

## 三種病原体等に相当する結核菌（超多剤耐性結核菌）の 同定検査に関する外部精度評価

<sup>1</sup>御手洗 聡   <sup>1</sup>山田 博之   <sup>1</sup>青野 昭男   <sup>1</sup>近松 絹代  
<sup>2</sup>樋口 武史   <sup>1</sup>五十嵐ゆり子   <sup>1</sup>高木 明子

**要旨：**〔目的〕2015年5月に世界保健機関の提唱する extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (XDR-TB) の定義に準じて三種病原体等相当結核菌の定義が変更された。当該菌の同定精度を評価するため、関連する薬剤の感受性試験について外部精度評価を実施した。〔方法〕耐性既知の結核菌10株を使用した。対象薬剤は isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM), ethambutol (EB), levofloxacin (LVFX) および kanamycin (KM) とした。研究参加各施設の通常の試験方法によって薬剤感受性試験を実施し、結果を基準判定と比較し、薬剤ごとの感度、特異度、判定一致率、 $\kappa$  指数を算出した。また、 multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) および XDR-TB の同定精度を評価した。〔結果〕病院検査室67, 検査センター16, 地方衛生研究所5の計88施設で実施した。2施設が複数の結果を提出したため、解析対象数を計90とした。INH, RFP および LVFX での基準判定との一致率は全株で95%を超えていたが、SM, EB および KM で2株ずつ一致率95%未満の株が認められた。特に SM では株1と株2で一致率がそれぞれ72.2%と71.1%であった。この現象は特定の試験キットに集中していた。INH および RFP の感度と特異度が95%以上であることを条件とした場合の MDR-TB 同定精度は92.2% (83/90) であったが、LVFX と KM に同じ基準を適用した場合、XDR-TB の同定精度は79.7% (63/79) であった。〔考察〕XDR-TB の同定精度は十分とは言えない状況であり、患者管理および特定病原体管理の精度向上のためにも、国は適正な外部精度評価および是正活動を実施しなければならないと考えられた。

**キーワード：**結核菌, 薬剤感受性試験, 外部精度評価, 超多剤耐性結核菌

### はじめに

2007年に施行された感染症法では、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は四種病原体等に分類された。ただし、isoniazid (INH) と rifampicin (RFP) の両方に耐性を有するいわゆる多剤耐性結核菌 (multidrug-resistant *M. tuberculosis*: MDR-TB) は、治療困難であることを理由に三種病原体等としてより厳しい規制の対象となった<sup>1)</sup>。その後、新しい治療薬を含む MDR-TB 治療法の改善に伴い、2015年5月に感染症法が改正され、三種病原体等に相当する結核菌の定義が変更となった。新しい定義では、INH, RFP その他政令 (令第1条の4) で定めるもの

[ofloxacin (OFLX), gatifloxacin (GTFX), ciprofloxacin (CPF), sparfloxacin (SPFX), moxifloxacin (MFLX) または levofloxacin (LVFX) のいずれかに耐性、かつ、amikacin (AMK), kanamycin (KM), capreomycin (CPM) の3種類の薬剤のうち1種以上] に耐性を有する結核菌が三種病原体等となった<sup>2)</sup>。さらに同定方法については、日本結核病学会の指針が示す試験方法または米国の CLSI (臨床および検査室基準設定機構) が示す試験方法による薬剤感受性試験において行うものとされた。

しかしながら、日本においては CLSI M24-A2 の基準に合致する薬剤感受性試験法は MGIT AST (日本ベクトン・ディッキンソン) しかないため<sup>3)</sup>、薬剤感受性試験

<sup>1</sup>公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部, <sup>2</sup>国立大学機構京都大学医学部附属病院検査部

連絡先: 御手洗聡, 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部, 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: mitarai@jata.or.jp)

(Received 30 Jun. 2016/Accepted 22 Aug. 2016)

を実施可能な薬剤がINH, RFP, streptomycin (SM), ethambutol (EB) およびpyrazinamide (PZA)に限定される。このため、新しい三種病原体等に相当する結核菌を同定するためには、基本的に日本結核病学会の指針が示す方法に拠ることとなるが、この指針（「新結核菌検査指針2007」あるいは「抗酸菌検査ガイド2016」）では、新しい三種病原体等相当結核菌の定義に含まれる薬剤のうち、ニューキノロンではLVFXのみ、注射剤（アミノグリコシドおよび環状ペプチド）ではKMの感受性試験法しか示されていない<sup>4)5)</sup>。従って、実践的にはINH, RFP, LVFXおよびKMの耐性をもって三種病原体等を同定することとなる。いずれにしても、三種病原体等に相当する結核菌の同定のため、新たに2種の薬剤の感受性試験が必要になった。

