

第84回総会シンポジウム

V. 結核感染診断の新技术と精度管理

座長 ¹樋口 武史 ²御手洗 聡

キーワード：クオンティフェロン，ISO15189，精度保証，精度管理，外部精度評価

シンポジスト：

1. QuantiFERON®TB-2/3Gの精度保証

樋口一恵（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部免疫検査科）

2. 抗酸菌培養の精度管理

日暮芳己（東京大学医学部附属病院感染制御部）

3. 分子生物学的検査の精度保証

長沢光章（東北大学病院診療技術部）

4. 結核菌薬剤感受性検査の精度保証

御手洗聡（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科）

結核の診断には2つの方向性がある。ひとつは結核菌の感染そのものを検出する技術であり、主に感染した結核菌に対する宿主側の免疫的反応を検出する。この検査法は、結核菌が直接検出できない未発症感染者やほとんど排菌していない軽度の結核患者において有効である。これに対して、ある程度の病期の進展により結核菌の排菌量が増加すると、直接的な細菌学的技術で結核菌を検出できるようになる。従って、現時点では、細菌学的検出技術は発病した病気としての結核感染症を診断していると考えてよい。

近年 Evidence Based Medicineの観点から、結核感染症診断における免疫学的あるいは細菌学的技術に対する精度上の要求が高くなっている。これらの検査結果は患者管理に直接影響することから、結核の社会的意義も併せて、十分な精度保証が必要であることは疑いない。医療全体をみても国際標準化機構（ISO）や日本医療機能評価機構の各種認定を取得する施設が増加傾向にあり、医療の質の向上、および精度保証に対する認識が高まって

いる。そこで本シンポジウムでは、新技术を含む結核（感染・発病）検査法の臨床的応用における精度保証を中心として、テーマとシンポジストを決定した。

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部免疫検査科の樋口一恵先生には、近年臨床応用が拡大し結核感染診断のスタンダードとなりつつある QuantiFERON TB-2Gの精度保証についてご講演いただいた。生きた細胞を用いた検査である QuantiFERON TB-2Gの精度を維持するには検体の採取から保存・輸送、実際のELISAに至るまで細かな注意が必要であり、それらについて詳述いただいた。また最近発売された QuantiFERON TB-3Gについても現状と今後の動向についてお話しいただいた。東京大学医学部附属病院感染制御部・細菌検査部門の日暮芳己先生には、いち早くISO15189を取得された経験から、抗酸菌培養の精度管理についてご紹介いただき、わが国の現状と問題点・課題についても言及していただいた。東北大学病院診療技術部の長沢光章先生には、分子生物学的検査の精度保証についてご講演いただいた。核酸増幅法を中心とする遺伝子検査は迅速・高感度であることから最近の結核診断技術の中核であり、臨床的意義が大きいことから、改めて精度保証の重要性を強調された。結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科の御手洗聡先生には、日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会がこれまで実施してきた薬剤感受性検査の外部精度評価活動の内容を中心にご講演いただいた。その中で定期的にリフレッシュトレーニングを実施することが精度の維持やバイオリスク軽減につながることを強調された。また薬剤感受性検査は治療効果を推定するために必須であり、世界的には迅速性を確保すべく

¹京都大学医学部附属病院検査部，²結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科

連絡先：御手洗聡，結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科，〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24
(E-mail: mitarai@jata.or.jp)
(Received 28 Dec. 2009)

遺伝子的感受性検査法である Line Probe Assay にシフトしている現状についてご紹介いただいた。今後、本シ

ンボジウムが結核菌検査における精度保証に対する意識の向上に寄与することを期待する。

1. QuantiFERON®TB-2/3G の精度保証

結核研究所抗酸菌レファレンス部免疫検査科 樋口 一恵

はじめに

結核菌特異抗原 ESAT-6 と CFP-10 を刺激抗原とし、全血を刺激後産生されるインターフェロン- γ (IFN- γ) 量を測定し結核感染を診断する方法クオンティフェロン® TB-2G (QFT-2G) は、使用する ESAT-6 と CFP-10 が BCG やほとんどの非結核性抗酸菌には存在しないため、従来のツベルクリン反応 (ツ反) と異なり BCG 接種やほとんどの非結核性抗酸菌感染の影響を受けない高特異度、かつ感度も高い検査法であり、多くの先進国で診断薬として使用されている。日本においても QFT-2G は診断薬としての認可を受け、また保険収載もされている。さらに、平成 19 年度改訂の接触者健診の新ガイドラインにおいて、QFT-2G 検査の最優先が推奨されるといったように急速に使用が広がっている¹⁾。このような状況の中、同一被験者について QFT-2G 検査結果が施設により乖離がある場合も見られることがあり、検査精度が非常に重要であることが指摘されるに至った。ここでは、われわれの行った QFT-2G 検査の精度管理の結果、および検査精度に影響を及ぼす因子、さらにはより簡便化されている次世代の QFT (クオンティフェロン®TB Gold, 以下 QFT-3G) について述べる。

