

結核療法研究協議会2002年度入院時結核菌薬剤感受性に関する研究：検査精度の検討

結核療法研究協議会

要旨：〔目的〕2002年度結核療法研究協議会入院時結核菌薬剤感受性に関する研究について、外部精度評価の観点から解析した。〔方法〕全国で2002年6月1日から11月30日までに、抗酸菌培養陽性で入院した症例を対象とした。臨床情報および菌検査情報（同定、薬剤感受性）を収集し、結核研究所での検査結果と比較した。〔結果〕95施設から4,134株が集められ、そのうち結核菌は3,127株（75.6%）、非結核性抗酸菌は899株（21.7%）、結核と非結核菌株の混在が26株（0.6%）、雑菌汚染82株（2.0%）であった。評価可能な結核菌3,122株について、50施設（52.6%）がビットスペクトル-SRを、23施設（24.2%）がウエルバックSを用いて薬剤感受性試験を実施していた。結核研究所での判定を基準とした場合、各抗結核薬（INH, RFP, SM, EB）の感度は90.3%以下で、特異度・一致率は96.9%以上であった。エタンプトールの κ 指数のみ0.47と低値であった。〔考察〕感受性試験の方法による検査精度の差は認められなかったが、エタンプトールのみ精度が低かった。

キーワード：療研、結核、薬剤感受性試験、外部精度評価

はじめに

全世界では年間およそ900万人が新たに結核に罹患し、170万人が死亡している。世界保健機関（WHO）および国際結核肺疾患予防連合（IUATLD）は世界規模の結核薬剤感受性調査を行い、東ヨーロッパや中国の一部等、幾つかの国や地域での急速な薬剤耐性結核の増加を報告している¹⁾。また、同時に近年拡大しているDOTS戦略の評価等を目的として、途上国における薬剤耐性サーベイランスの実施を奨励している²⁾。

日本では結核療法研究協議会（療研）が1957年から1997年までに2～5年ごとに過去12回入院時薬剤耐性菌に関する全国調査を行い、各年断面での耐性菌の頻度と30年間にわたる日本での薬剤耐性の頻度の推移を報告している^{3)~16)}。国立、公立、私立を問わず毎回全国で50以上の施設が参加しており、その結果は日本の代表的な薬剤感受性成績として認識されている。特にほとんどの回の調査において薬剤耐性の判定は調査実施事務局となる中央施設（例：結核予防会結核研究所など）が、

参加施設から取得した全菌株について統一的な方法で行っており、その信頼性は高い。最近の調査は1997年に実施されており、この時から比率法を標準として感受性試験を実施している。療研調査では全国からの菌株の取得とともに、臨床および検査方法等の情報も収集して解析を行っている。

1997年の調査から5年が経過し、今回2002年度の調査が実施された。この間には抗酸菌検査法にも多くの変化がみられている。まず2000年に結核菌検査指針が改訂され、比率法が薬剤感受性試験の標準法となった。また、抗酸菌塗抹検査も蛍光法が推奨されている¹⁷⁾。さらには液体培地を用いた分離培養・薬剤感受性試験法や、最小発育阻止濃度による薬剤感受性検査法も導入されるなど、技術的な進歩が著しい¹⁸⁾。このように現在は技術的過渡期にあると考えられ、検査の精度を評価・保証することも療研調査の重要な目的と考えられる。

抗酸菌検査の精度保証は世界的にその重要性が認識されつつあり、特に外部からの評価による検査精度の確保が進められている。米国では既に Clinical Laboratory

Improvement Amendments (CLIA) に基づいて、各検査施設に対して精度保証プログラムに参加することが義務づけられており、一定基準を満たさないと検査費用が保険から支払われないシステムとなっている¹⁹⁾。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²⁰⁾、ベトナム、フィリピン、モンゴル等のように 90% 以上の施設に二重盲検再検査（クロスチェック）による外部精度評価を実施している国もある。このように精度保証は途上国においてすら重要なキーワードである。今回、療研調査時に収集された検査方法に関する情報を結核研究所での結果と比較し、外部精度評価の観点から解析を行った。

対象と方法

（１）期間および対象

結核療法研究協議会（療研）委員長名により、日本国内において 50 床以上の結核病棟を有する病院に対して研究への参加を書面にて依頼し、最終的に 99 施設の参加を得た。参加各施設において 2002 年 6 月 1 日から 11 月 30 日までの期間に入院した抗酸菌症（非結核性抗酸菌症も含む）患者中、喀痰以外の検体も含めて抗酸菌培養陽性となった全症例を対象とした。対象患者から分離された抗酸菌は後述する調査票とともに、中央検査施設としての結核予防会結核研究所へ送付され、同抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科において同定・薬剤感受性試験を実施した。送付された菌株は、すべて小川培地にて継代培養し、雑菌汚染等を調べたうえで以降の実験に供した。

（２）臨床・検査情報等調査票

上記対象について、年齢、性別、既治療の有無・期間、合併症等の臨床情報とともに、検体の種類、各施設での塗抹検査法、培養法、菌種同定法、薬剤感受性試験法に関する情報を取得した。同時に、結核菌については各施設の検査による薬剤感受性結果を入手した。