一方、結核菌の薬剤感受性試験の精度については、過去の一時期に日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会が外部精度評価を実施していた。2015年の同委員会の報告によると、基準判定が耐性とされている株を正しく耐性と判定した割合を感度、同様に基準判定が感受性とされている株を正しく感受性と判定した割合を特異度とした場合、2004年から2010年までに7回実施した外部精度評価の結果はINH, RFP, SM, EBのそれぞれについて感度が0.998 (95% CI 0.996-0.999), 0.981 (95% CI 0.976-0.986), 0.908 (95% CI 0.898-0.912) および0.959 (95% CI 0.951-0.966)であり、同様に特異度はそれぞれ0.994 (95% CI 0.990-0.996), 0.991 (95% CI 0.987-0.994), 0.972 (95% CI 0.965-0.977)および0.961 (95% CI 0.954-0.967)であったとしている。全ての薬剤について感度および特異度が100%（完全一致）であった施設は年度ごとに31.3%（2004年）、42.4%（2005年）、13.5%（2006年）、63.3%（2007年）、37.2%（2008年）、36.5%（2009年）および68.3%（2010年）であり、必ずしも高率とは言えない状況である。また、世界保健機関の示す合格基準である「INHおよびRFPの感度・特異度が95%以上であり、各薬剤の判定一致率が全て90%以上」を適用すると、2010年の合格率は84.2%と報告されている<sup>6)</sup>。

この状況でLVFXとKMの2薬剤を追加することは、新たに定義された三種病原体等の同定精度を低下させる可能性があり、結核登録者情報（患者サーベイランスデータ）の信頼性や患者管理に直接影響を及ぼす可能性がある。そのため、今回LVFXとKMを含む薬剤感受性試験の外部精度評価を実施し、特定病原体等の同定精度の評価を試みた。

## 方 法

### （1）研究参加要件

感染症法の要求する施設基準（四種病原体等取扱基

準）を満たしており、結核菌薬剤感受性試験を実施している施設全てを基本的に対象とした。参加は任意であり、事前に送付した外部精度評価実施プロトコルの内容について諾とした施設のみに試験用の検体を送付した。また、2011年まで日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会が実施していた薬剤感受性試験外部精度評価の一環あるいは継続と誤解されないよう、プロトコルに本研究が日本結核病学会の活動とは一切関係がないことを明記したうえで研究参加の意思を確認した。

### （2）被験検体（結核菌株）

耐性既知の四種病原体等相当結核菌10株を0.5 mlの液体培地中に懸濁した状態で各参加施設の担当者へ送付した。今回使用した結核菌株は世界保健機関のStop-TB departmentのひとつであるSupra-National Reference Laboratory Network (SRLN) で実施された薬剤感受性試験精度保証プログラムにおいて、基本的に複数の方法により施設間で80%以上の判定一致率を示した菌株であり、その一致した評価を感受性・耐性判定の基準とした。ただし、SMのみは2014年以降SRLNのプログラムに含まれていないため、結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科で複数の方法（比率法2種およびMinimum Inhibitory Concentration: MIC測定）で感受性試験を実施し、耐性あるいは感受性が方法間で一致した株を使用した。

各施設へ送付する菌株の中には、当然ながら薬剤耐性株を含むが、感染症法の規定により三種病原体等の運搬がきわめて困難であるため、被検菌に三種病原体等に相当する結核菌を使用しないことをプロトコル上明確化した。しかしながら、MDR-TB（四種病原体等相当）を含めて他の薬剤耐性は存在するため、取り扱いには十分な注意を要することを明記した。なお、四種病原体等の輸送の規定に従い、全ての被験菌は国連容器を用いて三重包装とし、金属ケース（四次容器）に収めてゆうパックにて輸送した。輸送容器の数に限りがあったため、申し込み順に3回に分割し、2015年9～10月中に送付した。

### （3）試験薬剤

試験薬剤としては、結果の安定性を考慮してINH, RFP, SMおよびEBを必須とした。なお、LVFXとKMも対象薬剤として含めたが、MGIT ASTのみで参加する施設を考慮し、これら2種の薬剤の感受性試験の実施については各参加施設の判断により任意とした。

### （4）感受性試験方法

基本的に送付された被験菌を継代培養したうえで、参加各施設で日常実施している方法を用いて薬剤感受性試験を行うこととした。全ての工程を固形培地で実施する場合を考慮し、薬剤感受性試験結果の報告は基本的に被験菌受領から3カ月以内とした。

