

第78回総会特別講演

結核菌検査の標準化と精度管理

阿部千代治

キーワード：結核の細菌学的検査，抗酸菌感染の早期の診断，液体培地，イムノクロマトグラフィー法，精度管理試験

はじめに

細菌学的検査は結核の正しい診断や適切な治療を行う上で重要であり，その善し悪しは国の結核対策にも影響を与える。

結核症の活動性分類は，保健所における患者登録や結核発生動向調査年報の基本分類として用いられている。この活動性分類について，「結核菌検査の結果を中心とし，感染危険性をより重視した活動性分類に改める必要がある」とした公衆衛生審議会意見書を受けて，厚生省（現厚生労働省）は1995年12月26日付通知で従来のX線所見を重視した活動性分類から菌所見を中心とした分類に改めた。すなわち臨床の面においてのみならず国の結核対策の上でも結核菌検査の重要性が見直された。

結核は空気感染で伝播することから，感染の拡大を防ぐために患者の早期発見が必須であり，結核菌検査の迅速化が強く求められている。米国では多剤耐性菌の出現とその広がりに対する危機感から，1993年¹⁾に疾病管理予防センター（CDC）は結核菌の分離および鑑別・同定の結果を10～14日以内，薬剤感受性試験の結果を30日以内に担当医に報告するように勧告した（Table 1）。

わが国ではここ十数年の間に新しい検査法の導入や検査法の変更が提案され，実際の検査にそぐわない点が出てきたことから20年前（1979年）に改訂された²⁾「結核菌検査指針」のさらなる改訂を望む意見が出てきた。この要望を受けて日本結核病学会では抗酸菌検査法検討委員会で改訂作業を行い，日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編として2000年5月に「新結核菌検査指針」が出版された³⁾。

ここでは個々の検査について考えてみたい。

1. 検査材料と検査の頻度

呼吸器材料として，喀痰，気管支洗浄液，肺胞洗浄液などが提出される。非呼吸器材料としては，胃液，血液，尿，便，体腔液，組織などが結核菌検査に出される。中でも結核の約85%は肺結核であることから，喀痰の検査頻度は高い。喀痰の採取と保存は次のように行う；①採取は早朝起床時に水道水で嗽後に行う，②治療中であれば早朝の薬剤投与前に採取する，③輸送に時間がかかる場合は水中で輸送する，④培養検査に用いる材料は凍結不可である，⑤検査材料は4℃に4～5日保存可能である。提出された喀痰が適切かどうかは検査の精度を保持する上で重要である（Table 2）。担当の医師は膿性痰⁴⁾であるかどうか直接確認し，不適切であれば再度提出してもらう。日常の外来診察中にすべての患者材料の品質確認が不可能であれば，検査室の報告を参考にする。幼児や高齢者など喀痰の排出が困難な場合に胃液の検査をする。

検査の回数を増やすことで陽性率が上昇するという利点はあるが，反面検査に要する労力の増加と検査試薬の負担増という問題が生じる。Blairらは患者材料の採取回数と抗酸菌培養陽性率との関係を調べ報告している⁵⁾。結核444例と*M. kansasii*または*M. avium* complex症42例を詳細に調べた結果，1回の培養検査で得られた陽性率は74%，2回で83%，3回で89%まで上昇することを報告した。この結果は，診断時に連続3日間喀痰を採取し塗抹と培養検査を行うべきであるとした外国およびわが国の結核菌検査指針を支持している。

連絡先：阿部千代治，〒203-0001 東京都東久留米市上の原1-4-28-402（E-mail: abe_chiyoji@yahoo.co.jp）
（Received 6 Jun. 2003）

Table 1 CDC recommendations: Turnaround time for laboratory examinations

- | |
|--|
| (1) Reports of acid-fast examination of specimens within 24 h of specimen collection |
| (2) Identification of <i>M. tuberculosis</i> within 10 to 14 days |
| (3) Reports of drug susceptibility tests within 15 to 30 days |

(Tenover et al. J Clin Microbiol 1993)

Table 2 Macroscopic grades of sputum purulence

Category	Macroscopic purulence
M1	Pure mucoid specimen with no suspicion of pus
M2	Predominantly mucoid specimen with a suspicion of pus
P1	Purulent, grade 1: pus amounting to less than one-third of the specimen
P2	Purulent, grade 2: pus amounting to one-third to two-thirds of the specimen
P3	Purulent, grade 3: pus amounting to more than two-thirds of the specimen

(Miller, Am Rev Respir Dis, 1963)

3回の塗抹検査が陰性の場合に塗抹および培養検査を行った日とは別の日に気管支鏡を用いた検査を行うことができる。また3回の塗抹および培養検査に加え、診断時に核酸増幅法を1回行うことができる。これらは保険診療で認められている。

2. 塗抹検査

塗抹検査は抗酸菌を検出する上で最も簡便で迅速な方法である。検出感度は分離培養法に比べ劣るが患者発見の重要な手段である。また排菌の有無やその程度を知ることが患者管理や適切な治療の上で大切である。

これまでわが国では喀痰の一部を採取し直接スライドガラスに塗抹する直接塗抹法が採用されてきた。しかし患者材料の中で菌が均一に分布しているわけではなく、採取部位により異なる結果が得られることが知られている。塗抹検査の精度を保つためには均等化・集菌材料を塗抹検査に供することが重要である。この処理法は米国の胸部学会 (ATS) でも勧めていることであり、「新結核菌検査指針」でも推奨している。ただし、外来診療で検査の結果を急ぐ場合は直接塗抹で検査するのはやむを得ないと思われるが、その場合も均等化・集菌材料から塗抹標本を作製し、結果の確認をする必要がある。三浦らは、973例の喀痰を用い直接塗抹法と均等化・集菌塗抹法を比較し、均等化・集菌法の有効性を証明した⁶⁾。すなわち直接法の塗抹陽性率は26.1%、均等化・集菌法のそれは38%であり、均等化・集菌法の陽性率が12%高かったこと、微量排菌例の115検体は均等化・集菌法でのみ陽性であったことを報告している。