精度保証と精度管理

QFT-2G は、生体内の状況・反応で産生された生体成分 (酵素、脂質、たんぱく、有機・無機化学物質等) を何らかの方法で測定する一般的な直接的臨床検査と異なり、生体内の状況を血液を用いて体外で再現・反応させ、産生されたインターフェロン-ガンマ (IFN- γ) を測定するという完全な *in vitro* ではなく、*ex vivo* と *in vitro* が組み合わされた間接的検査と捉えることができる。QFT-2G 検査は、第一段階である血液培養と第二段階である ELISA から構成される検査法であり、このような検査の特性上、検査結果に影響を及ぼす因子が多数存在する。現在 QFT-2G は、多くの検査センターや病院の検査室で使用されているが、当然のことながら血液検体の管理、および検査の技術的レベルが結果に影響する。実際、某検査センターが非濃厚接触者検診で非常に高い QFT-2G 陽性率を報告したため、同一検体を他の検査セ

ンターで再検査したところ、陽性率が低減したケースが幾つかある。こうした問題を解決するためには、中立的な施設が技術レベルの評価を行う必要がある。われわれは QFT-2G 検査の外部精度管理を目指したが、検査の第一段階である血液培養についての精度管理は、使用する血液が新鮮で、かつ多量に必要であるため現状では困難であると考えられる。そのためわれわれは、以下に示す方法により 2007 年に QFT-2G を使用している施設に対し ELISA 法についての精度管理を行った。

- ①現在 QFT-2G 検査を行っている施設に案内状を送付して精度管理検査に参加の意思を確認
- ②既知濃度の IFN- γ を含む標準血漿検体を調製
- ③精度管理試験に参加の意思表示をした施設に送付
- ④各検査施設で通常どおりに測定
- ⑤各施設より測定結果を返送
- ⑥標準偏差を計算し、 $SD \leq 2$ を Acceptable とした
- ⑦参加施設に回答

この方法で行った初回の精度管理では、119 施設 136 人に精度管理の案内状を出し、111 施設 128 人から返答があり、99 人が精度管理を受けた。その結果、2SD 以上の結果を含む今後継続して検査を実施することに問題があると考えられる Non-acceptable となった技術者が全体の約半数近くにも達することが明らかになった (Table 1)。2008 年に同様の方法で 2 回目の精度管理を行い、167 施設 203 人に精度管理の案内を出し、163 施設 195 人から返答があり、149 人が精度管理を受けた。結果は、初回と同様に Non-acceptable となった技術者が全体の約半数近くいたが、2 回の精度管理を継続して受けた者に関しては、1 回目と比較し Non-acceptable となった技術者数が大きく減少しており (Table 2)、精度管理を行った意義があったと考えられた。また、Non-acceptable となった施設の多くは基本的な操作ミスが目立ち、同時に QFT 検査を始める前にわれわれが開催している QFT-2G 検査手技の講習を受講していない施設に多く見られたことから、やはり QFT-2G 検査のガイドラインにあるように、初めてこの検査技術を導入するときには経験のある検査施設との比較対照を行うことが重要であると考えられる²⁾。

一方、使用する QFT-2G 検査キットのロットによる測

Table 1 Results of quality assurance for QFT-2G test

	The first quality assurance	The second quality assurance
Acceptable	53 (53.53%)	80 (53.69%)
Non-acceptable	46 (46.47%)	69 (46.31%)

Table 2 Quality assurance and improvement of quality

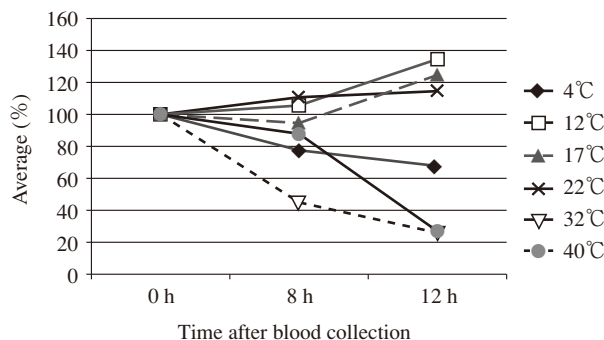
		The second quality assurance		
		A	NA	Total
The first quality assurance	A	51	3	54
	NA	21	15	36
	Total	72	18	90

A: acceptable NA: non-acceptable

定数値の変動が、精度管理を実施する際に問題となることが判明した。すなわち、QFT-2G検査キットのロット間の測定数値変動のため、同一検体について異なるロットを使用した際、異なった結果になる可能性がある。このため、標準検体の絶対数値が決められないことになり、過去2回行った外部精度管理試験結果は参考にとどめるべきであると考えられた。また、このようなロット間の測定数値変動による検査結果の乖離を防ぐためには、IFN- γ の絶対数値が明らかな標準検体を用い、各ロット間の違いを補正する必要があると考えられる。

検査精度に影響を及ぼす因子

われわれの行っている精度管理は、QFT-2G検査の第二段階で行うELISAの手技についてであるが、その他にも検査精度に大きな影響を及ぼす因子が血液培養の段階に存在する。その中でも特に、採血後の血液検体の保存時間と保存温度が検査結果に大きな影響を及ぼすと考えられる。QFT-2G検査に使用する血液検体は、採血後時間と共にIFN- γ 産生が低下するため、採血直後に抗原刺激をすることが望ましいが、遅くとも採血後12時間以内に抗原刺激を行うように規定されている。さらにこの点に関しては、従来の12時間以内より短時間を推奨する報告がされている³⁾。われわれもこの点を検討するため、QFT-2G陽性者10名から採血をして、採血から培養までの時間と保存・保管温度を変化させQFT-2G検査を行い、結果を比較検討した。Fig.に示すように22℃で保存された血液では、採血後12時間の抗原刺激開始でも採血直後のそれと比較し、結果への影響は少ないことが示された。一方、抗原刺激を採血後短時間で開始しても、保存温度、特に高温側での検体保存が結果に重大な影響を及ぼすことも明らかになったことから、血液検体の保存・搬送の際に温度管理がより厳密に行われるような体制が望まれる。