## (5) 結果の評価

それぞれの菌株の薬剤感受性試験結果は「耐性」あるいは「感受性」のいずれかとして判定して報告することとした。なお、報告用紙に記入する際は、感受性には Susceptible (S), 耐性には Resistant (R) を用いて表記することとした。ただし、MICを用いて検査を行っている施設については、Indeterminateと判定された場合はRかSかのどちらかに各施設にて判定することとした。なお、一つの施設が複数の方法について評価を希望した場合は、結果を別々の用紙に記載して報告を行い、それぞれ独立に評価を行った。

## (6) 結果の解析

各施設から送られた薬剤感受性試験結果については感度、特異度、判定一致率およびkappa ( $\kappa$ ) 指数を計算し評価した。ここで感度とは、前述のように基準判定が耐性とされている株を正しく耐性と判定した割合であり、特異度とは同様に基準判定が感受性とされている株を正しく感受性と判定した割合とした。判定一致率は耐性と感受性を合わせた基準判定との一致の割合とした。解析結果については個々の解析が終了した時点（結果報告直後）で各施設に個別に通知するほか、参加全施設の結果を総合した報告書を作成し送付した。総合報告書あるいは研究報告書では施設名を匿名化し、個々の施設が特定されないようにした。

データ入力にはMicrosoft Excel 2016 (Microsoft, Seattle, WA) を使用した。統計ソフトとしてJMP 12.1 (SAS institute Inc., CA) を使用した。検査キット間の比較にはStudent t検定を行い、95% confidence interval (95% CI) の計算にも Student t分布を使用した。p value < 0.05をもって統計的に有意と判断した。

## 結 果

## 〔参加施設と被験検体〕

病院検査室67施設（大学病院22と一般病院45）、衛生検査所（検査センター）16施設、地方衛生研究所5施設のうち88施設の参加を得た。各施設に10株の結核菌を送したが、全880株のうち3施設で3株が発育せず（各施設1株）、発育不良率は0.34%となった。発育しなかった株は施設ごとに異なっていた。Table 1にSRLN（2015年時点で世界中の結核検査室31施設で構成）での各菌株における一致率（判定基準の確からしさ）を示した。Table 1ではSMのみ数字が示されずNAとなっているが、これは前述のようにSRLNの精度保証プログラムにSMが2014年以降含まれていないためである。また、被験結核菌株のSRLNでの基準判定とMICをTable 2に示した。

2016年1月30日時点で全施設から回答を受領し、結果回収率は施設単位で100%（88/88）となった。各施設での検体の受領から結果報告までの日数は平均±標準偏差で63.2±20.9（range: 21–109）日であった。2施設（病院検査室1および衛生検査所1）が複数の方法で結果を送付していたため、結果数は90件となった。以下、90施設分のデータとして解析を進めた。

Table 3に被験株別の判定一致率の結果を示した。Table 2に示したように株1と株2のSMに対するMICはそれぞれ4  $\mu\text{g/ml}$ で感受性と考えられたが、判定一致率上は偽耐性（False resistance）が多く認められ、一致率はそれぞれ72.2%および71.1%であった。株1および株2のSMにおける結果を除いて、ほとんど全ての株で95%以上の施設間判定一致率を示した。

## 〔各薬剤における施設タイプ別試験精度〕

Table 4に施設タイプ別、薬剤別の結果を示した。施設カテゴリーは病院検査室、検査センターおよび地方衛生

**Table 1** Proportion of diagnostic agreement among Supra-National Reference Laboratory Network

Specimen ID	Proportion of agreement (%)					
	INH	RFP	SM	EB	LVFX	KM
1	100	100	NA	94.0	96.6	100
2	100	100	NA	90.0	96.6	100
3	100	97.0	NA	97.0	100	93.5
4	100	97.0	NA	100	96.6	100
5	100	97.0	NA	100	94.8	96.8
6	98.0	100	NA	94.0	96.6	100
7	98.0	98.0	NA	98.0	93.1	98.4
8	100	100	NA	98.3	100	100
9	98.3	100	NA	98.3	100	98.3
10	100	100	NA	100	100	100

ID: identification, NA: Not available, Agreement data was not available among Supra-National Reference Laboratory Network, because streptomycin was excluded from the programme since 2014. INH: isoniazid, RFP: rifampicin, SM: streptomycin, EB: ethambutol, LVFX: levofloxacin, KM: kanamycin

**Table 2** Judicial diagnosis and MIC for each strain

Specimen ID	INH		RFP		SM		EB		LVFX		KM	
	JUD	MIC	JUD	MIC	JUD	MIC	JUD	MIC	JUD	MIC	JUD	MIC
1	R	16	R	≥ 32	S	4	R	32	R	4	S	4
2	R	16	R	≥ 32	S	4	R	16	R	4	S	4
3	R	16	R	≥ 32	R	32	S	2	S	0.5	R	64
4	S	0.125	S	≤ 0.03	R	128	S	2	R	4	S	1
5	S	0.125	S	≤ 0.03	S	2	S	1	S	0.5	R	≥ 128
6	R	16	R	≥ 32	R	≥ 128	R	16	S	0.5	R	≥ 128
7	S	0.25	S	≤ 0.03	S	1	S	2	R	8	S	2
8	R	16	R	≥ 32	S	1	R	16	S	0.5	S	4
9	S	0.125	S	≤ 0.03	S	1	S	1	S	0.5	R	≥ 128
10	S	0.125	S	≤ 0.03	R	128	S	2	R	4	S	1