抗酸菌の染色に Ziehl-Neelsen (Z-N) 法と蛍光法が用いられている。材料中に菌が少ない場合に Z-N 法では見落

とす場合がある。これに対し蛍光法では抗酸菌が暗い視野の中にオレンジ色に光って見えることから見落としが少なくて、Z-N 法では1,000倍拡大での観察に対し、蛍光法では200倍拡大で観察するので観察に要する時間も短縮できることから蛍光法の使用を強く勧める。ただし、蛍光法では糸屑などが光って見えることもあるので、菌数が僅かな材料 (数視野に1個位) は Z-N 法で確認する必要がある。この場合、蛍光染色標本を Z-N 法で染色することが可能であり、陽性箇所をマークしておけば確認が容易である。

蛍光染色法としてオーラミン O 染色あるいはオーラミン・ローダミン染色が一般に用いられている。オーラミン O 染色液は室温保存可能であるが、オーラミン・ローダミン染色液は4℃で保存する必要がある。Smithwick らは室温保存可能なアクリジンオレンジ染色液を開発し、オーラミン O 染色液より勝れていることを報告した⁷⁾。ごく最近わが国でも室温保存可能なアクリジンオレンジ染色液 (アクリステイン) が開発された。アクリステインは剥離防止剤がコートされた MAS (Matsunami Adhesive Silane) コートスライドと組み合わせて用いたとき非特異的蛍光も少なく暗い視野に鮮明なオレンジ色の蛍光として染色され、形態の観察も容易である⁸⁾。またアクリステインの感度はオーラミン・ローダミン法と同等であり、抗酸菌の日常検査に有用である (Table 3)。

これまで塗抹検査の結果をガフキー号数で表示していた。しかし、上述したように標本中の菌数は材料の採取部位や塗抹の厚薄により変動するので、細かく分けても意味はない。また多くの場合、材料中に数個または数十個の菌が固まって見られる。「新結核菌検査指針」では

ガフキー号数での表示をやめ、検出菌数を1+, 2+, 3+で表すことにした (Table 4)。このような簡便表示法は諸外国でも同様であり、ガフキー号数を日常検査に用いている国は調べた範囲ではない。問題は、結核定期外健康診断のガイドラインの中で感染危険度指数の算定⁹⁾にガフキー号数を用いていることであったが、この場合、1+はガフキー2号、2+はガフキー5号、3+はガフキー9号と読み換えて算定に用いることで対策の上で想定された問題は解消した (Table 4のNote参照)。これまでガフキー1号と表示していた例は±と記述し、同一の材料から塗抹標本を作り直すか、可能なら別の材料で再検査すべきである。

精度管理のために、陽性標本としてBCG、陰性標本として大腸菌を用いた標本を作製保存し、定期的に染色液などをチェックすべきである。また毎日の陽性率をグラフにプロットし、異常値が見られた場合は処理に用いた器具や緩衝液および油浸レンズをチェックすることも精度管理に有効である。

3. 培養検査

正しい方法で実施された抗酸菌の分離培養による検出

Table 3 Evaluation of a newly developed fluorochrome acid-fast staining method, acridine orange stain

Staining method	No. of specimens with the following culture results		
	+	−	Total
Acridine orange			
+	55	4	59
±	2	0	2
−	3	31	34
Auramine-rhodamine			
+	54	2	56
±	3	1	4
−	3	32	35
Ziehl-Neelsen			
+	46	1	47
±	6	2	8
−	8	32	40

成績は塗抹検査の成績より高く、抗酸菌症の診断や治療に重要な情報を与えてくれる。抗酸菌が分離されることで、その後の菌種の鑑別・同定や薬剤感受性試験の実施が可能になる。

前処理の目的は検査材料を消化・均等化し、含まれる雑菌を殺し、抗酸菌のみを選択的に培養することにある。そのためには検体に適した前処理法を選ぶことが大切である。非結核性抗酸菌、特に *Mycobacterium fortuitum* や *Mycobacterium abscessus* などの迅速発育菌は結核菌よりもアルカリに対する抵抗性が弱く、その前処理後のコロニー形成単位に減少が見られる。従って抗酸菌の分離にあたっては粘液溶解剤を加えることにより、水酸化ナトリウムの濃度をできるだけ低く抑えることが重要である。

粘液溶解作用を持つ *N*-acetyl-L-cystein (NALC) を用いた NALC-NaOH 法は、前処理剤による均等化と遠心による集菌を組み合わせ、アルカリの影響を極端に少なくした方法である¹⁰⁾。この種の前処理は液体培地へ接種する場合は必須であり、卵培地に接種した場合も検出率は高まる¹¹⁾。NALC-NaOH 法は諸外国でも用いられており、新結核菌検査指針で喀痰などの粘液検体の前処理法として勧めている。この NALC-NaOH 処理検体は培養のみならず塗抹検査および核酸増幅法に用いられる。わが国では NALC-NaOH 法以外に NALC-NaOH 法に他の方法をミックスした方法、例えばプロテアーゼ処理 + NALC-NaOH や NALC-NaOH + 膨潤剤 (遠心補助剤) が用いられている。