**Fig.** Change of IFN- γ production by storage time and temperature after blood collection

次世代のQFT検査

QFT-2Gでは前述のように、規定の時間と保存温度内での検体搬送が必須であるが、採血と血液培養を行う検査施設が離れている遠隔地ではQFT-2G検査の実施が困難な場合も多々あるのが実情である。このような検体搬送上の問題点を克服するものとして、次世代のQFT-3Gが期待される。QFT-3Gの大きな改善点は、採血後直ちに血液刺激が可能になっていることである。QFT-3Gでは対象者1人につき専用の1 ml/用採血管3本(陰性コントロール、陽性コントロール、抗原)がセットになっており、採血管内にあらかじめ刺激抗原が添加されている。このため、採血後十分混和しポータブル培養器に入れることにより、採血直後からの抗原刺激が可能となり検体搬送上の問題点は解決される。さらに、QFT-Gには結核菌特異抗原ESAT-6とCFP-10に加え、もう一つの結核菌特異抗原TB7.7が新たに加えられていることから、さらなる感度の向上が期待される。実際にわれわれの臨床試験の結果、QFT-3GはQFT-2Gよりも高感度で、かつ高特異度を維持していることが示されている⁴⁾。このようにQFT-3Gでは検体搬送がより簡便で、かつ高感度であるため、今後早急にQFT-3Gに移行するものと考えられる。しかし、QFT-3Gにおいても保存時間と保存温度の規定があるため、やはり正確な結果を出すためにこのような条件を厳密に管理する必要があると考えられる。また、QFT-3G検査キットにおいてもQFT-2Gで見られた検査キットのロット間の変動があるのか否か、今後早急に検討すべき点をもつ。

おわりに

QFT-2G/3Gは、従来のツ反に取って代わる結核感染診断法であり、特に接触者健診において活用されているが、当然のことながら結核対策上正確な検査結果を出すことが必須である。さらに今後QFT-3Gの導入によ

り、本検査はさらに広範に使用されることが予想される。しかし今回報告したように、われわれの行った検査精度管理の結果、QFT-2G検査を推奨できない施設数が少ないことから、このような施設におけるQFT-3Gを含めた精度の改善が急務であると考えられる。さらに、血液培養における変動因子も多く存在することから、今後第一段階である血液培養についても何らかの精度管理が望まれる。また、一方では検査キットのロット間の測定数値変動も検査結果に大きな影響を及ぼすため、IFN- γ の絶対数値が明らかな標準検体を同時測定し数値を補正する必要が考えられる。

文 献

- 1) 財団法人結核予防会：改正感染症法に基づく結核の接

触者健診の手引きとその解説. 結核予防会, 東京, 2007.

- 2) 日本結核病学会予防委員会：クオンティフェロン®TB-2Gの使用指針. 結核. 2006; 81: 393-397.
- 3) 福井基成, 川島宏一, 糸谷 涼, 他：結核菌感染診断用全血インターフェロン γ 測定検査の採血から培養開始までの時間と測定値の関係についての検討. 感染症誌. 2007; 81: 421-425.
- 4) Harada N, Higuchi K, Yoshiyama T, et al.: Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. J Infect. 2008; 56: 348-353.

2. 抗酸菌培養の精度管理

東京大学医学部附属病院感染制御部 日暮 芳己

抗酸菌分離培養検査の背景

平成19年4月より施行された感染症法は、結核菌（除多剤耐性結核）を四種病原体等、多剤耐性結核菌を三種病原体等と定め、医師は結核と診断後直ちに所轄の保健所長に届け出る義務がある。結核の診断は、結核菌の検出が重要であり、その検出法は、①抗酸菌塗抹検査、②分離培養検査、③同定検査、④核酸増幅法が挙げられ、医師の診察により結核と診断された患者である。

検出法のうち分離培養検査の結果は、“入院基準”“就業制限”“退院基準”に関与する項目で、塗抹検査や核酸増幅法検査に比べ、抗酸菌検査のなかで最も長い検査期間が必要であるが、検出感度の観点より、患者より採取された検査材料を用いる検査の最後の砦である。

分離培養検査で抗酸菌の発育を認めた際は、結核菌か否かの鑑別に加え、多剤耐性結核菌（Multidrug resistant TB; MDR-TB）、超多剤耐性結核（Extensively drug resistant TB; XDR-TB）の鑑別が必要である。

米国 Center for Disease Control and Prevention および結核検査指針2007では分離培養検査について「結核菌の分離と同定結果を21日以内に担当医に報告する」の項目が記載されている。

分離培養検査の結果を得るまでは時間を要することから、検査結果の正確性の保証が、患者ケアと感染対策に必須である。これらの関係性を保つためには、各ステップで十分な精度管理が必須である（Fig. 1）。なお本稿は、市販培地を購入・使用する場合を前提とする。