JUD: Judicial diagnosis, R: Resistant, S: Susceptible, MIC: Minimum Inhibitory Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ), measured by broth microdilution method (Middlebrook7H9 supplemented with OADC)

**Table 3** Diagnostic agreements among the participants (n=90) and SRLN judicial diagnoses

ID	INH		RFP		SM		EB		LVFX		KM	
	JUD	EFFI	JUD	EFFI	JUD*	EFFI	JUD	EFFI	JUD	EFFI	JUD	EFFI
1	R	0.978	R	0.978	S	0.722	R	0.978	R	1.000	S	0.975
2	R	0.989	R	0.989	S	0.711	R	0.989	R	1.000	S	0.987
3	R	0.989	R	0.989	R	0.956	S	0.922	S	1.000	R	1.000
4	S	0.989	S	0.989	R	1.000	S	0.978	R	1.000	S	1.000
5	S	1.000	S	0.989	S	1.000	S	0.967	S	1.000	R	0.911
6	R	1.000	R	1.000	R	1.000	R	1.000	S	1.000	R	1.000
7	S	0.989	S	0.967	S	0.978	S	0.956	R	1.000	S	0.987
8	R	0.978	R	1.000	S	0.989	R	0.978	S	0.975	S	1.000
9	S	0.978	S	0.989	S	0.978	S	0.944	S	1.000	R	0.899
10	S	1.000	S	0.989	R	1.000	S	0.989	R	1.000	S	1.000

ID: identification, R: Resistant, S: Susceptible, JUD: judicial diagnosis by Supra-National Reference Laboratory network (\*JUD of streptomycin was confirmed at the Research Institute of Tuberculosis.), EFFI: Efficiency (overall agreement of resistant and susceptible)

研究所とした。薬剤別にはINH (n=90)の感度, 特異度, 一致率,  $\kappa$  指数の平均 (平均±標準偏差) がそれぞれ 99.1±5.1%, 99.1±4.1%, 99.1±3.9%, 0.982±0.078であった。同様にRFP (n=90)では感度99.6±4.2%, 特異度98.4±9.2%, 一致率99.0±5.0%,  $\kappa$  指数0.980±0.100であり, SM (n=90)では感度98.9±5.2%, 特異度89.6±15.2%, 一致率93.3±9.0%,  $\kappa$  指数0.864±0.174であり, EB (n=90)では感度99.2±5.9%, 特異度95.9±12.6%, 一致率97.2±7.8%,  $\kappa$  指数0.942±0.141であった。

LVFXとKMの薬剤感受性試験実施は任意としたため, 最終的に79施設がデータを報告していた。1施設のみMGIT ASTでLVFXとKMの薬剤感受性試験を実施しており, 解析には含めたが, 1施設の結果なのでTableには示していない。LVFX (n=79)では感度100%, 特異度99.5±3.2%, 一致率99.7±1.6%,  $\kappa$  指数0.995±0.032であり, KM (n=79)では感度95.6±13.1%, 特異度99.2±4.5%, 一致率97.7±6.2%,  $\kappa$  指数0.952±0.136であった。INHでは偽感受性4例と偽耐性4例が, RFPでは偽感受性2例と偽耐性7例が認められたが判定齟齬率の差はなかった (p=0.181)。最もエラーが多かったのはSM

で, 偽感受性が4例に対して, 偽耐性が56例認められ, 判定齟齬率に明らかな有意差を認めた (p<0.001)。続いてEBにも同様の傾向があり, 偽感受性3例に対して偽耐性は22例であった (p=0.007)。LVFXでは偽感受性は認められず, 偽耐性が2例のみ認められた。基本的に施設間の検査精度の平均値に差はほとんど認められなかった。逆にKMでは偽感受性14例に対して, 偽耐性は4例であり, 判定齟齬に有意差が認められた (p=0.002)。〔各薬剤における検査キット別検査精度〕

