

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

御手洗 聡

※日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会

要旨：〔目的〕当委員会では抗酸菌検査の精度管理に関する研究を2001年度より実施しており、2003年度は検査センターを対象として薬剤感受性試験の外部精度アセスメントを実施した。〔方法〕月平均20件以上の薬剤感受性試験を実施している23施設について耐性既知の結核菌10組20株を送付し、各施設が通常実施する方法で薬剤感受性試験を行い、結果を標準判定と比較した。〔結果〕INHでは感度の平均が95% (29～100)、特異度の平均が100%、一致率の平均が97% (50～100)であった。またRFPでは感度の平均が95% (63～100)、特異度の平均が99% (67～100)、一致率の平均が97% (70～100)であった。SMでは感度の平均が66% (33～100)、特異度の平均が94% (64～100)、EBでは感度の平均が96% (33～100)、特異度の平均が74% (57～86)であった。〔考察〕今回の参加施設ではINHおよびRFPについて平均としてWHO/IUATLDの基準を満たしており、良好な結果であったが、施設によって結果にばらつきがみられた。外部精度アセスメントの繰返しと改善活動が重要である。
キーワード：結核、薬剤感受性試験、精度管理、検査センター、外部精度アセスメント

はじめに

現在の医療では Evidence based medicine が基本概念であり、結核の領域でも当然適応されることは論をまたない。結核の治療は基本的に「定型化された標準療法」であり、途上国では基本的に抗酸菌塗抹検査（および培養検査）のみで経過を観察するにすぎず、サーベイランス以外の目的で個々の症例に薬剤感受性試験を実施して evidence based のケアをすることはほとんどない。しかしながら、治療成功をより確実にするためには、日本結核病学会治療委員会の標準療法見直しの前文にもあるように「感受性のある薬剤を3剤以上」投与することがきわめて重要である。ここで薬剤感受性試験の信頼性が重要な問題となるが、日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会による市販薬剤感受性試験培地の精度に関する研究等の例を除けば、これまで日本では一般施設に対する結核菌の薬剤感受性試験に関する外部精度アセスメントは実施されていなかった。治療の信頼性を増すため、薬剤

感受性試験の精度を確保することが重要となっている。

世界的にみても、結核菌の薬剤感受性試験の精度管理については未だ確立した方法はない。世界保健機関 (World Health Organization: WHO) と国際結核肺疾患予防連合 (International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases: IUATLD) は1994年から世界の薬剤耐性結核サーベイランスを実施しているが、これに先立って世界中の抗酸菌検査施設から20数カ所を Supra-National Reference Laboratory (SRL) として指定し、WHO/IUATLD のセンターから菌株を配付し、各施設の薬剤感受性試験の結果を比較して精度を評価している¹⁾²⁾。この菌株は地域の精度管理にも用いられ、大多数の SRL での一致した結果をもって各株の耐性あるいは感受性の標準判定としている。この方法に問題がないわけではないが、現在実施し得る最も有効な方法であると思われる。

日本における結核菌の薬剤感受性試験は、その多くが衛生検査所（検査センター）にて実施されている³⁾。これらの施設に対して外部精度アセスメントを実施すること

は、多くの患者の試験結果の信頼性を高めるのに有効と思われる。今回、SRLで実施していると同様の方法を用い、薬剤感受性試験の外部精度アセスメントを通じて検査精度を向上させることを目的として研究を実施した。

対象と方法

(1) 参加施設

月平均20検体以上の結核菌薬剤感受性試験を実施している検査センターを対象とした。基本的には参加は任意であり、日本結核病学会理事長および抗酸菌検査法検討委員会委員長の連名による本調査への参加依頼を送付し、諾とした施設のみに試験用の検体を送付した。最終的に24施設がパネルテストに参加した。

(2) 被験結核菌株

被験結核菌株を2%小川培地上に発育した状態で送付した。今回送付した菌株はSRL Network (SRLN; 研究実施時全世界に20施設)で1996年に実施された薬剤感受性試験外部精度アセスメントプログラムに使用された9菌株に標準菌であるH37Rvを加えた10株であり、再現性の評価のためそれぞれ2本ずつ計20株とした。これらの株については、既にSRLNにて耐性/感受性の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。それぞれの施設に配付された検体には、一検体ずつ無作為に異なる番号が割り振られており、すべての結果はこの番号によって分類した。当然ながら菌株の中には多剤耐性を含む薬剤耐性株が含まれているため、取り扱いについては十分なる注意を喚起した。