精度管理の対象

分離培養検査のステップは、培地・試薬類の受領、前処理、分離培養検査、分離菌の抗酸性を確認、臨床医への結果報告等の手順があり、それらを管理する必要がある。

（1）市販培地の精度管理

NCCLS ガイドライン Quality control for Commercially Prepared microbiological culture media; Approved standard—third edition (M22-A3) に詳細が記載されている。

M22-A3は、市販培地のサーベイの結果として、0.3～0.5%に何らかの問題が生じ、Lowenstein-Jensen 培地は0.037%と報告されている。このサーベイの結果から、何らかの問題が生じた製品が0.5%未満の場合はユーザー側の無菌試験や発育性能試験を免除すると記載されている。

自動培養システムに用いられる液体培地は、無菌試験や発育性能試験が実施された後に出荷されていることか

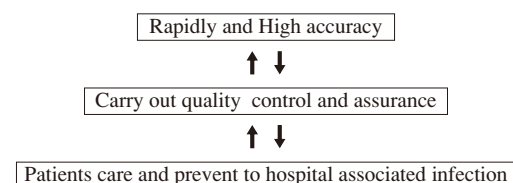


Fig. 1 Relevant to reported test results and quality control and assurance

ら、ユーザーによる前述の試験は免除される (Table)。

一方、わが国で製造される製品に関する詳細なデータはなく、精度管理上同様の基準の策定が望まれる。

(2) 培地・試薬類の受領

受領の際は、損傷、亀裂、培地の色や凝固水の量等の外観チェック、後に追跡する際のキーワードのひとつとなるよう受領日、ロット番号、使用期限を記録する。受領後は、培地・試薬の性能を低下させることのないよう保管庫の温度を日々記録し、管理する必要がある。

また、製造メーカーから出荷時に実施される“コンタミネーションの有無”“pH”“培地量”，ATCC株等の標準菌株を用いた“発育試験の結果”等の性能が評価・確認された「試験成績証明書」（メーカーにより名称が異なる場合もあり）を入手し、使用している培地が、検査に適する性能を保持しているか確認する (Fig. 2)。

(3) 試薬・培地類の使用開始

培地の使用前には，“コンタミネーションの有無”，損傷等の外観に異常がないかを確認後、使用する。

(4) 前処理

抗酸菌検査は各種検査材料が対象となるが、本稿では検査材料の中で最も頻度の高い喀痰を例とする。

前処理液（N-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム：NALC-NaOH）を効率よく作用させることを目的に、蛋白分解酵素セミアルカリプロテアーゼ（SAP）により喀痰を溶解・均等化し、さらに、NALC-NaOH法を用いて、消化・均等化および一般細菌の殺菌を行い、遠心操作による集菌を経て、抗酸菌を選択的に培養する。

検査材料の殺菌が不十分な場合、雑菌汚染により液

体培地および固形培地での培養継続が困難となる。

Pseudomonas spp は雑菌汚染の主要な原因菌で、NaOHに抵抗性が強く、プロテアーゼの産生により卵ベースの培地を溶解して、培養の継続が困難となる。また、液体培地は、サプリメントとして抗菌薬を添加により、一般細菌の発育は抑制される。

しかし、一般細菌と抗酸菌の増殖速度には大きな差があり、不十分な殺菌は、雑菌の発育による偽陽性のシグナルが出力される。

(5) 前処理の精度管理

雑菌汚染培地の許容範囲は3～5%である。汚染率が2%以下は、過度な前処理が推定され、検査材料中に含まれる抗酸菌を殺菌している可能性がある。

また、5%以上は、前処理が弱いために、検査材料の消化、均等化および一般細菌の殺菌が不十分な場合が考えられる。

雑菌汚染は、提出される検査材料の種類、質、検体採取から前処理開始までの保存状態等に左右され、施設ごとに雑菌汚染率を算出し、現状の把握が必要である。また、*M. gordonae* の分離率は雑菌汚染の指標となる。

(6) 分離培養検査

製造メーカーによる品質管理、培地および試薬類の受領時および使用開始時のチェックを経た分離培地に、前処理済検体を接種し分離培養検査が開始される。

この時、フラン器、自動培養装置の培養温度が目的とする温度を維持しているか否かを管理し、培養温度を日々記録し、管理する必要がある。

(7) 分離培養検査の精度管理

Table The check items commercial media received

Process	Instructions	Satisfactory	Unsatisfactory
Media arrival	Record the amount of media received, the arrival date, lot no., expiration dates in the QC records. Label boxes with the received date.	Media stored in at 2–8℃	1. Boxes unlabeled. 2. Required information not recorded in QC recorded. 3. Failure to store media at recommended temperature.
Visual inspection	Remove media a packages from outer boxes. Examine the packages for obvious damage.	1. Medium is appropriate color. 2. Minimal moisture in package. 3. No frozen or desiccated. 4. Smooth agar surface. 5. No precipitates.	1. Cracked and damage media. 2. Color differs from characteristic appearance. 3. Excessive accumulation of moisture. 4. Evidence of freezing or medium desiccated. 5. Gross contamination. 6. Excessive bubbles/rough surface. 7. Presence of precipitates.
Sterility check	Incubate the medias removed for examination during the visual inspection and incubate at 35℃ for ≤ 72 hours.	No bacterial or fungal growth.	Bacterial or fungal growth detected.