Table 5に各施設で感受性試験に使用されていた4種の検査キットごとに, 薬剤別の精度を示した。MGIT ASTは12施設 (13.3%) で使用されており, 同様にWelpack S (日本ビーシー製造) は26施設 (28.9%) で, Bitspectre SR (極東製薬工業) は30施設 (33.3%) で使用されていた。また, BrothMIC MTB-I (極東製薬工業) は22施設 (24.4%) が使用していた。検査キット間での精度の差をStudent t検定で評価したところ, Table 5のAppendixに示したような結果となった。INHでは, MGIT ASTの感度が他の検査キットに対して有意に低く (p<0.05), 特異度ではBitspectre SRとWelpack Sに対し

**Table 4** Sensitivity, specificity, efficiency and kappa coefficient of each drug tested categorized by institutional types

Indicator	Hospitals (n = 68)			Commercial laboratory (n = 17)			Public health laboratory (n = 5)			All (n = 90)*		
	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min
<b>INH</b>												
Sensitivity	0.988	1.000	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.991	1.000	0.600
Specificity	0.988	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.991	1.000	0.800
Efficiency	0.988	1.000	0.700	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.991	1.000	0.700
kappa*	0.976	1.000	0.400	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.982	1.000	0.400
<b>RFP</b>												
Sensitivity	0.994	1.000	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.996	1.000	0.600
Specificity	0.979	1.000	0.200	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.984	1.000	0.200
Efficiency	0.987	1.000	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000	0.600
kappa	0.973	1.000	0.200	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.980	1.000	0.200
<b>SM</b>												
Sensitivity	0.985	1.000	0.750	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.989	1.000	0.750
Specificity	0.918	1.000	0.500	0.814	1.000	0.667	0.867	1.000	0.667	0.896	1.000	0.500
Efficiency	0.945	1.000	0.700	0.888	1.000	0.800	0.920	1.000	0.800	0.933	1.000	0.700
kappa	0.888	1.000	0.444	0.778	1.000	0.615	0.839	1.000	0.615	0.864	1.000	0.444
<b>EB</b>												
Sensitivity	0.989	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.992	1.000	0.500
Specificity	0.953	1.000	0.000	0.980	1.000	0.833	0.967	1.000	0.833	0.959	1.000	0.000
Efficiency	0.968	1.000	0.400	0.988	1.000	0.900	0.980	1.000	0.900	0.972	1.000	0.400
kappa	0.933	1.000	0.000	0.976	1.000	0.800	0.959	1.000	0.800	0.942	1.000	0.000
<b>LVFX</b>												
Sensitivity	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Specificity	0.996	1.000	0.800	0.988	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	0.995	1.000	0.800
Efficiency	0.998	1.000	0.900	0.994	1.000	0.900	1.000	1.000	1.000	0.997	1.000	0.900
kappa	0.996	1.000	0.800	0.988	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	0.995	1.000	0.800
<b>KM</b>												
Sensitivity	0.947	1.000	0.500	0.971	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000	0.956	1.000	0.500
Specificity	0.997	1.000	0.833	0.971	1.000	0.667	1.000	1.000	1.000	0.992	1.000	0.667
Efficiency	0.977	1.000	0.800	0.971	1.000	0.700	1.000	1.000	1.000	0.977	1.000	0.700
kappa	0.952	1.000	0.545	0.939	1.000	0.348	1.000	1.000	1.000	0.952	1.000	0.348

\*n = 79 in LVFX and KM

てBrothMIC MTB-Iの精度が低かった ( $p < 0.05$ )。同様の精度差がRFPについても認められた。特にSMについては、Welpack Sの特異度と $\kappa$ 指数がそれぞれ71.8%および0.675と他の検査キットに比べて低い値であり、検定上もBrothMIC MTB-I, Bitspectre SR, MGIT ASTに対してWelpack Sの特異度,  $\kappa$ 指数ともに有意に低い結果となった ( $p < 0.0001$ )。

〔耐性結核菌同定精度に関する評価〕

今回対象とした6薬剤のうち、全ての薬剤の感受性試験を実施したのは79施設であり、11施設は必須とした4薬剤のみ実施していた。2施設が複数の結果 (BrothMIC MTB-IとWelpack S, Welpack SとMGIT AST)を提出していた。日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会が仮に設定している外部精度評価合格基準 (INHとRFPの感度・特異度が共に95%以上であり、全ての薬剤について一致率が90%以上)を基準とすると<sup>6)</sup>、6薬剤実施した施設の基準達成率は57.0% (45/79)であり、一方4薬剤のみ実施の施設では基準達成率は72.7% (8/11)であった。また、基準達成率の全体平均は58.9% (53/90)となっ