精度管理のために培養検査で汚染が見られた検査材料の割合を記録すべきである。培地汚染の許容範囲は2~5%の間である。汚染の割合が2%以下であれば過度に汚染除去を行ったことになり、含まれる抗酸菌までも殺菌してしまうことになる。一方汚染率が5%を超えた場合は前処理剤が弱いとか均等化が不完全かのどちらかである。常に汚染率をチェックする必要がある。

わが国では卵培地を用いてきたことから前述の検査所要時間の短縮に関する CDC 勧告を満足させることは不

Table 4 Report of acid-fast examination results

Report	Fluorochrome (200×)	Ziehl-Neelsen (1,000×)	Note (Gaffky's grade)
−	0/30 fields	0/300 fields	G0
±*	1-2/30 fields	1-2/300 fields	G1
1+	2-20/10 fields	1-9/100 fields	G2
2+	≥20/10 fields	≥10/100 fields	G5
3+	≥100/1 field	≥10/1 field	G9

±*: Any number of acid-fast bacilli less than 3/30 fields with fluorochrome stain (less than 3/300 fields with Ziehl-Neelsen stain) is doubtful; either reexamination the smear or make a new smear from the same or another specimen

Table 5 Detection systems of mycobacteria based on liquid medium

System	Detection of mycobacteria
BACTEC 460 TB	Radio active ^{14}C
BACTEC MGIT 960	Oxygen consumption
BacT/Alert	Colorimetric detection of CO_2
ESP Myco	Increase of CO_2 pressure
Septi-Chek AFB	Liquid/solid format
MB-Redox	Reduction of tetrazolium salt
Myco-Acid	Reduction of tetrazolium salt
KRD "Nichi B"	Reduction of tetrazolium salt

Table 6 Rates of recovery of mycobacteria from 587 sputum specimens in different media

Isolates [n]	No. (%) of isolates detected by:					
	MB-Redox	MGIT	Ogawa	MB-Redox plus Ogawa	MGIT plus Ogawa	MB-Redox plus MGIT
TB [133]	115 (86.5)	122 (91.7)	87 (65.4)	124 (93.2)	128 (96.2)	129 (97.0)
MOTT [70]	62 (88.6)	63 (90.0)	46 (65.7)	66 (94.3)	64 (91.4)	69 (98.6)
All [203]	177 (87.2)	185 (91.1)	133 (65.6)	190 (93.6)	192 (94.6)	198 (97.6)

Table 7 Mean turnaround time to detection of mycobacteria from the samples which were positive in all the method

Isolates [n]	Average no. of days (range) to detection		
	MB-Redox	MGIT	Ogawa
<i>M. tuberculosis</i> [80]	16.1 (3-42)	15.9 (3-44)	25.7 (7-62)
MOTT [42]	11.0 (4-50)	10.5 (2-53)	19.4 (4-70)

可能であり、液体培地の導入は必須である。わが国で液体培地の有用性は多くの研究者が認めている^{11)~15)}。Table 5に示したように数種の液体培養システムが開発されている。これらのシステムで用いられている基礎培地はほぼ同一 (Middlebrook 7H9) であり、違いは抗酸菌を検出する方法である。わが国では BACTEC 460TB と ESP Myco を除く 6 培地が市販されており、日常検査に使用可能である。5 施設による共同研究の成績を Table 6 に示した。分離菌の 85% 以上は液体培地で回収できたが、小川培地の陽性率は 65% と液体培養と比較し明らかに低い値であった¹⁵⁾。液体培地と卵培地を組み合わせることにより陽性率が更に上昇することも明らかになった。Table 7 に検出までに要した平均日数を示した。ここではすべての培地で陽性を示した検体について比較した。結核菌について見ると液体培地を基礎とした 2 システムの平均値は 16 日であり、CDC の勧告をほぼ満足することが分かった。これに対し、小川培地による検出までの平均日数は 26 日であり、卵培地を用いた場合 CDC の勧告を満足する成績を得ることはできなかった。液体培地の有効性は高い検出率と迅速性のみならず、多くの菌種の増殖を支持すること、精度管理の容易さ、

Table 8 Advantage and disadvantage of broth-based media

- (1) Supports growth better, more positive culture
- (2) Much faster turnaround time
- (3) More species grow
- (4) Easy to use
- (5) Better quality control
- (6) Mixed growth can not be detected

自動化培養システムによる検査技師の労力の軽減があげられる (Table 8)。不利な点は複数の抗酸菌が含まれている材料では一方の菌を見落としすることがある。

「新結核菌検査指針」では、初回分離に液体培地と卵培地を 1 本ずつ用いることを勧めている。検査室の受容力や液体培地の価格の問題などがあり、3 回の培養に液体培地と卵培地を 1 本ずつ用いることが不可能な病院も出てこよう。液体培地の導入については医師と検査技師の間で十分検討する必要がある。例えば、① 3 回とも両者、② 2 回を両者 + 1 回を卵培地、③ 1 回を両者 + 2 回を卵培地、④ 2 回液体培地 + 1 回卵培地、など検討する。

病院によっては卵培地での培養をやめ、液体培地のみを使用しているところもあると聞いている。しかし液体

培地のみでの培養では、菌数が測定できないために非結核性抗酸菌症の診断に不都合が生じること、また結核菌と非結核性抗酸菌の両者が同時に検出される場合があり、結核菌に対する薬剤感受性を誤って判定する場合があることなど問題が残る。