These items cited M22-A3 with modified


BIOMÉRIEUX
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: BacT/ALERT MP Lot No.: 1018679		Part No.: 259797 Expiration Date: 2008.10.31
---	--	---

<u>TEST</u>	<u>SPECIFICATIONS</u>	<u>RESULTS</u>
Description	A clear, colorless liquid.	Conforms
Color	(Average) OD 0.000 to 0.060 @ 500 nm	0.010
Bottle Reflectance	(Average) 1,700 to 2,900 RU	2277 RU
pH at 37°C	(Average) 6.66 to 6.86	6.81
Sterility	Results are satisfactory if no evidence of microbial growth is detected in the incubated samples.	Conforms
Growth Performance	Product to demonstrate expected levels of growth performance with each microorganism in test panel. (See Certificate of Conformance for specific organisms).	Conforms

	<u>Time to Detection within</u>	<u>TTD Result</u>
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	11.1 <= Results <= 19.5 Days	Conforms
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	6.5 <= Results <= 11.5 Days	Conforms

This product was manufactured in conformance with applicable good manufacturing practices.

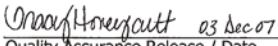
Prepared by:  Quality Assurance Release / Date	Verified by:  Quality Assurance Release / Date
---	--

Fig. 2 An example of the manufacturer's basic specifications

CLSIガイドライン Laboratory detection and identification of mycobacteria; Approved guideline (M48-A)は、標準作業手順書が整っている検査室について、①塗抹検査陽性の90%以上が培養陽性となり、培養検査陽性の約50%が塗抹検査陰性である。②3～6カ月の期間を設定し、培養陽性となるまでの時間を結核菌と非結核菌別に、または、塗抹検査陽性と陰性のグループに分け算出し、統計的に異常な値が出ているか否かを検証する。

培養陽性となるまでの時間が短縮している場合は、雑菌汚染率の上昇または迅速株の分離増加、延長している場合は、前処理の操作が粗暴または遠心時間や速度が適切でないことを示唆している。

なお、施設ごとの分離菌の分離率を算出し、特定の菌種が増加した場合は、クロスコンタミネーションを考慮し、調査を行う。

当院における精度管理の実践

ISO15189認定施設の条件のひとつとして、一連の検査過程のトレースが可能とする必要がある。前処理過程から培養検査、抗酸菌の発育を確認後、結核菌群である

か否か、その鑑別法による結果が正しく得られるかを、臨床検査室の責務のひとつとして、日常検査と同様の方法を用いて実施、記録を行っている。

(1) 精度管理株の選択

結核菌群の菌株として、検査室内感染、作業中のクロスコンタミネーションのリスクを軽減のために分離頻度が低く、さらにバイオセーフティーレベルの低い *M. bovis* BCG を選択した。非結核性抗酸菌は自動培養システム（バクテアラート3D）の精度管理株として推奨され、検出までの時間が定められている *M. intracellulare* と *M. fortuitum* を選択した。

これら3菌種は、1週間以内で発育する *M. fortuitum*、約2週間で発育する *M. intracellulare*、そして遅発育の *M. bovis* により分離培養期間全般にわたり、使用する培地類の発育試験が可能であると考えている。

なお、これら3菌種は、McFarland No.1濁度に調整後、凍結保存している。

(2) 精度管理の概要

凍結保存した菌液は、融解後、臨床検体として日常検査と同じ方法・手技を実施している。

精度管理株は融解後、SAP-NALC処理を行い、その後、塗抹検査、分離培養検査、核酸増幅検査に供している。分離培養検査では、抗酸菌の発育を確認するまでの時間（日）（発育菌の抗酸性を確認する）、同定検査（MPB64産生の有無、DDH法）、薬剤感受性検査の一連の手技と同時に、各キットの性能確認を行っている。

なお、使用した培地・試薬類は、使用日、ロットNo.、有効期限、実施者または確認者の記録を行い、検査結果のバラツキについても管理を行っている。

精度管理を実施するうえでの問題点

（１）バイオセーフティー

最も重要な事項は、検査室内での作業従事者の感染防止および病原体を検査室の外に持ち出さないことである。とくに、作業従事者の感染防止は、実技の熟練と教育である。

ISO15189では、検査手技の習熟と訓練等のトレーニングプログラム作成に関して詳細な要求事項を定めている。

結核菌はバイオセーフティーレベル3に定められ、エ

アロゾルの吸引によって感染を引き起こす。標準予防策、安全キャビネットの使用、エアロゾルの吸引等に対する配慮が必須であり、取り扱いのなかで、クロスコンタミネーションを引き起こす可能性を認識する必要がある。

（２）精度管理株の調整および保存

菌塊をつくりやすい菌を用いる場合、均一な菌液を作成することは困難であり、陽性となるまでの時間が指定される許容範囲を越えてしまうこともある。

また、標準菌株の入手やその保存法、精度管理用に調整された菌液の保存方法等、精度管理を実施するための準備、実施の普及が重要である。

ま と め

分離培養検査の精度管理は、市販培地を使用する場合と自家製培地を使用する場合では、実施すべき内容が異なる。

検査結果は、各ステップの精度向上が、最終的な精度向上につながることから、培地を含む試薬類、フラン器および自動培養装置の保守・点検も含めた精度管理プログラムの構築が必要と考えられる。