(3) 試験薬剤

試験薬剤についてはSRLNの方式にならってIsoniazid (INH), Rifampicin (RFP), Streptomycin (SM) および Ethambutol (EB) の主要4薬剤とした。

(4) 薬剤感受性試験方法

基本的に各施設で日常実施している方法で感受性試験を行うこととした。菌株と同時に調査用紙を配付し、接種菌の調整法について調査した。それぞれの菌株の薬剤感受性試験の結果は2000年の結核菌検査指針に基づき1%をcritical proportionとして「耐性」あるいは「感受性」のいずれかとして判定した。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。

(5) 結果の解析

WHO/IUATLDの外部精度アセスメントにて70%以上のSRLで一致した成績をその菌の示す耐性・感受性の標準判定とした。今回使用した菌株の中にペアの一方の株でSMに関してSRLNでの一致が70%を下回るものがあったが、もう一方では70%以上であったことからそのまま評価した。各施設から送付された結果については

「感度」「特異度」「耐性的中率」「感受性的中率」「一致率」および「再現性」を計算し評価した。感度とは、SRLNで耐性と判定した株を正しく耐性と判定する割合であり、特異度とは同様にSRLNで感受性とした株を正しく感受性と判定する割合である。耐性的中率とはある菌株を「耐性」と判定した時、その判定が正解である確率であり、同様に感受性的中率とはある菌株を「感受性」とした時の正解率である。一致率はSRLNとの判定の一致の割合であり、再現性は各菌株ペアにおける判定結果の一致率を示す。解析結果についてはそれぞれの施設に通知するが、当該施設以外の施設名は匿名化し、個々の施設が特定されないよう配慮した。

結 果

薬剤感受性試験パネルテストを実施した24施設のうち23施設について、所定の書式に従った検査結果を得た。なお、送付した菌株のうち1施設で1株のみ発育しなかったため、この株については対象から外し、他の菌株についてのみ評価した。最終1施設は結果返送不可とのことにてリタイアとし、今回対象から除外し、最終的に23施設の結果について評価した。

(1) 検査法および菌液調整法

検査法および菌液調整法についてみると、今回パネルテストを実施した施設では全施設で比率法が採用されていた。接種菌液の調整法では、23施設中17施設が液体培地にて増菌を行い、目視あるいは比濁計による吸光度測定にて濃度調整を行ってから希釈菌液の調整を行っていた。他の6施設については固体培地から取った菌を分散チューブ等でホモジナイズした後、希釈液を作製していた。検査に使用された培地についてみると、23施設中17施設がビットスペクトル-SRを、5施設がウエルバックSを、2施設が1%小川培地を使用していた。なお、1施設についてはウエルバックSとビットスペクトル-SRの両方を使用していた。検査の安全性に関して、全施設で安全キャビネットが使用されていた。

(2) INH感受性試験

結果について薬剤別にみると、Table 1に示すとおりINHでは感度の平均が95% (29~100)、特異度の平均が100%、耐性的中率の平均が100%、感受性的中率の平均が90% (38~100)、一致率の平均が97% (50~100)であった。感度・特異度ともに100%の施設が18施設 (78.3%)であり、判定の不一致についてみると、SRLNで耐性とされた菌株を感受性として判定した場合が5施設で13株について認められたが、感受性株を耐性と判定した例はなかった。この13株のうち6株はII-57あるいはII-84のペア株に集中しており、この菌株はSRLNでも19施設中5施設が感受性と判定したやや一致性の低い菌で

Table 1 The results of drug susceptibility testing to INH

Strain	JUD ^a	Laboratory																		R total					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		19	20	21	22	23
II-1	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-18	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-10	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-21	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-19	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-56	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-24	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-91	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	23
II-32	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	23
II-47	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	23
H37Rv	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
H37Rv	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-94	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-57	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	19
II-84	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	20
II-67	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-89	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
True Resistant	W ^c	B&W	B ^d	B	B	B	B	B	B	W	B	O ^e	O	B	B	B	B	B	W	W	B	B	B	B	Total
False Resistant	13	14	14	14	14	14	14	4	14	12	13	14	14	14	14	14	14	14	14	12	14	14	14	14	306
True Susceptible	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
False Susceptible	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	138
	1	0	0	0	0	0	0	10	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	15
Sensitivity (%)	93	100	100	100	100	100	100	29	100	86	93	100	100	100	100	100	100	100	92	100	100	100	100	95	Average
Specificity (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Efficiency (%)	95	100	100	100	100	100	100	50	100	90	95	100	100	100	100	100	100	100	95	100	100	100	100	97	
Reproducibility (%)	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99