（３）分離菌株の菌種同定

送付された抗酸菌について、結核研究所ではキャピリア TB（日本ベクトンディッキンソン）、DDH マイコバクテリア（極東製薬）、培養・生化学試験および 16S rRNA 遺伝子の解析により菌種の鑑別、同定を実施した。

（４）薬剤感受性試験

参加施設から送付されたすべての分離菌株について、中央検査施設（結核研究所）では新結核菌検査指針 2000 に従って 1% 小川培地を用いた比率法により薬剤感受性試験を行った¹⁷⁾。試験薬剤は isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM) および ethambutol (EB) とした。発育コントロールおよび薬剤含有 1% 小川培地は結核研究所細菌検査科にて作製し、汚染がないことを確認した

後、2 週間以内に使用した。接種菌液の調製には Middlebrook 7H9 液体培地を用い、比濁計にて OD=0.05 から培養して OD=0.1 に達した時点で調製原液とした。原液を 100 倍希釈したものを各薬剤含有培地およびコントロール培地に 100 μ l ずつ接種し、10,000 倍希釈液 100 μ l を別のコントロール培地に接種して、斜面台上で 37℃ で培養した。最終的に 100 倍希釈液接種コントロール培地に十分な発育が見られたことを確認し、その時点で 10,000 倍希釈液を接種したコントロール培地と各薬剤含有培地上のコロニー数を比較し、薬剤含有培地上のコロニー数が多ければ 1% 耐性と判定した。なお、患者の治療歴については WHO の基準に従って、結核治療歴のない者、あるいはあったとしても治療 4 週間未満の者を未治療患者とし、4 週以上の治療歴がある場合は既治療患者に分類した。

検査法別の解析を実施する場合、同一施設でも複数の検査法を用いている場合があり、基本的に菌株ごとに評価した。検査法によって施設を分類する場合は、その施設で最も多く使用されている検査法についてのみ評価した。

（５）倫理面への配慮

研究の実施にあたっては「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、必要に応じて各参加施設での倫理委員会での承認を得ている。調査票から得られる個人情報および各検体から得られる薬剤感受性試験結果は、療研および結核研究所の研究担当者のみがこれを知りうるものとし、情報・検体については当該目的以外に使用しないこととした。また、データの発表に際しては個人を特定できないよう配慮した。

結 果

（１）施設および検体

今回共同研究に参加した 99 施設から 4,647 人の患者について参加検体登録（調査票送付）があり、その中から Table 1 に示すように、95 施設から分離菌株 4,134 株が集められた。そのうち結核菌は 3,127 株 (75.6%)、非結核性抗酸菌は 899 株 (21.7%)、結核と非結核菌株の混在が 26 株 (0.6%)、雑菌汚染が 82 株 (2.0%) であった。結核菌株のうち臨床的な情報が不十分であった 5 株を除いて基本的に 3,122 株について以降の解析を行った。

（２）塗抹検査および分離培養法

抗酸菌塗抹検査法についてみると、チール・ネールゼン染色が 46 施設 (859 検体, 27.5%)、蛍光染色が 63 施設 (2,004 検体, 64.2%) で実施され、両法を実施した施設も 14 施設 (258 検体, 8.3%) 認められた (1 検体のみ方法不明)。

各施設での分離培養法を Table 2 にまとめて示した。

Table 1 Description of samples from participating laboratories

	Registered samples (%)		Enrolled samples (%)	
<i>M. tuberculosis</i>	3,127	(67.3)	3,127	(75.6)
MOTT ^a	899	(19.3)	899	(21.7)
<i>M. tuberculosis</i> + MOTT	26	(0.6)	26	(0.6)
Contamination	82	(1.8)	82	(2.0)
No strains received	84	(1.8)		
No growth	164	(3.5)		
Sample duplicated	25	(0.5)		
Out-patient sample	16	(0.3)		
Out of period	224	(4.8)		
Total	4,647		4,134	

^a *Mycobacterium* Other Than *Tuberculosis*

56施設が小川培地を使用し、31施設が *Mycobacterium* Growth Indicator Tube: MGIT (日本ベクトンディッキンソン) を使用していた (マニュアル・自動の別は不明)。一方で検体数は小川培地 988 件 (31.6%), MGIT 1,097 件 (35.1%), 小川培地と MGIT の併用が 844 件 (27.0%) であった。他に MB/BacT (日本バイオメリュー) 等が使用されていた。