これまで入院患者の退院の時期は塗抹検査と小川培地による培養検査の結果により判定されており、問題が生じていないことから治療中の患者の培養検査に液体培地を用いる意義は低い¹⁶⁾。治療中の患者の定期培養検査は小川培地のみで良い。ただし、塗抹陽性が続いているにもかかわらず、小川培地で結核菌が分離できない場合は液体培地による培養を加える。それは抗結核薬に曝された菌や耐性菌の中には液体培地で分離できても卵培地で発育しない菌が存在するからである。

培地メーカーでは製造ロットごとに発育試験を行い精度を管理していると思われる。2001年に日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会(富岡治明委員長)では市販されている5種の卵培地の発育試験を行った¹⁷⁾。標準菌株を用いた試験では、発育日数、集落の大きさ、発育集落数の点からみて、各培地間の抗酸菌発育支持能には特に大きな差は認められなかったことから、いずれの培地を使用しても遜色ない培養結果が得られるものと思われる。卵の成分に季節変動があることが知られており、使用者側でも定期的に標準菌株を用いる発育試験を行う必要がある。

4. 分離抗酸菌の鑑別・同定

結核菌と非結核性抗酸菌の早期の鑑別は適切な患者管理と治療の上で重要である。わが国および諸外国で用いられている鑑別法をTable 9に示した。この目的のために今野により開発されたナイアシン試験¹⁸⁾やPNB(*p*-nitrobenzoic acid)培地の発育試験^{19) 20)}が用いられてきたが、それらの感度と特異性は十分でなかった。近年分子遺伝学が進歩し、抗酸菌菌種の鑑別・同定に核酸の相同性や核酸増幅法を利用した検査が日常用いられるようになった。リボソームRNAを標的としたアキュプローブ結核菌群とアキュプローブ *M. avium* complex^{21) ~ 24)} および江崎らにより開発されたDDHマイコバクテリ

ア²⁵⁾はわが国の多くの検査室で日常検査に用いている。遺伝子を用いた検査は感度や特異性の点で優れた方法であるが、同定上有用な培養・生化学的性状検査と併せて行い、それらの結果を総合的に判断することが重要である。欧米諸国ではNAP(*p*-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropionophenone)培地発育試験^{19) 26)}やミコール酸や脂肪酸のクロマトグラフィー法²⁷⁾が用いられてきた。NAP試験は広く用いられているが特異性は十分でない。またクロマトグラフィー法は設備の問題もあり、使用が可能な施設は限られる。

「新結核菌検査指針」では、核酸の相同性を利用したキットの使用を勧めている。すなわちアキュプローブ結核菌群および *M. avium* complex キットの感度と特異性は100%であることから、最初にこれら2種で順次鑑別を行い、陰性例についてはDDHマイコバクテリアキットと培養および生化学的試験により同定する。この場合も発育日数やコロニー形態および着色などを参考にするのはもちろんである。

最近、イムノクロマトグラフィーによる結核菌と非結核性抗酸菌の迅速鑑別キットが開発された^{28) 29)}。ここでは抗MPB 64モノクローナル抗体を用いる鑑別キット“キャピリア TB”を紹介する。MPB64抗原は結核菌群に属する菌により分泌される抗原であり、非結核性抗酸菌からは産生されない³⁰⁾。キャピリア TBは結核菌群特異抗原であるMPB 64タンパクをイムノクロマトグラフィーにより迅速に検出するキットである。液体培養で陽性を示した培養の0.1 mlをカセットのサンプルウエルに添加し室温に10～15分静置する。もちろん固形培地培養菌にも応用できる。MPB64陽性サンプルではtestとcontrolの両ゾーンに赤色のバンドが見られる。MGITおよびMB Redox液体培養中の結核菌群の鑑別に用いた成績をTable 10に示した²⁹⁾。キャピリア TB陽性例はすべてアキュプローブ結核菌群陽性であった。MOTT 57例はすべてキャピリア TB陰性であった。また抗酸菌陰性例について、培養4週目の材料もすべてキャピリア TB陰性であった。

キャピリア TBを評価した研究結果が学会などで報告されているが、これまでに偽陰性の結果は報告されな

Table 9 Simple differentiation between TB and MOTT bacilli

- (1) Niacin accumulation test
- (2) BACTEC NAP test
- (3) Growth on PNB medium
- (4) DNA probe test (ribosomal RNA)
- (5) DDH Mycobacteria (whole chromosomal DNA)
- (6) Chromatography analysis (fatty acids or mycolic acids)
- (7) Immunochromatography analysis using anti-MPB64 antibody

Table 10 Rapid confirmation of the *M. tuberculosis* complex in liquid cultures by Capilia TB

Isolates [n]	Capilia TB	
	Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i> [50]	50 (100%)	0
<i>M. avium</i> complex [34]	0	34 (100%)
<i>M. kansasii</i> [5]	0	5 (100%)
Other MOTT [18]	0	18 (100%)
Mixed culture [1]*	1 (100%)	0
Total [108]	51	57

Sputum specimens were cultured with the MB Redox and MGIT systems. Samples from positive cultures were assayed by Capilia TB.