た。さらに実施した必須4薬剤で100%の一致率を示した施設は46施設 (51.1%: 46/90)であった。

新しい三種病原体等相当結核菌はいわゆる超多剤耐性結核菌 (XDR-TB)のカテゴリーとなるが、これを診断する場合、今回の対象薬剤ではINH, RFP, LVFXおよびKMについて全て正しい判定を行う必要がある。今回研究に参加した施設のうち、これらの薬剤の耐性あるいは感受性結果を正しく判定 (感度・特異度が95%以上)できたのは63施設 (79.7%)であった。一方、MDR-TBについては今回の研究で448株が試験されているが、444株 (99.1%)が正しくMDR-TBと判定されていた。感度・特異度が95%以上という基準で評価すると、83施設 (92.2%)で正しく判定しており、この点でのMDR-TBとXDR-TBの同定精度には有意差が認められた ( $p < 0.001$ )。

## 考 察

今回3年ぶり (以前の外部精度評価は日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会が実施していたので、それ以外では初めて)に結核菌の薬剤感受性試験外部精度評価を

Table 5 Sensitivity, specificity, efficiency and kappa coefficient of each drug susceptibility testing kit

Indicator	MGIT AST (n=12)		Welpack S (n=26)		Bitspectre SR (n=30)		BrothMIC MTB-I (n=22)		Appendix
	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI	
<b>INH</b>									
Sensitivity	0.950	0.947-0.953	1.000	-	1.000	-	0.991	0.990-0.992	wel, bit, bro > mgit, p<0.05
Specificity	0.983	0.982-0.985	1.000	-	1.000	-	0.973	0.971-0.974	bit, wel > bro, p<0.05
Efficiency	0.966	0.964-0.968	1.000	-	1.000	-	0.982	0.981-0.983	bit, wel > mgit, p<0.05
kappa*	0.932	0.928-0.936	1.000	-	1.000	-	0.964	0.962-0.965	bit, wel > mgit, p<0.05
<b>RFP</b>									
Sensitivity	0.967	0.964-0.969	1.000	-	1.000	-	1.000	-	wel, bit, bro > mgit, p<0.05
Specificity	0.979	0.977-0.981	1.000	-	1.000	-	0.945	0.943-0.948	bit, wel > bro, p<0.05
Efficiency	0.974	0.972-0.976	1.000	-	1.000	-	0.973	0.971-0.974	No significant difference
kappa	0.947	0.945-0.950	1.000	-	1.000	-	0.945	0.943-0.948	No significant difference
<b>SM</b>									
Sensitivity	0.979	0.977-0.981	1.000	-	0.975	0.974-0.976	1.000	-	No significant difference
Specificity	0.953	0.950-0.956	0.718	0.716-0.720	0.967	0.965-0.968	0.977	0.976-0.979	bro, bit mgit > wel, p<0.0001
Efficiency	0.965	0.963-0.967	0.831	0.829-0.832	0.970	0.969-0.971	0.986	0.985-0.987	bro, bit mgit > wel, p<0.0001
kappa	0.930	0.926-0.933	0.675	0.673-0.677	0.939	0.937-0.941	0.973	0.971-0.974	bro, bit mgit > wel, p<0.0001
<b>EB</b>									
Sensitivity	0.958	0.955-0.962	1.000	-	0.992	0.991-0.993	1.000	-	bro, wel > mgit, p<0.05
Specificity	0.983	0.982-0.985	0.987	0.986-0.988	0.956	0.954-0.957	0.917	0.913-0.92	No significant difference
Efficiency	0.974	0.972-0.976	0.992	0.991-0.993	0.970	0.969-0.971	0.950	0.948-0.952	No significant difference
kappa	0.944	0.941-0.947	0.985	0.983-0.986	0.940	0.939-0.942	0.909	0.906-0.913	No significant difference
<b>LVFX</b>									
Sensitivity	ND	-	1.000	-	1.000	-	1.000	-	No significant difference
Specificity	ND	-	0.992	0.991-0.993	0.993	0.992-0.994	1.000	-	No significant difference
Efficiency	ND	-	0.996	0.995-0.997	0.997	0.996-0.997	1.000	-	No significant difference
kappa	ND	-	0.992	0.991-0.993	0.993	0.992-0.994	1.000	-	No significant difference
<b>KM</b>									
Sensitivity	ND	-	1.000	-	0.992	0.991-0.993	0.864	0.860-0.867	bit, wel > bro, p<0.001
Specificity	ND	-	0.986	0.985-0.987	1.000	-	0.985	0.984-0.986	No significant difference
Efficiency	ND	-	0.992	0.991-0.993	0.997	0.996-0.997	0.936	0.935-0.938	bit, wel > bro, p<0.01
kappa	ND	-	0.984	0.982-0.985	0.993	0.992-0.994	0.859	0.855-0.862	bit, wel > bro, p<0.001

\*kappa: kappa coefficient, wel: Welpack S, bit: Bitspectre SR, bro: BrothMIC MTB-I, mgit: MGIT AST, ND: Not done (no data)