(3) 菌種同定法

鑑別・同定法に関して、Table 3 に示すように 12 施設 (12.6%) が培養生化学的検査法を実施しており、16 施設 (16.8%) がナイアシン試験を実施していた。アキュプロープ (極東製薬) および DDH マイコバクテリアに代表される遺伝子の同定は 51 施設 (53.7%) で行われており、核酸増幅法による同定 [Amplicor (日本ロシュ) および MTD (富士レビオ)] も 63 施設 (66.3%) で実施されていた。MPB-64 分泌蛋白抗原を利用したキャピリア TB も 26 施設 (27.4%) で利用されていた。各施設から結核菌として送付された菌株のうち、Table 4 に示すようにいくつかの株で菌種同定の不一致が認められた。そのうち 7 株は非結核性抗酸菌であり、具体的には *M. avium* 2 株, *M. intracellulare* 2 株, *M. fortuitum*, *M. shimoide*, *M. terrae* 各 1 株であった。これらの同定に使用されていた方法はアキュプロープ, Amplicor およびキャピリア TB であった。また 11 株は結核菌群と非結核性抗酸菌の混合培養であった。

(4) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験には、施設によっていくつかの異なる方法が利用されていた (Table 5)。一番多く用いられていたのはピットスペクトル-SR であり 50 施設 (52.6%) で使用されており、続いてウエルパック S が 23 施設 (24.2%) で使われていた。しかし、検査室あたりの検体数でみると MGIT が最大となり、続いてウエルパック S となった。これは MGIT が多くの検体を扱っている施設で使用されていることを示していた。

Table 2 Initial isolation methods in registered laboratories

Method	No. of laboratory	No. of sample
Ogawa medium	56	988
MGIT ^a	31	1,097
MB/BacT	6	39
Bit medium	2	14
Ogawa + MGIT	25	844
Ogawa + MB/BacT	2	31
Other combination	10	109

^a *Mycobacterium* Growth Indicator Tube (auto or manual)**Table 3** Identification methods in participating laboratories

Method	No. of laboratory	No. of sample
Biochemistry ^a + others	12	34
Niacin ^b + others	16	162
AccuProbe ^c + others	20	742
Amplicor ^d + others	56	1,466
Capilia TB + others	26	1,029
DDH ^e + others	31	329
MTD ^f + others	7	57
Other combination	6	41
Total	174	3,860

^a Biochemical confirmation tests, ^b Niacin accumulation test,^c AccuProbe TB confirmation test, ^d Amplicor *Mycobacterium*,^e DDH *mycobacteria* "Kyokuto", ^f *Mycobacterium tuberculosis* direct test

今回の研究では、ほとんどの施設 (89 施設) で比率法を用いた薬剤感受性試験が実施されており、前回の研究が実施された時点で絶対濃度法が主流であったことから考えると、中央検査施設での検査結果との比較が容易である。以降、INH, RFP, SM, EB の順で各施設と中央検査施設の判定結果を比較した。評価の絶対基準には中央検査施設の結果を用い、これに対して感度、特異度、一致率、kappa (κ) 指数、偽耐性率および偽感受性率を評価した。ここで感度とは、耐性株を正しく耐性と判定する割合であり、特異度とは同様に感受性株を正し

Table 4 Discrepant identifications between participating laboratories and the reference laboratory

Registered laboratory	RIT	No. of strains
<i>M. tuberculosis</i> complex	MOTT ^a	7
<i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. tuberculosis</i> complex + MOTT	11

^a Mycobacterium other than tuberculosis

RIT: Research Institute of Tuberculosis

Table 5 Methods used for drug susceptibility testing in participating laboratories

Method	No. of laboratory	No. of sample (%)	Sample/Lab
1% Ogawa (standard)	17	409 (13.1)	24.1
Welpack S	23	1,040 (33.3)	45.2
Bitspectre-SR	50	1,188 (38.1)	23.8
MGIT	4	264 (8.5)	66.0
BrothMIC MTB-I	4	100 (3.2)	25.0
Others + Unknown	4	121 (3.9)	30.3

Table 6 Drug-specific indicators of susceptibility testing performance by participating laboratories

Category	INH 0.2 ^a	INH 1.0 ^b	RFP	SM	EB
Sensitivity	0.845	0.859	0.903	0.740	0.772
Specificity	0.987	0.994	0.997	0.994	0.973
Efficiency	0.980	0.989	0.995	0.974	0.969
False resistant rate	0.012	0.006	0.003	0.005	0.026
False susceptible rate	0.008	0.005	0.002	0.021	0.004
Kappa coefficient	0.798	0.835	0.894	0.806	0.470

The indicators were calculated on the drug susceptibility results by Research Institute of Tuberculosis

as judicial diagnosis. ^a Isoniazid 0.2 $\mu\text{g/ml}$, ^b Isoniazid 1.0 $\mu\text{g/ml}$

INH: isoniazid RFP: rifampicin SM: streptomycin EB: ethambutol

く感受性と判定する割合である。一致率は耐性・感受性を併せた判定の一致の割合である。 κ 指数は参加施設・中央判定の間の一致率を評価する目的で用いた。偽耐性率および偽感受性率は、それぞれ誤って耐性、感受性と判定された株の全体数に対する割合である。