*A mixed culture with the *M. tuberculosis* complex and *M. kansasii*

Table 11 Drug concentrations ($\mu\text{g/ml}$) used for susceptibility testing

Drug	L-J	Ogawa	7H10	MGIT 960	460 TB
Isoniazid-low	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
Isoniazid-high	1.0	1.0	1.0	0.4	0.4
Rifampin	40	40	1.0	1.0	2.0
Streptomycin	4.0	10	2.0	1.0	2.0
Ethambutol	2.0	2.5	5.0	5.0	2.5
Pyrazinamide				100	100

かった^{29) 31) ~ 33)}。ごく最近、例数はほんの僅かであるが偽陰性例が見つかった。複十字病院の成績では結核菌分離株の1%以下(0.8%)で僅かではあるが偽陰性を示す菌株が存在することが分かった³⁴⁾。偽陰性株はMPB 64遺伝子に変異を持っており、完全なMPB 64タンパクが作られていないことも明らかになった。今後これらも拾えるキットの開発が望まれる。

5. 薬剤感受性試験

結核菌の薬剤耐性は、結核菌ゲノム遺伝子に起こった突然変異により発生する。不規則な薬剤の供給、不適切な処方、治療脱落などによる結果として起こる単剤治療は感受性菌の発育は抑えることができて耐性菌の増殖を許すことになる。この現象を以前は“獲得耐性”と呼んでいたが今日では“既治療耐性”と呼ぶことにしている。薬剤耐性菌で感染を受けた場合は最初から薬剤耐性の病気となる。この現象を“初回耐性”と呼んでいる。

1994年に世界保健機関(WHO)と国際結核肺疾患予防連合(IUATLD)は世界的規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを開始した。薬剤耐性結核は世界の至る所で起こっていることが分かった。エストニア、ラトビア、ロシアのイワノボ州とトムスク州、中国の河南省、イランでは初回治療例のMDR-TB[少なくともイソニアジド(INH)とリファンピシン(RFP)の両者に耐性を獲得している多剤耐性結核]は大きな問題である^{35) 36)}。

わが国の結核療法研究協議会が5年ごとに行っている

「入院時薬剤耐性に関する研究」の1997年の報告によると³⁷⁾、治療歴のない患者由来の結核菌の主要4薬剤[INH, RFP, ストレプトマイシン(SM), エタンブトール(EB)]のいずれか1剤に耐性の割合は10.3%であるが、既治療例では42.4%と約4倍耐性頻度は上昇している。未治療例では、耐性例の75%は1剤に対する耐性であるのに対し、既治療例では60%以上が2剤以上の薬剤に耐性を獲得していた。これらのことは、薬剤感受性試験は結核の適切な治療に重要であることを示している。

これまで日本で行われていた薬剤感受性試験について、結核専門医の間に検討を望む意見があった。また試験濃度や判定方法は諸外国で行われている方法と大きな差が見られる。そこで日本結核病学会では、薬剤耐性検査検討委員会を1996年に設置し検討を重ねた。新しい検査法が1997年6月に委員会より提案された³⁸⁾。提案された試験法は1%小川培地を用いる比率法である(Table 11)。この委員会提案、その後の公衆衛生審議会答申を受けて結核の医療基準の一部が改正された。約3年が経過し、今日ではほとんどの施設で新しい検査法で試験を行っている。

世界各国で採用している試験方法は雑多で、用いる培地、試験濃度、判定方法などまちまちである。したがってこれらで得られた成績を相互に比較することは不可能である。前述のWHO/IUATLDプロジェクトでは、薬剤耐性結核のサーベイランスを開始するにあたり、世界の

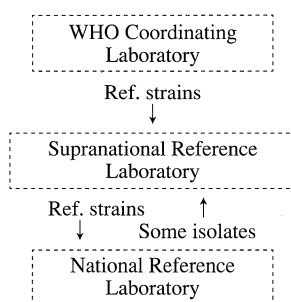


Fig. Standardization and quality assurance of susceptibility testing (WHO/IUATLD)

Table 12 Results of five rounds of proficiency testing in the SRL network, 1994–1998

Variable	INH	RFP	EB	SM	Overall	Cumulative results of 5 rounds
Sensitivity						
1994	99	94	66	88	89	
1995	94	99	75	92	93	
1996	97	98	90	96	96	
1997	100	100	92	91	97	
1998	100	100	95	97	98	95
Specificity						
1994	100	96	98	100	98	
1995	86	99	84	82	86	
1996	100	100	96	91	96	
1997	100	99	91	95	95	
1998	99	100	98	89	96	95
Efficiency						
1994	99	96	91	92	95	
1995	93	99	81	90	91	
1996	98	99	94	93	96	
1997	100	99	91	93	96	
1998	100	100	97	92	97	95
Reproducibility						
1994	98	94	93	89	94	
1995	98	99	90	72	96	
1996	98	98	99	92	97	
1997	100	95	92	91	98	
1998	99	98	97	95	97	96

Sensitivity: Ability to detect true resistance; Specificity: Ability to detect true susceptibility; Efficiency: Ratio between the number of correct results; Reproducibility: Intra-laboratory agreement between duplicate cultures

(Laszlo et al., Int J Tuberc Lung Dis, 2002)

異なる検査室で行われている感受性試験の精度を調べることからプロジェクトをスタートさせた³⁶⁾。WHO/IUATLDはWHOのそれぞれの地域内に2～3の研究所をSupranational Reference Laboratory (SRL)として選び、WHO/IUATLDのコーディネーターから試験菌株をSRLに送付し、SRLの検査精度をチェックした。この種の研究を繰り返し、一定のレベルにあることを確認した。次のステップとして、プロジェクト参加国のレファレンスラボラトリーの精度を確保するためにSRLが協力する

という形で仕事が進められた (Fig.)。1994年と1998年の間にSRLネットワーク内で5回の精度管理研究が行われた (Table 12)。薬剤感受性試験はINH, RFP, SM, EBの4薬剤で行われた。5回の研究を通して全体の感度 (真の耐性菌の検出能) は95%であり、1994年の89%から1998年の98%の範囲にあった^{36) 39)}。全体の特異性 (真の感受性菌の検出能) は95%、全体の一致率 (正しい結果の数を総数で割った数値) は95%、再現性 (2組の結核菌の一致率) は96%であった。INHとRFPについて