3. 分子生物学的検査の精度保証

東北大学病院診療技術部 長沢 光章

はじめに

臨床検査における精度保証は、検査結果の臨床的有用性を技術的に保証するものであり、精度管理（内部精度管理、外部精度管理）のみでなく検査法導入時の性能評価から始まり、検体受領から測定、結果の臨床的解釈、報告に至るまでのすべての作業工程が正確で初めて成り立つものである。今回、微生物（抗酸菌）検査における分子生物学的（遺伝子）検査の精度保証の実際と問題点について述べる。

内部精度管理

機器や機材の点検を行い、核酸増幅法における陽性および陰性コントロール、内部コントロール（PCR法）を必ず使用する。また、定期的に保存株（標準株など）を使用し精度管理を行う。PCR感染症研究会の調査では、PCR法のコントロールの使用方法は33のパターンに分類され、すべてのコントロールをすべての項目で使用している施設は76施設（20.7%）にすぎず、コントロールを全く使用しない8施設（2.2%）、陰性コントロールを使用しない10施設（2.7%）があり、精度管理の重要性

の認識を高める必要がある。

外部精度管理

現在、わが国における外部精度管理は^(社)日本臨床検査技師会サーベイおよびPCR感染症研究会サーベイがある。しかし、これらは核酸増幅法のみでありDDH法などは対象としていない。PCR感染症研究会サーベイでは、陽性または陰性の定性であるためほとんどの施設では正解であったが、不正解の施設では偽陰性の報告であり、陽性コントロールが低値または内部コントロールを測定していない施設であった。

臨床検査室の認定

ISO15189（臨床検査室一質と適合能力に対する特定要求事項）に基づいた^(財)日本適合性認定協会による臨床検査室の認定があるが、取得施設は平成21年1月現在でわずか43施設にとどまっている。ISO15189では、マネジメント要求事項（文書管理、是正処置、予防措置、品質および技術上の記録、内部監査など）および技術的要求事項（人材、作業スペースおよび環境条件、機器、検査手順、検査手順の品質保証、結果報告など）から成

っている。結核菌群・抗酸菌遺伝子検査は、非基幹項目として要求事項がすべて満たされている場合にのみ認定され、認定施設は27施設のみである。しかし、認定料の問題や認知度が低い現状がある。なお、病院機能評価は臨床検査室における分子生物学的検査の精度まで保証する内容とはなっていない。

結核菌検査指針2007

第6章「遺伝子検査」、第8章「精度保証」の項において、施設設備、バイオハザード対策、内部・外部精度

管理の実際、外部委託時の対応、遺伝子検査による結果の解釈、精度維持上の重要な因子などについて解説している。

ま と め

分子生物学的検査の精度保証として、内部精度管理と外部精度管理の実施は必須であり、それに加えて施設認定は受けていなくともISO15189の要求事項についても遵守する必要があると考える。

4. 結核菌薬剤感受性検査の精度保証

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科 御手洗 聡

はじめに

結核は、結核菌が薬剤感受性であるかぎり、標準療法にてほとんど治癒する疾患である。2002年度に結核療法研究協議会（療研）が実施した全国薬剤耐性調査では、何らかの薬剤に耐性をもつ結核菌は初回治療患者の8.2%に存在し、既治療患者の場合には22.8%である。isoniazid (INH) と rifampicin (RFP) の両方に耐性を有する多剤耐性結核菌 (Multi-drug resistant tuberculosis; MDR-TB) は全体の1.9%にのぼり、最近提唱されている Extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB: 超多剤耐性結核菌) も0.5%確認されている。さらに周辺国での耐性状況は悪化しつつあり、輸入感染症としての脅威もある。耐性がある場合の治療内容は薬剤感受性検査の結果により変更されるため、結核菌の薬剤感受性検査の精度は、治療に直接影響する重要な因子である。このシンポジウムでは、薬剤感受性検査の精度を保証する方法について概説する。

精度保証とその方法

精度保証とは検査の信頼性と効率を永続的に維持改善するために、精度と再現性について監視評価することと定義される。精度保証の方法には、①検査の質を含めた手順や試薬等についての内部管理活動である精度管理 (Internal Quality Control: IQC) と、②外部から検査の効率等を評価する外部精度評価 (External Quality Assessment: EQA) を含めるのが一般的である。さらに外部精度評価には3つの方法があり、日常業務上一度検査した検体を別の施設で再検査する方法 (クロスチェック)、結果既知の検体を検査し、標準判定と比較する方法 (パネルテスト) 及び検査の現場での調査・指導 (立入調査)

が含まれる。

内部精度管理は作業・手順・材料等について定期的に評価・観察することである。従って、日常業務の一部として自動的かつ効果的に実施されるよう工夫する必要がある。内部精度管理の成功の要点は、適切な訓練を受けた意識の高いスタッフ、実際の手順の設定、間違いを減らそうとする意志および内外との効果的な意思の疎通であると言われる。