まず INH 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 濃度についてみると、Table 6 に示すように感度84.5%、特異度98.7%、一致率98.0%、 κ 指数0.798であった。同様に INH 1.0 $\mu\text{g/ml}$ についても、感度、特異度、一致率、 κ 指数はそれぞれ、85.9%、99.4%、98.9%、0.835であった。RFPは感度90.3%、特異度99.7%、一致率99.5%で、今回試験した薬剤では多くの指標値からみて最も精度が高く、 κ 指数も0.894であった。SMの一致率は97.4%であったが、偽感受性率が2.1%と偽耐性率0.5%の約4倍であり、耐性株を感受性と評価する過小評価が多かったことが示された。EBについても一致率は96.9%と高かったが、偽耐性率が2.6%で偽感受性率0.4%の約7倍であり、これは過大評価といえる結果であった。さらにEBに関しては κ 指数が0.47と他の薬剤に比べて著しく低かった。

Table 7 に今回主に使用されていた検査法別に薬剤感受性感度・特異度等をまとめて示した。小川標準法、ウ

エルバック S、ビットスペクトル-SRのいずれにおいてもEBでの κ 指数が0.237~0.545と低いのに対し、MGITでの判定はすべての薬剤で κ 指数が0.8を超えており、判定の一致度が高いことが示された。また、小川標準法について他の方法よりもRFP、SM、EBに関する κ 指数が低いことが示されている。また、EBでの小川標準法の感度はウエルバック SおよびMGITに比べて有意に低かった ($p=0.037$ and 0.022)。

主要各試験法のINHとRFPに関する一致率を施設数でみるとTable 8 のようになり、INHでは小川標準法で1施設、ビットスペクトル-SRで3施設について一致率が90%未満であった。同様にRFPでは小川標準法で1施設、ビットスペクトル-SRで2施設について一致率が90%未満であった。MGITはINH、RFPの双方について95%以上の一致率を示した。

考 察

2002年度に実施した療研入院時薬剤感受性調査にて得られた情報に基づき、培養、同定、薬剤感受性の各検査について外部精度評価の観点から解析を行った。今回の研究は、1997年から5年を経過しており、この間に

Table 7 Susceptibility testing performance indicators of participating laboratories classified by method and drug

Category	INH 0.2	INH 1.0	RFP	SM	EB
1% Ogawa standard (n=409)					
Sensitivity	0.882	0.909	0.857	0.657	0.5
Specificity	0.987	0.992	0.99	0.995	0.98
Efficiency	0.983	0.99	0.988	0.966	0.973
False resistant	0.012	0.007	0.01	0.005	0.022
False susceptible	0.005	0.002	0.002	0.029	0.007
Kappa coefficient	0.802	0.828	0.7	0.749	0.237
Welpack S (n=1,040)					
Sensitivity	0.796	0.857	0.917	0.774	0.818
Specificity	0.992	0.996	0.998	0.994	0.985
Efficiency	0.983	0.991	0.996	0.976	0.982
False resistant	0.008	0.004	0.002	0.006	0.019
False susceptible	0.01	0.005	0.002	0.018	0.001
Kappa coefficient	0.803	0.865	0.915	0.826	0.545
Bitspectre-SR (n=1,180)					
Sensitivity	0.839	0.825	0.88	0.713	0.655
Specificity	0.984	0.994	1.0	0.997	0.963
Efficiency	0.976	0.988	0.997	0.975	0.955
False resistant	0.015	0.006	0	0.003	0.038
False susceptible	0.008	0.006	0.003	0.023	0.006
Kappa coefficient	0.775	0.819	0.935	0.804	0.377
MGIT (n=264)					
Sensitivity	1.0		0.933	0.875	0.917
Specificity	0.979		0.979	0.996	0.996
Efficiency	0.981		0.989	0.97	0.992
False resistant	0.019		0.008	0.019	0.008
False susceptible	0		0.004	0.011	0
Kappa coefficient	0.888		0.897	0.823	0.905

Table 8 Classification of participating laboratories for major methods by efficiency of drug susceptibility results

	No. of laboratories with efficiency (%) of			
	95≤	90-95	80-90	80>
INH				
Ogawa	10	0	1	0
Bitspectre-SR	38	5	1	2
Welpack S	18	4	0	0
MGIT	4	0	0	0
RFP				
Ogawa	0	1	0	0
Bitspectre-SR	44	0	2	0
Welpack S	22	0	0	0
MGIT	4	0	0	0

導入された MGIT 等の液体培養システムの利用拡大や、比率法への薬剤感受性試験法の変更など、精度保証が重要となる検査法の変更・進歩が多くみられている。また、1997 年療研調査の際にも同様の解析が行われており、精度の変化が評価されうる状況である²¹⁾。

培養検査法についてみると、今回の調査では約半数の施設により、およそ 3 分の 2 の検体が MGIT 等の液体培

地にて培養されていた。日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会は分離培養時に固形培地と液体培地の併用を勧めているが²²⁾、今回の調査では上記検体の約半数が固形・液体培地の併用によるものであった。これは全体の約 3 分の 1 の検体（施設）で併用分離培養を実施していることになるが、液体培養のみでは Table 1 に示した 0.6% の結核菌と非結核性抗酸菌の混合感染が見落とされる可能