実施した。今回XDR-TB以外のMDR-TBが三種病原体等の指定から外れたことで、MDR-TBに関する盲験性を確保した結核菌株を使用することが可能となり、本来のパネルテストの性質を比較的確保することができた。

今回の参加施設の特徴は、大学病院の参加が多いことではないかと思われた。近年ISO15189など精度保証の公的認定が拡大しており、特に大学病院検査室ではISO取得の比率が高いことから、プロセス管理上の必須項目として利用された可能性があると考えられた。

今回のパネルテストでは、従来固形培地よりも耐性率が高いとされていたMGIT ASTのINH感受性試験結果で<sup>7)</sup>、MGIT ASTのほうが平均感度が低いという結果が得られた。一般的に考えると奇妙であるが、MGIT ASTと固形培地で齟齬が多く発生するのはMICが0.2-0.8  $\mu\text{g/ml}$ 程度の株であり<sup>8)</sup>、今回使用した株にはこれに相当する株は1株しか含まれていない。また、他の試験法を使用している施設ではINHで感度80%以下の施設がなかったことに比べて、MGIT ASTを使用した施設では感度60%と80%の施設（各1施設）が認められたことが平均値の低下に影響していた。今回の結果は、感受性試験実施上の技術的な困難性が結果に反映された可能性があるものと考えられた。

今回使用した10株は基本的にSRLNで80%以上の施設間一致率を示したものであったが、株1と株2のSMにおいて80%以下の一致率であった。SMのみはSRLN間でも一致率が低い傾向があったため2014年以降パネルテストから除外されており、今回の判定基準は結核研究所抗酸菌部で複数の方法の判定結果を総合して決定したものである。SRLN施設間で評価していれば除外対象だったのかもしれないが、特記すべき点として試験キット別の解析ではWelpack Sのみに有意な精度の低下が集中しており、他の試験キットは全て95%以上の特異度を示していた。このことから、今回のSMにおけるこれら2株の偽耐性エラーはこの試験キットの特性によることが考えられた。しかし過去の外部精度評価ではこの傾向は認められておらず<sup>6)</sup>、今回使用されたキットに特異的な現象と考えられた。

今回初めてLVFX以外の二次抗結核薬としてKMの精度評価を行った。これはXDR-TBを正確に診断するために必要な試験薬剤であり、BrothMIC MTB-Iの精度が他に比べてやや低いものの、全体としては十分な精度が保たれているものと考えられた。しかしながら、日本におけるKMの薬剤感受性試験はBrothMIC MTB-I以外では1%小川培地を使用して20  $\mu\text{g/ml}$ のCritical concentrationにより比率法で実施されている<sup>9)</sup>。一方、世界保健機関が定める標準的な薬剤感受性試験法の一つであるLöwenstein-Jensen培地を用いた比率法ではKMの濃度と

して30  $\mu\text{g/ml}$ が採用されており<sup>9)</sup>、この濃度差による差異が発生する可能性がある。しかし実際にはKMでは偽耐性4例に対して偽感受性が14例観察されており、期待された判定齟齬とは逆の関係で有意差が認められた ( $p = 0.002$ )。これらの偽感受性結果は主にBrothMIC MTB-Iの感度の低さ(86.4%)に起因しており、MICによるKMの耐性判定について再検討の必要性を示唆するものであった。

今回の薬剤感受性試験外部精度評価では79.7%の施設がINH, RFP, LVFXおよびKMについてそれぞれ正しい判定を行ったことから、これらの施設ではXDR-TBを正確に判定可能と考えられた。しかしながら、実際には三種病原体等相当の結核菌を同定するために必要な対象薬剤全てに耐性を有する結核菌(XDR-TB)を使用していないため、精度評価上の限界はあると考えられた。本来、外部精度評価は事前に耐性に関する情報を提供しない状況で実施すべきであるが<sup>10)</sup>、三種病原体等相当結核菌の大量(多施設同時)輸送が高額な輸送費や輸送者の能力不足(現在、三種病原体等相当結核菌を輸送可能な輸送業者は1社しかないが、同時に2カ所以上で輸送を実施することは設備の限界を越えることになる)のため、事実上不可能である。そのため、被験菌に三種病原体等に相当する結核菌を使用していないことをプロトコル上明確化していることもあり、研究参加者はXDR-TBが被験菌に含まれないことを事前に認識しており、この点で今回の外部精度評価が盲験であるとは言えない。この点は結果解釈上の限界として認識されるべきと考えられた。