^aJUD : Judicial diagnosis ^bNG : No growth ^cW : Welpack-S ^dB : Bitspectre-SR ^eO : 1% Ogawa

あった。

(3) RFP感受性試験

RFPの感受性試験結果をTable 2に示した。RFPでは感度の平均が95% (63~100), 特異度の平均が99% (67~100), 耐性的中率の平均が98% (60~100), 感受性的中率の平均が97% (80~100), 一致率の平均が97% (70~100)であった。感度・特異度ともに100%の施設は17施設 (73.9%)あり, 不一致例をみると6施設で14株について認められた。このうちSRLNで耐性と判定された株を感受性と判定した場合 (false-susceptible) が9株であり, その反対にSRLN感受性株を耐性とした場合 (false-resistant) が4株であった。

(4) SM感受性試験

SMでの結果をTable 3に示した。SMでは感度の平均が66% (33~100), 特異度の平均が94% (64~100), 耐性的中率の平均が83% (44~100), 感受性的中率の平均が87% (78~100), 一致率の平均が86% (65~100)であった。感度・特異度ともに100%でSRLNと完全に一致した施設は5施設 (21.7%)で, INH/RFPに比較すると少なかった。不一致例は18施設で66株に認められた。False-resistantは20株に認められているが, このうち18株はII-10 (II-21と同一), II-19 (II-56と同一) およびII-67 (II-89と同一) に集中していた。これらの株はSRLNにおいても完全な一致が認められておらず, II-10, II-21, II-19, II-56, II-67およびII-89のそれぞれについて78.9%, 84.2%, 63.2%, 73.7%, 94.7%および84.2%の一致率である。またfalse-susceptibleが46株に認められているが, これもII-32 (II-47と同一) およびII-57 (II-84と同一) 株に集中しており, 45株 (97.8%)を占めていた。

(5) EB感受性試験

Table 4にEBの結果を示す。EBでは感度の平均が96% (33~100), 特異度の平均が74% (57~86), 耐性的中率の平均が61% (33~75), 感受性的中率の平均が98% (71~100), 一致率の平均が81% (60~90)であった。不一致は89株において認められ, 83株はfalse-resistantであった。特にII-1 (II-18と同一) およびII-19 (II-56と同一) に全体の91.6%にあたる76株が集中していた。

(6) 菌株ごとの判定一致率

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差違をTable 5に一致率で示した。今回はII-57 (II-84と同一株) について被験施設でSM感受性と判定されることが多く, 23施設中15施設がSM感受性と判定していた。またII-1 (II-18と同一), II-19 (II-56と同一) についてEB耐性と判断されている場合が多く, 特にII-1については全施設でEB耐性と判定していた。その他の株については概ねSRLN判定との一致率は

高かった。

(7) 薬剤ごとの耐性・感受性的中率

耐性的中率および感受性的中率について, 今回のパネルテストに用いた菌株の薬剤ごとの耐性菌の頻度とともにTable 6に示した。

考 察

抗結核薬の感受性試験情報は効果的な結核診療の上できわめて重要である。特に薬剤感受性試験の多くが病院検査室ではなく, 外部検査として検査センターで実施されていることを考慮すると, これらの施設に対する外部精度アセスメント活動は必須であると考えられる。今回参加した23施設はいずれも毎月20件以上薬剤感受性試験を実施しており, 年に数千件実施している施設もあった。このような大規模施設に対して外部精度アセスメントを実施したことは検査精度の向上に有用であったと考ええる。

WHO/IUATLD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%以上に保つことを基本とし, 主要4剤について一致率90%以上を目標としている。今回の参加施設の平均ではINHおよびRFPについてこれらの基準を満たしており, 平均的には良好な結果であったと言える。しかしながら, INHについては5施設で感度95%以下であり, 一致率が50%という施設もみられた。特に感度29%となった施設では4組8株で耐性菌を感受性と判定しており, 他の施設を含めて判定の不一致がみられた12株すべてについて耐性株を感受性と判定していた。RFPについても6施設で感度が95%を下回っており, 一致率でも2施設が90%未満であった。RFPにおける判定の齟齬についてみると, SRLNにて耐性とされた株を感受性とした場合がほとんどであり, 感受性菌を誤って耐性と判定している例は1施設で4株みられたのみであった。このうちII-67 (II-89) については, この株を感受性と判定した4施設のうち3施設でペア株のうちどちらか一方を耐性と判定していることから, 検査手技上の問題ではないかと考えられた。