性が考えられた。また、一般に非結核性抗酸菌は結核菌よりも早く発育する場合が多いことから、検体中の菌量に大きな差がある場合には核酸増幅法などの検出・同定法で結核菌が見過ごされる可能性も考えられた。逆に非結核性抗酸菌の存在を見落とすことによって、薬剤感受性試験で偽耐性となる可能性もあり、現在液体培地のみで分離培養を実施している施設については、固形培地の併用が勧められる結果であった。

菌種同定検査に関して、今回の研究対象では全体の90%以上の株が免疫学的あるいは遺伝子相同性を基礎とする方法によって同定されており、ナイアシンテストを含む生化学的方法により同定を行っていたのは約5%にすぎなかった。これは1997年調査時に比べて生化学同定法を実施している施設が著しく減少したことを示しており²¹⁾、新結核検査指針が勧める核酸の相同性を利用したキットの利用が進んでいることを示していた。これは同時に、手間と時間がかかる生化学同定法が忌避されている現状をも反映していると思われた。著者の一人である御手洗らの調査によると、現在抗酸菌検査を実施している病院施設の約70%は検査の一部を外注としており、同定検査を実施している施設は約半数である。外注先である検査センターでは75%以上でナイアシンテストを実施していると報告されており²³⁾、病院のみではなく検査センターでも核酸ベースの同定法を普及させる必要があると考えられた。

また、今回検討された菌株について、先に述べたように0.6%に菌種同定結果の差異が認められた。各施設で結核菌群と同定され、結核研究所にて非結核性抗酸菌と診断した7株について、各施設での同定法は基本的に遺伝子あるいは免疫学的手法によるものであったが、原因として、結核菌と非結核性抗酸菌の混在、継代時の汚染等が考えられた。

薬剤感受性試験に利用されていた方法は、検体数で見るとビットスペクトル-SRとウエルバックSがそれぞれ約3分の1ずつであり、他の方法(1%小川標準法、MGIT, BrothMIC MTB-I等)が3分の1であった。1997年の報告と比較すると、ウエルバックSの利用が増加し、ビットスペクトル-SRと小川標準法の利用が減少している²¹⁾。新しい方法であるMGITを利用した薬剤感受性試験は4施設のみで実施されていたが、方法ごとの検体数を実施施設数で除してみるとMGITが66で最も多く、検査検体の多い施設では既にMGITが培養のみならず薬剤感受性試験にも利用されていることが示された。米国CDC (Center for Disease Control and Prevention) は結核菌の薬剤感受性試験結果を検体受領後30日以内に報告するよう勧告しているが²⁴⁾、この勧告に沿うためには液体培地等を利用した迅速な感受性試験法が必須であり、今

後MGITを使った薬剤感受性試験は増加することが考えられた。

INH, RFP, SM, EBの各薬剤について感受性試験の精度を検討したところ、耐性の判定に関する感度はそれぞれ84.5%, 90.3%, 74.0%および77.2%であり、感受性特異度は同様にそれぞれ98.7%, 99.7%, 99.4%, 97.3%となった(INHについては0.2 $\mu\text{g/ml}$ 標準濃度での判定)。WHOがSupranational Reference Laboratory Network内での精度管理のため毎年実施している薬剤感受性試験のパネルテストでは一致率について90%以上であることを目標としている^{25), 26)}。しかしながら、これはパネル内に含まれる耐性菌の頻度が50%程度あるため可能な条件であり、そのまま今回の結果に当てはめて判断することはできない。今回の研究対象となった結核菌株での耐性率は、全体でもSMの7.9%が最大頻度である。各薬剤に対する耐性菌の実数は57~246にすぎなかった。従って耐性菌を誤って感受性とする(偽感受性)誤りよりも、感受性菌を耐性と誤る(偽耐性)場合のほうがはるかに重い影響がある。さらに、一致率は感度、特異度(あるいは偽耐性・偽感受性)そのもののほかに、それらを観察する際の偶然の変動にも左右されることを考えなければならない。特に本研究のように真の頻度が小さい標本を扱っている場合には一致率は一様に高くなる。そこで、判定の一致率を評価する目的で今回 κ 指数を導入・算出した。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らによると $0 \leq \kappa \leq 0.2$ はごく軽度の一致、 $0.2 < \kappa \leq 0.4$ は軽度の一致、 $0.4 < \kappa \leq 0.6$ は中等度の一致、 $0.6 < \kappa \leq 0.8$ は高度の一致、 $\kappa > 0.8$ はほぼ完全な一致とされる²⁷⁾。これによるとSMでも κ 指数は0.806となり、ほぼ十分な一致を示していた。一方、感度ではSMより高い値を示していたEBで κ 指数0.47と低値であり、EBで判定の差異が大きいことが示され、EBに関する薬剤感受性試験の困難性を反映していると思われた。また、EBの感受性試験結果の差異の原因は、ほとんどの場合偽耐性(過大評価)であり、偽感受性のおよそ7倍であった。この傾向は外部精度評価パネルテストでも観察されている^{28), 29)}。過大評価に関連して、例えばマイクロタイター法では培地量が少なく接種菌量が多いことから、判定最適日を越えて判定した場合に、薬剤の種類によっては感受性菌を耐性と判定する傾向があることが報告されている³⁰⁾。今回もマイクロタイター法において一致率が低い傾向は認められたが、日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会の外部精度評価研究報告ではEBでのキットによる明らかな薬剤感受性試験結果の差異は認めていない²⁹⁾。日常実施された検査の結果と、テストであることが明確な外部精度評価

