1 (100)
• Unspecified Cells																		

Table 4. Number of Cells in Thin Smear Slides

Institution	Nepal	Yemen	Philippines
Total	42 (100)	31 (100)	60 (100)
Leucocyte			
25<	32 (76.2)	25 (80.6)	38 (63.3)
10~25	1 (2.4)	2 (6.5)	8 (13.3)
10>	0	2 (6.5)	7 (11.7)
NIL	7 (16.7)	0	3 (5.0)
Unspecified cells only	2 (4.8)	2 (6.5)	4 (6.7)

適切な厚さの標本, また不一致の70%が不適切な厚さ(薄いまたは厚すぎる)であった。

考 察

塗抹標本の評価項目から, ネパール, イエメン, フィリピンの3群に共通してみられる塗抹標本の特徴は, 「検体として適切な喀痰が塗抹されているが, 喀痰塗布の薄い, ゴミの多い標本である」ことがいえる。

これら薄すぎる塗抹標本を検討すると, Table 4に示したように, 細胞の存在しない標本は, わずかネパール群に7例, フィリピン群に3例見られるのみである。残りの標本のうち70%強が好中球25個以上存在するもので, 下気道から喀出された痰が塗抹されているといえる。したがって塗抹の薄さの原因は喀痰検体そのものの質によるものではなく, 喀痰部位を選ぶ際に, 膿様部より粘液部を多く含めて取っているためではないかと推察される。またネパールにおいては, 喀痰塗抹には白金耳の代わりにヒゴ棒⁴⁾を用いている。そのためスライドガラス上の検体塗抹はいいに行えるが, 塗抹検体量が十分ヒゴ棒では取れないことに由来しているのではないかと考えられる。

菌の陽性率を考えた場合, 塗抹するには喀痰の質⁵⁾, 量とともに喀痰部位の選択が重要である。しかし, 鏡検結果の再現性からみると, 薄い塗抹標本に高い一致率がみられ, 適切な喀痰部位が塗抹されているならば, むしろ薄い塗抹が適切と思われる。

鏡検技術の質の目安として鏡検結果の一致をみると, イエメン群が最も高く90%, 次いでフィリピン群88%, ネパール群73%であった。イエメンとフィリピン群には有意の差はなく, フィリピンとネパール群には有意の差がみられた。また一致率を抗酸菌数のグレードまでを考慮してみた場合, 3群とも決して高いとは言えず, 抗酸菌を定性的に確認はするが, 定量的に読む技術が十分でないことを示唆している。

全標本中に染色液由来による汚れや外部からの混入物によるゴミが認められているにもかかわらず, 73~90%の一致率がみられた。このことは, 染色標本の良否が

必ずしも鏡検結果に及ぼす決定的要因ではなく, むしろ菌を認識する鏡検技術があれば, 汚い染色標本でもある程度の鏡検成績を得る事ができることが示唆されている。

しかし不一致例をみると, ネパール群には偽陽性が, (+)に15例, (++)に2例, 偽陰性が(+++)に1例, イエメン群には偽陽性が(++)に1例, 偽陰性が(+)に3例, (+++)に2例, またフィリピン群には偽陽性が(±)に4例, (+)に1例, 偽陰性が(±)に1例, (+)に2例, (++)に1例みられている。(±)-(+)すなわち300視野中抗酸菌数1~2または100視野中抗酸菌数1~9に集中していることは, 恐らくスライド中のゴミの汚れを抗酸菌と誤認したり, ゴミによる鏡検妨害のために菌を見落としたためではないかと思われる。また, これら不一致例のうち, グレードの大きい陽性に対する不一致には, わずかな確率ではあるが, 現地からの結果報告に結果の転記ミスの可能性を含むことも考慮されなければならないであろう。