そこでINHおよびRFPについて結果に齟齬がみられた施設についてインタビューを行ったところ, 1つの原因として菌液調製の段階での問題が考えられた。これはすべての菌株の発育速度が同一でないため, 全菌株について同一の培養時間では十分に増殖していない菌株があり, 濁度が不十分であったにもかかわらずこれがそのまま接種されて判定されていたもので, 100倍希釈コントロールに十分な発育がみられないというものであった。薬剤感受性試験では菌の発育状態をそろえることと共に接種菌の濃度も重要であり, 菌株により培養期間を調整して一定の濁度を得るようにすることが重要である。ま

Table 2 The results of drug susceptibility testing to RFP

Strain	JUD ^a	Laboratory																				R total			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21	22	23
II-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	23
II-18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	23
II-3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	23
II-21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	23
II-19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-56	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
II-91	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
II-32	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
II-47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
H37Rv	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
H37Rv	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-94	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-57	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	20
II-84	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	20
II-67	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	20
II-89	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	21
True Resistant	W ^c	B&W	B ^d	B	B	B	B	B	B	B	W	B	O ^e	O	B	B	B	B	B	W	W	B	B	B	Total
False Resistant	8	8	8	7	8	8	8	6	8	8	7	8	5	8	8	8	8	8	6	7	7	8	8	8	173
True Susceptible	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
False Susceptible	12	12	12	12	12	12	12	8	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	272
Sensitivity (%)	0	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	10
Specificity (%)	100	100	100	88	100	100	100	75	100	88	100	63	100	100	100	100	100	75	100	100	88	100	100	95	Average
Efficiency (%)	100	100	100	100	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99
Reproducibility (%)	100	100	100	95	100	100	100	70	100	95	100	85	100	100	100	100	100	90	100	100	95	100	100	100	97
	100	100	100	90	100	100	100	100	100	100	90	90	100	100	100	100	100	100	100	90	90	100	100	100	98

^aJUD : Judicial diagnosis ^bNG : No growth ^cW : Welpack-S ^dB : Bitspectre-SR ^eO : 1% Ogawa

Table 3 The results of drug susceptibility testing to SM

Strain	JUD ^a	Laboratory																				R total			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21	22	23
II-1	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
II-18	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
II-3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-10	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
II-21	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	3
II-19	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	3
II-56	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	5
II-24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	23
II-91	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14
II-47	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16
H37Rv	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
H37Rv	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-94	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
II-57	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	NG ^b	S	S	S	R	8
II-84	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	8
II-67	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
II-89	S	R	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4
True Resistant	W ^c	B&W	B ^d	B	B	B	B	B	B	W	B	O ^e	O	B	B	B	B	B	W	W	B	B	B	B	Total
False Resistant	6	4	4	3	2	2	2	4	4	4	6	3	6	2	4	6	2	6	6	4	3	2	6	6	91
True Susceptible	5	0	0	1	0	0	0	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	20
False Susceptible	9	14	14	13	14	14	14	9	14	9	14	14	14	14	14	14	14	14	12	12	14	14	14	14	302
Sensitivity (%)	0	2	2	3	4	4	4	2	2	2	0	3	0	4	2	0	4	4	0	1	3	4	4	46	
Specificity (%)	100	67	67	50	33	33	33	67	67	67	100	50	100	33	67	100	33	100	100	80	50	33	100	66	
Efficiency (%)	64	100	100	93	100	100	100	64	100	64	100	100	100	100	100	100	100	100	86	86	100	100	100	94	
Reproducibility (%)	75	90	90	80	80	80	80	65	90	65	100	85	100	80	90	100	80	80	90	84	85	80	100	86	
Average	90	100	100	80	100	100	100	90	100	90	100	90	100	100	100	100	100	100	80	100	90	100	100	96	

^aJUD : Judicial diagnosis ^bNG : No growth ^cW : Welpack-S ^dB : Bitspectre-SR ^eO : 1% Ogawa