パネルテストの結果を同列に評価することはできないが、やはり原因の一部に実施者の手技に関する問題があることが推定される。また SM については逆の事象が観察されており、偽感受性株が偽耐性株の 4 倍以上認められている(過小評価)。これもパネルテストで観察されており、ビットスペクトル-SR でウエルバック S や MGIT に対して結果の相違が多く認められることが示されている²⁹⁾。

感受性試験方法別に結果を解析したところ、INH についてはいずれの方法でも検査精度は良好と考えられた。RFP に関して、ウエルバック S、ビットスペクトル-SR、MGIT による結果については問題ないものの、小川標準法を実施している施設で κ 指数が低い傾向であった。RFP での偽耐性は 4 株あったが、このうち 3 株は 1 施設に集中しており、他のほとんどの施設は良好な検査精度を示していた。RFP におけるこのような差異は、精度改善活動の実施を考慮すべき対象であり、外部精度評価の実施が精度保証に重要であることを示していると思われる。EB の検査精度は固形培地ではどれもほぼ同じであったが、液体培地 (MGIT) のみすべての薬剤について κ 指数 0.8 以上を示しており、基本的に自動化されているシステムの利点を示しているものと考えられた。また、MGIT を使用している施設は多くの検体を取り扱っており、検査経験の多さからくる技術の安定も重要な因子であると思われる。

微生物検査は一般に精度の維持管理が困難な臨床検査である。結核菌を含む抗酸菌は、その性質・感染形態等の臨床細菌学的特殊性から検査が困難である。しかしその一方の結核対策、結核診療において細菌学的所見はますます重要な意義をもってきており、その誤謬による損失は、医療費の損失はもとより、多剤耐性の増加、患者の生活の質や生命の損失といった深刻な影響を含む。森は結核診療における細菌学検査における誤差が引き起こしていると考えられる損失をモデル計算しており、それによれば最終的に日本全体で毎年 30 億円程度の医療費(結核総医療費の 3% 程度)が浪費されとしている³¹⁾。精度保証の概念は新しいものではないが、実際には細菌学的検査に関してはほとんど実施されていないのが現状であり、今回の研究で示された問題点について、今後内部精度管理・外部精度評価を通じて改善を図る必要がある。

共同研究者および参加施設

柏木秀雄(恩賜財団済生会明和病院)、田口貞一郎(愛媛県立新居浜病院)、上田暢男(愛媛県立中央病院)、豊田国彦(愛北病院)、沖本二郎(医学振興財団川崎病院)、廣田暢雄(医療法人西福岡病院)、大河内稔(横須賀共済

病院)、武内健一(岩手県立中央病院)、野田進士(久留米大学病院)、長尾大志(京阪奈病院)、濱本康平(京都市立病院呼吸器科)、中積泰人(金沢市立病院)、中西洋一(九州大学医学部附属病院)、長谷川直樹(慶應義塾大学病院)、長田 功(結核予防会新山手病院)、樋口武史(結核予防会大阪病院)、尾形英雄(結核予防会複十字病院)、堀江史朗(健康保険岡谷塩嶺病院)、奥野元保(県立愛知病院)、塩田雄太郎(呉共済病院)、近藤康博(公立陶生病院)、町田健一(高知県立安芸病院)、永利憲一(国民健康保険八代市立病院)、西野伸夫(国民健康保険野上厚生総合病院)、豊田恵美子(国立国際医療センター)、荒谷義和(国立函館病院)、阿久津弘(国立療養所愛媛病院)、久場睦夫(国立療養所沖縄病院)、座安清(国立療養所宮城病院)、坂谷光則(国立療養所近畿中央病院)、鳥津和泰(国立療養所熊本南病院)、重藤えり子(国立療養所広島病院)、大西隆行(国立療養所高松病院)、杉本峯晴(国立療養所再春荘病院)、鎌田有珠(国立療養所札幌南病院)、藤井俊司(国立療養所山形病院)、竹山博泰(国立療養所山陽病院)、矢野修一(国立療養所松江病院)、藤野忠彦(国立療養所神奈川病院)、斎藤武文(国立療養所晴嵐荘病院)、渡辺覚(国立療養所西群馬病院)、高原 誠(国立療養所西甲府病院)、土屋俊晶(国立療養所西新潟中央病院)、狩野孝之(国立療養所西鳥取病院)、田村猛夏(国立療養所西奈良病院)、瀧川修一(国立療養所西別府病院)、山岸文雄(国立療養所千葉東病院)、川上健司(国立療養所川棚病院)、原田泰子(国立療養所大牟田病院)、白井正浩(国立療養所天竜病院)、岡田和久(国立療養所東宇都宮病院)、町田和子(国立療養所東京病院)、小江俊行(国立療養所東佐賀病院)、川城丈夫(国立療養所東埼玉病院)、森 健一(国立療養所東徳島病院)、田野正夫(国立療養所東名古屋病院)、山崎泰宏(国立療養所道北病院)、河田兼光(国立療養所南横浜病院)、多田敦彦(国立療養所南岡山病院)、溝口亮(国立療養所南九州病院)、野上裕子(国立療養所南福岡病院)、大場泰良(国立療養所富山病院)、田尾義昭(国立療養所福岡東病院)、藤川佳永(国立療養所兵庫中央病院)、小長谷正明(国立療養所鈴鹿病院)、駿田直俊(国立療養所和歌山病院)、渡部直己(砂川市立病院)、神尾政彦(財団法人鹿島病院)、渡辺雅子(財団法人太田総合病院附属太田西ノ内病院)、本間光信(市立秋田総合病院)、清水大介(市立福知山市民病院)、上野和人(鹿児島県立薩南病院)、久島サチ子(織本病院)、綿貫祐司(神奈川県立循環器呼吸器病センター)、石原啓男(清瀬上宮病院)、高岡 真(聖心会高岡病院)、中村美加栄(聖隷三方原病院)、岩崎博信(西神戸医療センター)、蝦名昭男(青森県立中央病院)、本多淳郎(静岡県立総合病院)、三木 誠(仙台赤十字病院)、小橋吉博(川崎医科