日常業務中の塗抹検査の効率を上げながら, より質の高い鏡検技術を保つためには, 標本中の染色結晶沈殿物等のゴミの除去は重要な要素と言える。

塗抹標本の各評価項目の質を上げ, ゴミの汚れによる鏡検の不一致率を下げるための具体的な改善策として, 1) 質の良いフクシン粉末の選択⁶⁾, 2) フクシン粉末のいいな溶解とフクシン染色液の濾過処理, 3) 3カ月以内に使い切る量のチール液の調製, またはフクシン原液と5%石炭酸液を別々に保存し⁷⁾, 使用時に必要量混合するなど, チール液の劣化を防ぐ工夫, 4) 患者の採痰前のうがい, 清浄な採痰容器やスライドの使用, 5) スライドに十分量の検体を塗抹する指導, 6) ホコリやゴミのたたない場所での塗抹乾燥, などがあげられよう。

今回は鏡検一致率の観点から, 染色標本の興味ある知見がいくつか得られたが, 用いた評価項目が評価に必ずしもすべて必要であるとは限らないことが示されている。仮説的に設定して用いた各評価項目の妥当性や重みづけについては, 今後の検討課題である。

結核対策に遅れをみせる途上国から, 技術的, 経済的に先進国的立場にあるわが国に期待される技術援助は増

える一方である。その中で特に技術移転の占める位置は高く重要である。しかしながら、わが国から現地へ行って技術の指導を行いうる要員の絶対数もその人々が現地にとどまって技術指導に従事できる時間も非常に限られている。

また一方では、技術指導者や物資などに恵まれない厳しい環境の中で働く途上国の技術者は、移転された技術の向上や維持に相当の努力と熱意が要求され、ともすると孤立感や挫折感のうちにこれらの努力や熱意が失われてしまう傾向にある。

この報告で示したような塗抹染色標本を通しての技術評価は、それほど費用や時間をかけることなく、途上国で働く検査技術者の技術向上に貢献できるのみならず、技術移転の成果や問題点、またその解決の糸口をより具体的に見出すことに役立つと思われる。さらに日本からの技術協力もこのような形でフォローアップまたはアフターケアを行うことによって、きめ細かい実り多いものとなると考える。

おわりに

本報で述べたように、現地からの塗抹染色標本だけを通してみても、かなりのことが明らかにされ、初歩的段階の塗抹検査の遠隔評価が可能であると思われる。

開発途上国では、検査室の環境、検査機器具、検査技術、検査室の制度および運営等に多くの問題を残しており、これらの要素が複雑に絡み合って検査成績の質に影響を与えている。検査精度の改善には、検査室側の努力によって可能な部分と検査室側の努力の範囲を越える部分があり、精度に限界が伴うことは否めない。したがって塗抹検査の評価や問題点を把握する際には、現地の背景を十分考慮して行うことが重要である。

今後開発途上国の塗抹検査の精度（質）を効率よく評価するために、評価項目や基準をさらに検討する必要があるだろう。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲下さいました結核研究所顧問戸井田一郎先生並びに国際協力部長石川信克先生に深く感謝いたします。

（本論文の要旨は、第117回日本結核病学会関東支部総会において報告した。）

文 献

- 1) WHO Expert Committee on Tuberculosis Ninth Report, 14-17, 1974.
- 2) 藤木明子：抗酸染色，検査と技術，vol. 17, 693-694, 1989.
- 3) Geckler, R. W. et al. : Microscopic and Bacteriological Comparison of Paired Sputa and Transtracheal Aspirates, J Clin Microbiol, 6, 396-399, 1977.
- 4) Technical Guide for Sputum Examination for Tuberculosis by Direct Microscopy, Bull IUAT, Supplement No. 2, 1978.
- 5) Meetings of the Scientific Committees Singapore, 1986, Bul IUAT, vol. 62, No. 1-2, 47-48, 1987.
- 6) 前田君子，越前谷寿与，沢瀬真紀子他：塩基性フクシン組成と染色性について，臨床検査，28（7），835-840, 1984.
- 7) 深見トシエ：抗酸菌染色，Medical Technology, vol. 12, No. 13, 1315-1321, 1984.