Table 4 The results of drug susceptibility testing to EB

Strain	JUD ^a	Laboratory																				R total			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21	22	23
II-1	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	23
II-18	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
II-3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2	
II-8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2	
II-10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	
II-21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	
II-19	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16	
II-56	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	15	
II-24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22	
II-91	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	21	
II-32	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
II-47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
H37Rv	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	
H37Rv	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
II-48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
II-94	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
II-57	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NG ^b	R	R	R	22	
II-84	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22	
II-67	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22	
II-89	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22	
True Resistant	W ^c	B&W	B ^d	B	B	B	B	B	B	W	B	O	B	B	B	B	B	B	B	W	W	B	B	Total	
False Resistant	6	6	6	6	6	6	2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	4	6	131	
True Susceptible	4	3	4	2	2	2	5	4	5	3	4	2	6	2	4	4	4	5	4	4	4	4	4	83	
False Susceptible	10	11	10	12	12	12	9	10	9	11	10	12	8	12	10	10	10	9	10	10	10	10	10	239	
	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
Sensitivity (%)	100	100	100	100	100	100	100	33	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	Average	
Specificity (%)	71	79	71	86	86	86	64	71	64	79	71	86	57	86	71	71	64	71	71	71	71	71	71	96	
Efficiency (%)	80	85	80	90	90	90	75	60	75	85	80	90	70	90	80	80	75	80	79	70	70	80	80	74	
Reproducibility (%)	100	90	100	100	100	100	90	100	90	90	100	100	100	80	100	100	90	100	100	100	100	100	100	81	
Reproducibility (%)	100	90	100	100	100	100	90	100	90	90	100	100	100	80	100	100	90	100	100	100	100	100	100	96	

^aJUD : Judicial diagnosis ^bNG : No growth ^cW : Welpack-S ^dB : Bitspectre-SR ^eO : 1% Ogawa

Table 5 Concordant rate of each strain tested

Strain	INH		RFP		SM		EB	
	JUD ^a	Concordance	JUD	Concordance	JUD	Concordance	JUD	Concordance
II -1	R	96	R	100	S	96	S	0
II -18	R	96	R	100	S	96	S	4
II -3	S	100	S	100	S	100	S	91
II -8	S	100	S	100	S	100	S	91
II -10	R	96	R	100	S	91	S	96
II -21	R	96	R	100	S	87	S	96
II -19	R	96	S	100	S	87	S	30
II -56	R	96	S	100	S	78	S	35
II -24	R	96	S	96	R	100	R	96
II -91	R	100	S	96	R	96	R	91
II -32	R	100	S	96	R	61	S	100
II -47	R	100	S	96	R	70	S	100
H37Rv	S	100	S	100	S	100	S	96
H37Rv	S	100	S	100	S	100	S	100
II -48	S	100	S	100	S	100	S	100
II -94	S	100	S	100	S	100	S	100
II -57	R	83	R	87	R	35	R	96
II -84	R	87	R	87	R	35	R	96
II -67	R	96	R	87	S	96	R	96
II -89	R	96	R	91	S	83	R	96

^aJUD : Judicial diagnosis

Table 6 Predictive values of resistance and susceptibility

	INH	RFP	SM	EB
Proportion of R	0.7	0.4	0.3	0.3
Sensitivity	0.95	0.95	0.66	0.96
Specificity	1	0.99	0.94	0.74
Predictive value R	100%	98%	83%	61%
Predictive value S	90%	97%	87%	98%

R : resistance S : susceptibility

た、試験に用いた培地の一部で使用期間が過ぎていた可能性もあった。使用期間を過ぎた培地が使用された経緯には菌株の発送が遅れたことも影響していた。

また、菌液接種後の培養条件についてみると、培養スペースが狭小なため斜面台上での培養は1日以下ですぐに試験管立てに立てて培養する施設があり、凝固水が多く残っていることが観察された。管底に菌が固まってしまいコロニー数がカウントできない場合も考えられ、斜面台での培養を十分に長くすることも重要と思われた。

SMについては感度が66%と低く、特異度が94%と高かったことから、ほとんどはSRLNでの耐性株を感受性と判定していると解釈された。これは主にII-32 (II-47と同一) およびII-57 (II-84と同一) 株にみられたが、II-57株ではSRLN19施設中5施設が感受性と判定しており、一方II-32株についてはSRLN19施設のうち18施設で一致している。II-32株については、感受性と判定した9施設のうち2施設がベア株の一方で耐性と判定しており、手技的な問題がある可能性を示唆している。使