大学附属病院), 谷 源一 (足利赤十字病院), 高嶋哲也 (大阪府立羽曳野病院), 吉川公章 (大同病院), 河村孝彦 (中部労災病院), 須山尚史 (長崎市立病院成人病センター), 河野 茂 (長崎大学医学部附属病院), 市川元司 (土岐市立総合病院呼吸器内科), 石井慎一 (東京慈恵会医科大学附属第三病院), 近藤信哉 (東京都立清瀬小児病院), 藤田 明 (東京都立府中病院), 石井久雄 (福岡県立遠賀病院), 高木陽一 (福岡県立嘉穂病院), 棟方充 (福島県立医科大学医学部附属病院), 木村啓二 (平鹿総合病院), 岸不盡彌 (北海道社会保険病院), 池田東彦 (北九州市立門司病院), 木村清延 (労働福祉事業団岩見沢労災病院)

お断り: 研究協力施設に関して, 旧国立療養所は現在多くの施設が独立行政法人国立病院機構へと改組されていますが, それに伴って施設が閉鎖・統合されている場合があります, 共同研究者も異動している場合があるため, 今回は研究実施当時の所属で記載させて頂きました。

謝 辞

この研究は, 結核予防会結核研究所細菌検査科および同研究部 (大友幸二, 平野和重, 御手洗聡, および佐藤奈津江, 和田雅子) を中心に実施された。また, 前結核予防会結核研究所基礎研究部長・阿部千代治先生にご指導頂いた。

この研究は, 厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業研究平成14年度「再興感染症としての結核対策確立のための研究」(主任研究者・森 亨), ならびに同平成15~17年度「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」(同)の研究課題の一部として研究費の補助を受けて実施された。

文 献

- 1) World Health Organization: Global Tuberculosis Control, WHO Report 2005. 2005.
- 2) World Health Organization: Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/CDS/TB/2003. 320, Geneva, 2003.
- 3) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時における結核菌薬剤耐性に関する研究. 日本医事新報. 1960; 1900: 3-10.
- 4) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時における結核菌薬剤耐性に関する研究, 昭和34年調査成績ならびに昭和32年との比較. 日本医事新報. 1962; 1979: 3-10.
- 5) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時における結核菌薬剤耐性に関する研究. 昭和36年調査成績ならびに昭和32・34年の調査成績との比較. 日本医事新報. 1963; 2064: 9-26.
- 6) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時における薬剤耐性, 昭和38年と32年, 34年, 36年との比較. 日本医事新報. 1967; 2247: 49-57.
- 7) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時における薬剤耐性, 昭和41年の調査成績と昭和32年, 昭和34年, 昭和38年との比較. 日本医事新報. 1969; 2355: 3-8.
- 8) Tuberculosis Research Committee (Ryoken): Primary drug resistance to the anti-tuberculosis drugs in Japan. *Tubercle Lond.* 1970; 51: 152-171.
- 9) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時における薬剤耐性, 第1編. 1972年の調査成績と前6回の成績の比較. 結核. 1975; 50: 1-8.
- 10) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時における薬剤耐性, 第2編. 耐性の頻度に関連する因子について. 結核. 1975; 50: 55-62.
- 11) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時における薬剤耐性, 第1編. 1977年の調査成績と前7回の成績の比較. 結核. 1979; 54: 515-522.
- 12) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時における薬剤耐性, 第2編. 耐性の頻度に関連する因子について. 結核. 1979; 54: 549-555.
- 13) 結核療法研究協議会: 肺結核患者の入院時薬剤耐性に関する研究, 第1編. 1982年の現地調査成績と25年間の推移. 結核. 1991; 66: 367-373.
- 14) Hirano K, Kazumi Y, Abe C, et al.: Resistance to anti-tuberculosis drugs in Japan. *Tuber Lung Dis.* 1996; 77: 130-135.
- 15) 鹿住祐子, 平野和重, 阿部千代治, 他: 入院時薬剤耐性に関する研究: 1992年度の各施設の成績と結研判定の比較. 結核. 1996; 71: 267-276.
- 16) 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.
- 17) 日本結核病学会抗酸菌検査検討委員会: 新結核菌検査指針: 第7章 薬剤感受性試験. 結核予防会. 2000.
- 18) 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.
- 19) Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA): Available from: URL: <http://www.cms.hhs.gov/CLIA/>
- 20) Aziz MA, Ba F, Becx-Bleumink M, et al.: External quality assessment for AFB smear microscopy. Association for public health laboratories, 2002. 1-111.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 767-770.