はプロジェクトの最初から一貫して高感度であり、1998年は両者とも100%であった。SMとEBの感度は、初期には低かったがSRL内で討議、試験法の見直しが行われ改善された。INH, RFP, EBの特異性は一貫して高く、1998年のこれら3剤に対する特異性は99, 100, 98%であった。しかし、SMに対する特異性は低く、1998年は89%であった。一致率および再現性は研究期間を通じて一定していた。ちなみに、2002年は23のSRLでネットワークを形成しており、試験に用いている培地は、L-J卵培地による比率法が16, Middlebrook寒天培地による比率法が2, BACTEC 460TBが3, 耐性比率法と絶対濃度法が各1施設であり、70%の施設はL-J培地で感受性試験を行っている。検査法による差は認められなかった。2002年のIUATLD年次会議の際にモンテリオールで開催されたSRLネットワーク会議で、INHとRFPの2薬剤の感度、特異性、再現性を95%以上に保つべきとする目標が決議された。

日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会(富岡治明委員長)では、市販培地の精度管理研究を開始した。分離培養培地の発育試験¹⁷⁾に引き続き、WHO/IUATLDの研究で使用した菌株を用い薬剤感受性試験培地の精度管理研究を行った。その結果は委員会報告として当誌“結核”に掲載される。この研究は、最終的に個々の検査室の精度管理に向けられるものと考えられる。

米国のNCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) は1995年に結核菌の薬剤感受性試験について次のような勧告を出した⁴⁰⁾。卵培地は成分が複雑で調製が難しく、標準化が困難であることから薬剤感受性試験にはMiddlebrookの寒天培地または液体培地の使用を勧めるという勧告であった。MGIT培地と小川培地の比較試験はわが国でも行われており、相関性が認められることが報告されている^{41) 42)}。所要時間を短縮できるという大きなメリットもあることから、今後液体培地による薬剤感受性試験について結核菌検査指針に含める必要がある。

6. 諸外国で用いている検査

結核菌の検査についてアンケート調査をした。回答が得られた国はオーストラリア、中国、台湾、フィリピン、ヨーロッパ(ドイツ、フランス、ベルギー、イタリア、オランダ、スイスなど)であった。塗抹試験について、国によりあるいは検査室のレベルにより均等化・集菌材料で行っている国と直接塗抹のところがある。染色はZ-N法と蛍光法の両者を併用している。検査材料の前処理はNALC-NaOH法かNaOH法を用いており、わが国で用いているプロテアーゼとNALC-NaOHまたはNALC-NaOHと遠心補助剤のような組み合わせで処理し

ている検査室は見られなかった。培養検査は、ほとんどの国が液体培地と卵培地または寒天培地の組み合わせで行っていた。感受性試験は検査室により液体培地、寒天培地、卵培地を用いていた。わが国との大きな違いは核酸増幅法の使用状況である。ヨーロッパ諸国においても、ほんの限られた例にしか使用されておらず、また使用している場合も大部分の検査室は市販のキットではなく自前の核酸増幅法で検査しているのが現状である。

回答が得られたすべての国で結核菌検査の精度管理試験を行っている。塗抹試験は週1回または染色液を調製の度に精度管理スライドを用いている。分離培養のための精度管理試験は定期的に行っている。また薬剤感受性試験は、回答の得られた国では月1回精度管理試験を行っていることが分かった。わが国で結核菌検査の精度管理試験についての調査報告がないので現状は分からない。内部で試験を行っているのかもしれないが、組織的な外部評価はない。

おわりに

細菌学的検査で100%の精度を求めるのは無理である。それでも検査技師は100%に近づける努力をしている。SRL会議の結論にも見るように、95%の精度を得ることを目標としている。それゆえ、担当医師は次のような場合再検査を依頼すべきである；①胸部レ線像から推定される結果と異なる検査結果が得られた場合、②感受性試験の成績は耐性、しかし患者に有効、③感受性試験の成績は感受性、しかし3カ月以上排菌が止まらない(減少しない)。そのためには医師と検査技師との連携は重要であり、医師は時間の許すときに検査室に立ち寄り検査技師と話し合うことが大切である。

謝 辞

特別講演の機会を与えてくださいました第78回日本結核病学会総会長松島敏春先生、座長の労を取って下さいました東市郎先生に深謝申し上げます。WHO/IUATLD薬剤耐性結核のサーベイランスプロジェクト：M.A. Aziz (WHO), A. Laszlo (IUATLD/Laboratory Center, Ottawa), A. van Deun (Institute of Tropical Medicine, Belgium)；日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：斎藤肇委員長(1995～1997)、阿部千代治委員長(1997～2001)、富岡治明委員長(2001～2003)；液体培地の評価：螺良英郎、山中正彰(結核予防会大阪府支部大阪病院)、青柳昭雄、大角光彦、武田政雄(国立療養所東埼玉病院)、倉島篤行(国立療養所東京病院)、奥住捷子、米山彰子(東京大学病院)、平野和重、和田雅子(結核予防会結核研究所)；結核療法研究協議会：青柳昭雄、青木正和(結核予防会)、森 亨(結核予防会結核研究所)、