用されている試験培地についてみても、II-32株のみみるとある特定の培地に判定不一致が偏在しているように思われたが、II-57株についてみると、いずれの培地でもほぼ同様に不一致がみられた。この事象は2002年の市販薬剤感受性試験培地の精度管理においても認められており、その時点では判定結果の不一致が薬剤濃度の差異によるものではないとしているが、今回の結果をみるかぎりにおいてはLöwenstein-Jensen (L-J) 培地で用いられている4.0 µg/mlの濃度に対して、日本では10.0 µg/mlが採用されていることが影響している可能性も無視できないのではないかと思われた⁹⁾。

EBについては、もとより静菌的な薬剤であることから結果の安定性に問題がいられているが、今回の結果では感度96%、再現性96%と良好な結果であった。しかしながら、特異度は74%と低く、SRLNでの感受性判定株を耐性と判定している場合がほとんどであった。この結果はII-1 (II-18と同一) およびII-19 (II-56と同一) 株に集中しており、SMの場合と同様に使用している培地や手技的な問題ではないと思われた。この試験結果については、SM同様基礎培地の違いと設定薬剤濃度 (L-Jでは2.0 µg/ml, 1%小川では2.5 µg/ml) が関連していることも考えられた。L-J培地での2.0 µg/mlは1%小川培地では5.0 µg/ml程度に相当するとする報告もある⁹⁾。今回のEBの結果について、SRLNで定めるように参加施設全体の一致率が70%以上の判定結果を「標準判定」として考えれば、II-1については感受性、II-19については判

定対象外となり、その場合の感度、特異度、一致率はそれぞれ96%、97%、97%となり、基準を十分に満たしているともいえる。

それぞれの薬剤について一致率 (Efficiency) をみると、INH, RFP, SM, EB のそれぞれについて、97%、97%、86%、81%であり、SMおよびEBについては結果として不十分と思われた。

今回このような比較的規模の大きい外部精度アセスメントを実施したが、外部精度アセスメント自体が現状では十分な理解を得られていないように思われる。もともと外部精度アセスメントとは、当該検査室の能力 (パフォーマンス) を他の上位の検査室と比較することによって評価することとされており、この方策として Panel Testing/Proficiency Testing (技術評価試験), Cross re-checking (再検査試験) および On-site evaluation/Inspection (検査室立ち入り評価) の3つの要素がある⁷⁾。注意すべきは、これらは検査室の総合的な効率性を評価するものであって、個々の診断や個々の技術者の評価を行うものではないということである。途上国では塗抹検査の外部精度アセスメントに Cross re-checking を実施するのが一般的であるが、これをそのまま薬剤感受性試験に応用するのは検査すべき検体数から考えてルーチンに行うには困難が多い。今回実施したパネルテストについては、中央の作業量が比較的少なく、結果も早期に得られるという利点はあるものの、“テスト”であることがわかっているため基本的には“持っている技術の最高レベル”を評価しており、日常の作業を反映していない可能性があるという欠点もある。このような欠点を考慮してもパネルテストを行う意義は、多くの対象施設の中から問題のある施設を見つけ出し、早期に改善対策を施すことにある⁸⁾。検査の精度保証とは、外部精度アセスメント、改善活動、再アセスメントの繰返しによって検査精度を永続的に維持改善させるシステムであり、外部精度アセスメント単体では意味がない。今回の結果が内部精度管理に反映されることを期待しつつ、積極的な改善活動も実践されるべきである。

謝 辞

この研究は平成15年度厚生労働科学研究補助金・新

興再興感染症研究事業「小児結核及び多剤耐性結核の予防、診断、治療における技術開発に関する研究」から一部研究費の補助を受けて実施された。

*日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会

委員長：高嶋哲也 副委員長：小栗豊子 委員：一山 智、小川賢二、鎌田有珠、古賀宏延、塩谷隆信、竹山博泰、御手洗聡、和田光一、斎藤 肇、富岡治明、土井教生、長沢光章、樋口武史 協力：阿部千代治