外部精度評価の3つの方法にはそれぞれ長所・短所がある。クロスチェックは、途上国における抗酸菌塗抹検査の標準的な精度評価法として世界保健機関 (WHO) により強力に推進されている。日常業務の精度を評価することが可能である点は長所であるが、再検査を実施する上位検査施設 (レファレンス検査室) の負担が大きくなる点に問題がある。また、日常の精度を反映するだけの検体を抽出する方法がやや複雑なため、実践の際は事前の組織作りを十分にすることが必要である。

既知の検体を送付して各検査室で検査を実施し、その結果を標準的な結果と比較する方法 (パネルテスト) では、多くの施設を同時に評価することができ、レファレンス検査室の負担もクロスチェックに比べてやや軽い点が長所となるが、テストであることが明白であるため、最大検査能力を評価することになる場合が多く、通常業務上の精度を評価するという意味では適切でない。基本的には、サーベイ目的で精度のきわめて良くない施設を見つけ出すことを目的に用いられる方法である。

検査を行っている現場で指導を行う立入調査では、実際の手順を観察しながら問題点を明らかにすることが可能であり、さらに担当者の意識の向上にも有用である。しかしながら、この方法は時間及びコストがかかるため、選択的にしか実施できない点に問題がある。

日本で実際に精度保証活動を実施しようとする、結核菌薬剤感受性検査だけでも対象となる検査室が100以上あるため、クロスチェックを実施することは事実上不可能である。実際には、内部精度管理とパネルテストを実施し、場合によって立入調査を行うことになる。

内部精度管理

内部精度管理は各検査室で独自に実施するため、どこまで実施するかはそれぞれの検査室の判断による。日常業務の中で定期的に実施することが求められるため、実践可能な範囲を設定する必要がある。

薬剤感受性検査の内部精度管理を実施する場合、薬剤感受性培地そのものの精度については、自施設で培地を準備している場合を除いて、基本的にはメーカーに依存せざるを得ない。しかし、製造後も製品の質は変化するため、一般的には感受性既知の「標準結核菌株」を使用して精度管理を行う。具体的には、少なくともすべての抗結核薬に感受性をもつ結核菌（H37Rv等）を用いる。しかし実際に標準株を所持している施設は少ないので、やむなく臨床分離株を使用する場合は、しかるべき施設で感受性であることを確認しておく。基本的に検査ごとに実施するが、製造ロットが変わったときにも実施する。菌株を保存する際は、長期保存中に起こる形質変異を防ぐために-70℃以下で凍結保存する。

外部精度評価

先に日本ではクロスチェックは事実上不可能と述べたが、本邦ではおよそ5年ごとに結核療法研究協議会（療研）が全国レベルでの結核菌薬剤耐性サーベイを実施しており、その際に各検査室での検査結果と、筆者の所属する結核予防会結核研究所での検査結果を比較することが可能であり、ある意味でクロスチェックであると言える。クロスチェックを実施する際には、必ず検体の代表性を確保したサンプリング手順を踏む必要があるが、ひとつの具体的な例として、2002年に実施した耐性サーベイでのクロスチェックについて、手順と結果を示す。

まず日本国内において当時50床以上の結核病床を有

していた病院にサーベイへの参加を要請した。基本的にサーベイへの参加は任意であり、最終的に99施設が参加した。患者および検体の収集は、2002年6月1日から11月30日までの間に対象施設に入院した抗酸菌症の患者のうち、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て、分離抗酸菌をすべて結核研究所に送付して薬剤感受性検査を実施する方法をとった。結核研究所では、薬剤感受性検査を実施するにあたって1%小川培地による標準法を用いた。結果として、抗酸菌4,134株が収集され、非結核性抗酸菌899株（21.7%）等を除いた結核菌群3,122株が薬剤感受性検査の解析対象となった。

結核研究所での薬剤感受性検査結果を標準として、INH, RFP, ストレプトマイシン（SM）、エタンプトール（EB）について各施設での結果と標準判定を比較した。評価には感度、特異度、一致率、kappa（ κ ）指数を用いているが、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 指数は参加施設と標準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見て最も精度が高く、 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、これは過大評価と言える結果であった。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 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. ^aIsoniazid 0.2 $\mu\text{g/ml}$, ^bIsoniazid 1.0 $\mu\text{g/ml}$

このように、クロスチェックからは日常の検査精度に関する情報が得られる。しかしながら、このサーベイでは最終結果が出るまでに約3年かかっており、評価の迅速性の点で有用性はほとんどない。また、分離した菌株を保管するための施設の確保（感染症法の保管基準、手続き等）、結核菌株（分離菌）を移動させるための手順—特に多剤耐性結核菌の場合の困難性、クロスチェックを行う施設のキャパシティの確保、薬剤感受性検査の場合、保存した菌株が検査した菌株と同じ性質を保持しているかどうか保証できない等の問題もある。

外部精度評価のもうひとつの方法としてパネルテストがあるが、この方法は比較的迅速に評価結果が得られる点で優れている。具体的には薬剤耐性パターン既知の結核菌株を対象施設に送付し、各施設において薬剤感受性検査を実施後、標準判定と比較して精度を評価する。この方法は実際に日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会が2002年から毎年実施しており、2006年には約100施設が参加している。