和田雅子，共同研究参加78施設；イムノクロマトグラフィによる結核菌の鑑別：富山哲雄（富山研究所），難波靖治（タウンズ），吉原博明（日本ベクトン・ディッキンソン），平野和重，青野昭男（結核予防会複十字病院）；アンケート調査：吉原博明；結核予防会結核研究所：高橋光良，鹿住祐子，深澤豊，浜崎園望，各先生方との共同研究で得られた成績を紹介させていただきました。またこれらの仕事は日米医学結核・ハンセン病部会に支えていただきました。部会長：徳永徹（国立予防衛生研究所），東市郎（北海道大学免疫科学研究所），斎藤肇（島根医科大学），露口泉夫（大阪府立羽曳野病院），山田毅（長崎大学歯学部），光山正雄（京都大学大学院医学研究科）の各先生方に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993; 31: 767-770.
- 2) 結核菌検査指針編集委員会：厚生省監修「結核菌検査指針」。日本公衆衛生協会，東京，1979.
- 3) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：「新結核菌検査指針」。結核予防会，東京，2000.
- 4) Miller DL.: A study of techniques for the examination of sputum in a field survey of chronic bronchitis. Am Rev Respir Dis. 1963; 88: 473-483.
- 5) Blair EB, Brown GL, Tull AH: Computer files and analyses of laboratory data from tuberculosis patients. II. Analyses of six year's data on sputum specimens. Am Rev Respir Dis. 1976; 113: 427-432.
- 6) 三浦隆雄，長谷川直樹，鈴木紀久雄，他：MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 抗酸菌検査システムの検出率と迅速性の評価。日本臨床微生物学誌. 2000; 10: 125-130.
- 7) Smithwick RW, Bigbie MR, Ferguson RB, et al.: Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2763-2764.
- 8) 平野和重，浜崎園望，青野昭男，他：アクリジンオレンジ抗酸菌蛍光染色液，アクリスチンの評価。臨床と微生物. 2003; 30: 201-205.
- 9) 厚生省保健医療局結核・感染症対策室：結核定期外健康診断ガイドラインとその解説。結核予防会，東京，1993.
- 10) Kubica GP, Dye E, Cohn ML, et al.: Sputum digestion and decontamination with *N*-acetyl-*L*-cystein-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1964; 87: 775-779.
- 11) 阿部千代治：酸素反応性蛍光センサーを用いた新しい抗酸菌迅速培養システムの検討。感染症誌. 1996; 70: 360-365.
- 12) 斎藤 肇，螺良英郎，山中正彰，他：MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) の評価に関する10施設での共同研究。臨床と微生物. 1997; 24: 897-903.
- 13) 斉藤 宏，山根誠久，金田光稔，他：抗酸菌の培養検出法の比較検討—全自動抗酸菌培養システム，MB/BacTを中心として。JJCLA. 1998; 23: 783-787.
- 14) 青野昭男，桑原龍児，光田昌江：MGIT抗酸菌システムと従来法との比較。日本臨床微生物学誌. 1998; 8: 91-95.
- 15) 阿部千代治，平野和重，和田雅子，他：酸化還元インジケーターを用いた抗酸菌迅速培養システム MB Redoxの評価。結核. 1999; 74: 707-713.
- 16) 日本結核病学会治療・社会保険・抗酸菌検査法検討合同委員会：新しい結核菌検査法の臨床での利用について。結核. 2000; 75: 681-684.
- 17) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：抗酸菌検査の精度管理 (1) 市販培地の発育試験成績について。結核. 2003; 78: 61-64.
- 18) Konno K: New chemical method to differentiate human type tubercle bacilli from other mycobacteria. Science. 1956; 124: 985.
- 19) Tsukamura M, Tsukamura S: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by *p*-nitrobenzoic acid susceptibility. Tubercle. 1964; 45: 64-65.
- 20) Rastogi N, Goh KS, David HL: Selective inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by *p*-nitro- α -acetyl-amino- β -hydroxypropionophenone (NAP) and *p*-nitrobenzoic acid (PNB) used in 7H11 agar medium. Res Microbiol. 1989; 140: 419-423.
- 21) 阿部千代治，鹿住祐子，深澤 豊，他：ACCUPROBEによる抗酸菌の同定。臨床と微生物. 1991; 18: 557-561.
- 22) Gen-Probe Inc: Accuprobe mycobacterium culture confirmation tests. Gen-Probe Inc., San Diego, 1990.
- 23) Goto M, Oka S, Okuzumi K, et al.: Evaluation of acridinium ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2473-2476.
- 24) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al.: Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes. J Clin Microbiol. 1989; 27: 994-997.
- 25) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al.: Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol. 1991; 29: 1596-1603.
- 26) Laszlo A, Siddiqi E: Evaluation of a rapid radiometric differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with *p*-nitro- α -acetyl-amino- β -hydroxypropionophenone. J Clin Microbiol. 1984; 19: 694-698.
- 27) Tisdall PA, De Young DR, Roberts GD, et al.: Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography: a 10-month follow-up study. J Clin Microbiol. 1982; 16: 400-402.
- 28) Tomiyama T, Matsuo K, Abe C: Rapid identification of