感染症法における三種病原体等相当結核菌の定義変更を考慮し、同定に必要な薬剤を含む薬剤感受性試験外部精度評価を実施した。MDR-TBの同定精度が92.2%であったのに対し、INH, RFP, LVFXおよびKMの全ての薬剤に関する施設としての同定精度が79.7%であったことは三種病原体等相当結核菌の同定精度上の問題と考えられた。これは法律上定義されている特定病原体の同定精度としては必ずしも高いとは言えず、2016年4月から施行されている外部精度評価に関する法律との関連から考慮すれば<sup>11)</sup>、国は適正な精度保証活動を実施して特定病原体管理の実効性を担保すべきであると考えられる。

## 謝 辞

この研究は平成27年度日本医療研究開発機構研究費(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発研究事業)課題管理番号15fk0108017h0002(主任研究者:石川信克)の分担研究として実施された。

著者のCOI (Conflict of Interest) 開示: 本論文発表内

容に関して特になし。

## 文 献

- 1) 厚生労働省健康局長：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律等の一部を改正する法律等の施行について。健発第0601001号，平成19年6月1日。厚生労働省。2007。
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課長：三種病原体等である多剤耐性結核菌の取扱いについて。健感発0407第9号，平成27年4月7日。厚生労働省。2015。
- 3) Siddiqi SH, Libonati JP, Middlebrook G: Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1981 ; 13 : 908-912.
- 4) 小栗豊子：第7章 薬剤感受性試験，「新結核菌検査指針2007」。日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編，結核予防会，2007，98-121。
- 5) 御手洗聡：第11章 薬剤感受性試験（結核菌）。「抗酸菌検査ガイド2016」。日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編，南江堂，東京，2016，87-97。
- 6) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：日本における結核菌薬剤感受性試験外部精度評価の評価基準に関する解析。結核。2015 ; 90 : 481-490。
- 7) 御手洗聡，小林郁夫，阿部千代治，他：バクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討。結核。2007 ; 82 : 449-454。
- 8) Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, et al.: Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. J Clin Microbiol. 2008 ; 46 : 2263-2268.
- 9) Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2014.11. Geneva, World Health Organization. 2015.
- 10) Aziz MA, Ba F, Becx-Bleumink M, et al.: External quality assessment for AFB smear microscopy. Association for public health laboratories. 2002, 1-111.
- 11) 厚生労働省健康局長：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則の一部を改正する省令の公布及び一部施行について。健発0928第1号，平成27年9月28日。厚生労働省。2015。



## Original Article

EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT OF ANTI-TUBERCULOSIS  
DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING FOR DIAGNOSING  
EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*<sup>1</sup>Satoshi MITARAI, <sup>1</sup>Hiroyuki YAMADA, <sup>1</sup>Akio AONO, <sup>1</sup>Kinuyo CHIKAMATSU,<sup>2</sup>Takeshi HIGUCHI, <sup>1</sup>Yuriko IGARASHI, and <sup>1</sup>Akiko TAKAKI

**Abstract** [Objective] The infectious disease control law has been amended in May 2015, and the category definition of *Mycobacterium tuberculosis* as infectious pathogen has been changed, following the definition of extensively drug-resistant *M.tuberculosis* (XDR-TB) by World Health Organization. To assess the diagnostic capacity of XDR-TB, we conducted an external quality assessment (EQA) for the anti-tuberculosis drug susceptibility testing (DST).

[Method] A total of 10 *M.tuberculosis* strains with known drug susceptibility were sent to each participating laboratory. The drugs assessed were isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM), ethambutol (EB), levofloxacin (LVFX), and kanamycin (KM). DST was performed using each routine method(s), and the results were compared with the judicial diagnoses. The sensitivity, specificity, overall agreement (efficiency) and kappa coefficient were calculated for each drug tested. In addition, the diagnostic accuracy of multidrug-resistant *M.tuberculosis* (MDR-TB) and XDR-TB was assessed.

[Results] A total of 88 institutes including 67 hospitals, 16 commercial laboratories, and 5 public health laboratories participated in the EQA. With 2 laboratories submitting 2 sets of results, a total of 90 independent data sets were analyzed. As for INH, RFP and LVFX, the efficiency was over 95%, but we found two strains each for SM, EB and KM with the efficiency less than 95%. Especially, strain 1 and strain 2 showed efficiency of 72.2% and 71.1% to SM, respectively.

This error was mainly found in a certain test kit. If we consider the passing score as showing  $\geq 95\%$  sensitivity and specificity both to INH and RFP, the diagnostic accuracy of MDR-TB was 92.2% (83/90) in this study. With the same criteria to INH, RFP, LVFX and KM, that of XDR-TB was 79.7% (63/79).

[Discussion] The diagnostic capacity of XDR-TB was not sufficient in the current study. Good case management and pathogen control requires higher accuracy. The government may need to conduct a constant EQA and relevant remedial actions.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, Drug susceptibility testing, External quality assessment, Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

<sup>1</sup>Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, Kyoto University Hospital

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