- 25) Laszlo A, Rahman M, Raviglione M, et al.: Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round of proficiency testing. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1997 ; 1 : 231-238.
- 26) 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.
- 27) Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977 ; 33 : 159-177.
- 28) 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.
- 29) 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評価. *結核*. 2006 ; 81 : 501-509.
- 30) 正木孝幸, 梅橋豊蔵: 抗酸菌検査に関する検討, 第1報. 市販抗酸菌感受性培地の比較検討. *医学検査*. 1991 ; 40 : 1087-1090.
- 31) 森 亨: 新たな結核対策の技術と展望. *結核*. 2004 ; 79 : 587-604.

Original Article

ANTI-TUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE SURVEY IN JAPAN, 2002 :
EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT OF RESULTS

Tuberculosis Research Committee (RYOKEN)

Abstract [Objective] A nationwide anti-tuberculosis drug resistance survey for *Mycobacterium tuberculosis* was conducted by the Tuberculosis Research Committee (Ryoken) in Japan, 2002, to clarify the recent trend of drug resistant *M. tuberculosis*. The drug susceptibility testing (DST) results by participating laboratories were compared with the test results by the reference laboratory, in order to evaluate the quality of DST by the participating laboratories.

[Method] *Mycobacterium* strains were collected from patients who were admitted to the 99 participating hospitals between June and November in 2002. For each isolate, DST was performed at participating facilities and also at the reference laboratory (Research Institute of Tuberculosis: RIT) for four first-line anti-tuberculosis drugs, i.e., isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM) and ethambutol (EB). Each participating laboratory performed the DST with its routine method. The DST method for *M. tuberculosis* performed at the reference laboratory was the simplified proportion method on the standard 1% Ogawa medium as described in the national guidelines, and the results were regarded as the judicial ones. The DST results of each isolate from the participating laboratories were compared with the judicial results from the reference laboratory. The accuracy of DST done by the participating laboratories was evaluated in terms of the following indices; sensitivity for detecting drug resistant strains, the specificity for susceptible strain, the overall agreement, and kappa coefficient were calculated to evaluate the performance of local laboratories.

[Results] A total of 3,122 *M. tuberculosis* strains were obtained out of 4,134 mycobacterial strains collected from the participating facilities. Fifty, 23 and 17 local laboratories used Bitspectre-SR (Kyokuto pharmaceuticals), Welpack S (Nichibi) and Ogawa media for DST, respectively. MGIT (Becton Dickinson) and BrothMIC MTB-I (Kyokuto pharmaceuticals) were used in four laboratories each. The sensitivity,

specificity, efficiency and kappa coefficient for INH were 84.5%, 98.7%, 98.0%, and 0.798, respectively. Similarly for RFP, they were 90.3%, 99.7%, 99.5%, and 0.894, respectively. False susceptible results were frequently observed (2.1%) for SM compared with false resistance (0.5%), whereas the efficiency of SM was 97.4%. Similarly for EB, false resistances were frequently observed (2.6%) compared with false susceptibles (0.4%), whereas the efficiency of EB was 96.9%. The kappa coefficient for EB (0.470) was obviously lower than the others. The DST results with Ogawa method at local laboratories showed significantly lower sensitivity than those with Welpack S and MGIT.

[Discussion] The DST methods used at local laboratories were still mainly microtitre methods with egg-based solid media, but the number of laboratories using liquid DST methods increased in 2002 compared to 1997. The overall specificity and efficiency of DST for each anti-tuberculosis drug was over 95%, but the sensitivity was below 90.3%. Because of the frequency of drug resistance (up to 7.9% for SM in 2002), the efficiency and specificity may not be useful indicators for the quality assessment. The kappa coefficient for the agreement between local and reference laboratories' DST was clearly low in the case of EB, except for the laboratories using MGIT where kappa coefficient was higher than 0.8. The quality improvement of DST for EB could be achieved through the standardisation and automatisations.

Key words: Ryoken, Tuberculosis, Drug susceptibility testing, External quality assessment

Correspondence to: Koji Otomo, 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: otomo@jata.or.jp)