文 献

- 1) World Health Organization : Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis surveillance. Geneva, Switzerland, 1997, WHO/TB/97, 229.
- 2) Laszlo A, Rahman M, Espinal M, et al. ; WHO/IUATLD Network of Supranational Reference Laboratories : 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.
- 3) 御手洗聡：結核菌とくに薬剤感受性検査の精度管理に関する研究. 小児結核及び多剤耐性結核の予防、診断、治療における技術開発に関する研究；平成15年度総括・分担研究報告書. 2004 : 164-185.
- 4) 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 (2) 市販薬剤感受性試験培地の精度について. 結核. 2003 ; 78 : 563-568.
- 5) 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，特に試験濃度改変と比率法導入への提案. 結核. 1997 ; 72 : 597-598.
- 6) Tanoue S, Mitarai S, Shishido H : Comparative study on the use of solid media: Löwenstein-Jensen and Ogawa in the determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. Tuberculosis. 2002 ; 82 : 63-67.
- 7) Association of Public Health Laboratories : External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. Washington, 2002.
- 8) 平野和重, 和田雅子, 阿部千代治, 他：入院時薬剤耐性に関する研究：1997年度の各施設と結研の成績の比較. 結核. 2001 ; 76 : 461-471.

Original Article

THE EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT FOR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING BY PROFICIENCY TESTING PANEL TO THE COMMERCIAL LABORATORIES

Satoshi MITARAI

Committee for Mycobacterial Examinations, Japanese Society for Tuberculosis

Abstract [Objective] The Committee for Mycobacterial Examinations has programmed and implemented the external quality assessment for *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing by proficiency testing panel to the commercial laboratories that perform drug susceptibility testing more than 20 cases monthly.

[Method] It utilized 20 strains, exactly pairs of 10 strains, of *Mycobacterium tuberculosis* that were evaluated for the resistance pattern in the WHO/IUATLD supra-national laboratory network (SRLN), and the concordant results within SRLN were employed as the gold standard of the test. Each laboratory performed the drug susceptibility testing with routine method including the preparation of bacterial suspension.

[Results] As a result, the sensitivity for isoniazid (INH) was 95% on an average, ranging from 29% to 100%. The specificity and efficiency for INH were 100% and 97% (50–100), respectively. Additionally, the reproducibility for INH was 99% (90–100). Similarly, the sensitivity, specificity, efficiency and reproducibility for rifampicin (RFP) were 95% (63–100), 99% (67–100), 97% (70–100) and 98% (90–100), respectively. The sensitivity, specificity, efficiency and reproducibility for streptomycin (SM) were 66% (33–100), 94% (64–100), 86% (65–100) and 96% (80–100), respectively. For EB, the sensitivity, specificity, efficiency and reproducibility were 96% (33–100), 74% (57–86), 81% (60–90) and 96% (80–100), respectively.

[Discussion] The required standard for satisfactory results of sensitivity, specificity and reproducibility is 95%, and the results for INH and RFP were excellent on an average. However, several laboratories showed unsatisfactory results, especially in sensitivity. Almost all the discordant results for INH and RFP were false-susceptible comparing to the gold standard. For INH, one pair of tested strain showed discordant results in many evaluated laboratories and seemed to reflect the relatively low concordance even in SRLN. On the other hand, the reason for false-susceptible results for RFP was unclear. Several laboratories showed discordant results in one strain

pair so that it might be a technical mistake.

The sensitivity of SM was remarkably low and it was due to many false-susceptible results, which was twice the number of false-resistance. It was due to the character of tested strain partially considering relatively low concordance in SRLN. However, there was no persuasive explanation for the inconsistency in other strains that showed highly concordant results in SRLN. The difference of critical drug concentration in Löwenstein-Jensen and 1% Ogawa medium might contribute to the discrepancies.

The specificity of EB was low and it was due to many false-resistant results. About a specific pair of tested strain, almost 100% of laboratories showed concordant false-resistant results whereas SRLN showed perfectly concordant susceptible result. If this strain was considered as resistant and another strain that showed less than 70% concordance in the tested laboratories was excluded, the sensitivity, specificity and efficiency would improve to 96%, 97% and 97%, respectively.

The proficiency testing is a part of external quality assessment system and requires following corrective actions. A permanent quality improvement and maintenance will be expected through the spiral circulation of quality assurance activities.

Key words: Tuberculosis, Drug susceptibility testing, Quality Control, Commercial laboratory, External quality assessment

Bacteriology Division, *Mycobacterium* Reference Centre, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Satoshi Mitarai, Bacteriology Division, *Mycobacterium* Reference Centre, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.
(E-mail: mitarai@jata.or.jp)