- Mycobacterium tuberculosis* by an immunochromatography using anti-MPB64 monoclonal antibodies. Int J Tuberc Lung Dis. 1997 ; 1 (Suppl.) : S59.
- 29) Abe C, Hirano K, Tomiyama T : Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1999 ; 37 : 3693-3697.
- 30) Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, et al. : Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun. 1986 ; 52 : 293-302.
- 31) 尾西裕美, 松浦 徹, 吉友和大, 他 : 抗 MPB64 抗体を用いたイムノクロマトグラフィによる結核菌の迅速同定法の検討. 日本臨床微生物学誌. 1999 ; 9 : 228-233.
- 32) 叶 一乃, 飯草正実, 森三樹雄 : イムノクロマトグラフィによる結核菌群同定キット Capilia TB の評価. 臨床と微生物. 2001 ; 28 : 297-301.
- 33) Hasegawa N, Miura T, Ishii K, et al. : New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex : a multicenter study. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 908-912.
- 34) 平野和重, 青野昭男, 浜崎園望, 他 : キャピリア TB 陰性結核菌と MPB64 遺伝子の変異. 結核. 2003 ; 78 : 275.
- 35) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance : Anti-tuberculosis drug resistance in the world. WHO/TB97. 229. WHO, Geneva, Switzerland, 1998.
- 36) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance : Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No.2. Prevalence and trend. WHO/CDS/TB2000. 278. WHO, Geneva, Switzerland, 2000.
- 37) Abe C, Hirano K, Wada M, et al. : Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. Int J Tuberc Lung Dis. 2001 ; 5 : 46-52.
- 38) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会 : 結核菌の薬剤感受性試験, 特に試験濃度変化と比率法導入への提案. 結核. 1997 ; 72 : 597-598.
- 39) Laszlo A, Rahman M, Espinal M, et al. : Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network : five rounds of proficiency testing, 1994-1998. Int J Tuberc Lung Dis. 2002 ; 6 : 748-756.
- 40) Kiehn TE, Cynamon MH, Inderlied CB, et al. : Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* : tentative standard. NCCLS 1995 ; M24-T 15 : 1-31.
- 41) 鈴木克洋, 露口一成, 松本久子, 他 : Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による結核菌の迅速薬剤感受性検査. 結核. 1997 ; 72 : 187-192.
- 42) 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重 : BACTEC MGIT 960 システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験 : 固形培地を用いる比率法との比較. 結核. 2001 ; 76 : 657-662.

The 78th Annual Meeting Special Lecture

STANDARDIZATION OF LABORATORY TESTS FOR TUBERCULOSIS
AND THEIR PROFICIENCY TESTING

Chiyoji ABE

Abstract Explanations of proper collection procedures are imperative for accurate laboratory analysis. The quality of specimens collected and the proper transport of those specimens to the laboratory are critical to successful isolation of etiological agents.

Most mycobacteria grow at a relatively slow rate. Therefore, the acid-fast smear plays an important role in the early diagnosis of mycobacterial infection. There are several methods of determining the acid-fast nature of an organism. In the carbolfuchsin procedures (Ziehl-Neelsen, Kinyoun), acid-fast organisms appear red, and in the fluorochrome procedures (auramine O, auramine-rhodamine, acridine orange), the acid-fast organisms fluoresce yellow to orange. Fluorochrome-stained slides may be directly restained with any of the carbolfuchsin staining procedures. This may be done to confirm a positive fluorochrome slide and to study organism morphology.

In the last 10 years, there were many advances in the culture examinations of mycobacteria. The newly developed Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), BacT/Alert, ESP Myco, MB Redox and KRD "Nichi B", biphasic Septi-Chek AFB and Myco-Acid, and radiometric BACTEC 460TB systems based on liquid media, proved to be significantly better than the egg-based solid media for the isolation of mycobacteria from clinical specimens. In addition to liquid-based medium, agar (Middlebrook 7H10 or 7H11) - or egg (Ogawa or Löwenstein-Jensen)-based media should be used in the primary isolation of mycobacteria.

To identify mycobacteria, conventional biochemical tests are traditionally used. Key test can be used to identify species, or further preliminary grouping may be used. Other approaches to identifying some species of mycobacteria are available. They include niacin accumulation, *p*-nitrobenzoic acid and *p*-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropionophenone tests for discrimination of the *Mycobacterium tuberculosis* complex from mycobacteria other than *M. tuberculosis* (MOTT); DNA probe methods for identification or confirmation of the *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex, *M. kansasii*, and *M. gordonae*; DNA-DNA hybridization

method for identification of 22 *Mycobacterium* species; and gas-liquid chromatography or high performance liquid chromatography analyses for recognizing the patterns of the mycobacterial cell wall fatty acids or mycolic acids. The advantages of the last four methods are that they are capable of providing definitive identification within 2 to 5 h after adequate growth. Capilia TB is the newly developed immunochromatographic assay for rapid discrimination between the *M. tuberculosis* complex and MOTT bacilli. The kit can be easily used for rapid identification of the *M. tuberculosis* complex in combination with the culture systems based on liquid media. In addition, Capilia TB could correctly detect the *M. tuberculosis* complex from mixed cultures with the *M. tuberculosis* complex and MOTT bacilli.

The WHO/IUATLD supranational reference laboratory (SRL) network was created in 1994, to ascertain the accuracy of the susceptibility test methods used in different laboratories across the world, and to allow comparability of the surveillance data gathered in countries participating in the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Today, the network has evolved and 23 SRLs actively participate. Results of five rounds of proficiency testing in the SRL network suggest that performance of the network has improved substantially through the years. This progress has been particularly evident for streptomycin and ethambutol sensitivity, which was very low in the first rounds of proficiency testing. In 1998 sensitivity for these two drugs was higher than 95%. For isoniazid and rifampin, sensitivity has been consistently high since the beginning of the Global Project. This indeed reflects the enhanced efforts made by the SRLs to improve their individual performance.

Key words: Laboratory tests for tuberculosis, early diagnosis of mycobacterial infection, liquid medium, immunochromatographic assay, proficiency testing

Correspondence to : Chiyoji Abe, 1-4-28-402, Uenohara, Higashikurume-shi, Tokyo 203-0001 Japan.
(E-mail : abe_chiyoji@yahoo.co.jp)