パネルテストを実施するには、まず薬剤耐性パターン既知の結核菌株を準備する。パネルテストに使用する場合、多くの施設で検査を実施した場合でも高度に一致した結果が得られる必要があり、使用前にクローニング等を含めて厳重に標準化する。幸い、世界的に認められた結核検査機関のネットワークで毎年パネルテストを実施しており、そこで標準化した菌株を使用することが可能である。菌株の数も重要であり、もし統計的に5%の危険率を採用するのであれば、本来60株以上の結核菌についてパネルテストを実施する必要がある。しかし、もし60株の結核菌をウエルパックSを使って検査すると、およそ20万円のコストが発生する。また5株に1時間かかると仮定すると、単純計算で12時間もかかってしまうため、日常の検査業務内で実施するのはきわめて困難となる。従って、通常は10～20株程度で実施することになり、評価できるのは検査の最大能力ということになる。また、一般的には感受性および耐性的中率をバランスさせるため、パネル内部での薬剤毎の耐性頻度は約50%としておく必要がある。結果の安定性を考慮し

て検査薬剤はINH、RFP、EBおよびSMとするのが一般的である。薬剤感受性検査の結果は「耐性」あるいは「感受性」のいずれかとして判定し、データについては「感度」「特異度」「耐性的中率」「感受性的中率」および「一致率」を計算し評価する。 κ 指数を追加する場合もある。

例えば、偽耐性や偽感受性など系統的に多くの精度異常が認められた場合、原因の多くは接種する菌液の調製段階にある。適切な発育状態にある結核菌の数が少ないと、コントロールのコロニー数が少ないため過大・過小評価の可能性が高まる。また、培地が十分に乾かないうちに試験管を立てて培養したため、凝固水中に菌が残って評価に影響していた事例もある。パネルテストからは、そういった基本的な検査能力の有無についての情報しか得られない場合が多いが、精度が極端に低い場合は検査手順に系統的な問題がある証左となる。

パネルテストを通して系統的な精度異常が認められた場合は、可及的速やかに改善活動を実施する必要がある。方法としては現場への立ち入り調査が理想的と考えるが、先にも述べたように時間・コスト等から現実的でない。標準的な作業手順チェックリスト等によって、検査行程をチェックするのが現実的な手段と思われる。

トレーニングも精度保証上重要であり、定期的にリフレッシュトレーニングを実施することが精度の維持やバイオリスクの軽減につながる。日本はこの点が弱いため、強化の必要があると思われる。

おわりに

薬剤感受性検査の精度保証は治療精度保証上の大事である。今後の課題として、外部精度評価の制度としての確立、効果的方法論（実施方法、検体数、評価法、二次薬を含む薬剤の数・種類、等）のさらなる検討、分子生物学的手法（遺伝子変異検出等）への対応、精度評価後の改善状況の確認法の確立などが挙げられる。検査法の開発と同時に、精度保証法の開発・実践が必要と考えられる。

The 84th Annual Meeting Symposium

NEW TECHNOLOGIES AND QUALITY ASSURANCE FOR
THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSISChairpersons: ¹Takeshi HIGUCHI and ²Satoshi MITARAI

Abstract There are two clearly different directions for the diagnosis of tuberculosis. One is to detect *Mycobacterium tuberculosis* bacilli directly from clinical specimens, and the other is to detect the immunological responses indicating *M. tuberculosis* infection. The former is mostly effective to diagnose already developed tuberculosis as a disease using bacteriological techniques, while the latter is useful to diagnose the infection itself and tuberculosis with paucibacillary manifestation. It means that the bacteriological examinations contribute to detect active tuberculosis, and the immunological methods are useful to diagnose latent or sub-clinical tuberculosis infections, respectively.

It is critical to assure the quality of laboratory examination results from the viewpoint of evidence based medicine. The laboratory results directly affect the management of the case/suspect, thus the quality should be accurate. Recently the hospitals and clinical laboratories are keen to obtain the certificates from ISO and other accreditation programme like Japan council for quality health care. Therefore, this symposium aimed to discuss the quality assurance of laboratory diagnostics for tuberculosis, including new technologies.

At first, Dr Kazue Higuchi explained the methodology and some knacks for the quality assurance of QuantiFERON TB-2G (QFT 2G), which is an *ex-vivo/in-vitro* whole blood assay and now utilised widely in many clinical settings using. She provided many information to secure the quality of QFT-2G referring specimen collection, preservation, transportation and laboratory process. She also provided technical information of QuantiFERON Gold, which recently became available in the market.

Mr Yoshimi Higurashi discussed the quality assurance of mycobacterial culture based on the experience of obtaining ISO15189 in his laboratory, and explained in detail about the problems for quality assurance in Japan.

Prof. Mitsuaki Nagasawa explained the molecular microbiological methods, mainly on the nucleic acid amplification (NAA) methods. He laid stress on the clinical importance of NAA coming from its rapidity and high sensitivity, and emphasised the necessity of quality assurance for NAA.

Dr Satoshi Mitarai explained the data from the external quality assessment programme, which has been conducted by the Japanese Society for Tuberculosis for these several years, and emphasised the preferable effect of quality assurance activities. He also explained the importance of drug susceptibility testing for a good case management.

The symposium may provide comprehensive idea to understand the current and future strategy for the good and

reliable laboratory performances.

1. Quality assurance of QuantiFERON®TB-2/3G: Kazue HIGUCHI (Immunology Division, Department of Mycobacterium Research and Reference, Research Institute of Tuberculosis)

Although the use of QuantiFERON®TB-2G (QFT-2G) is expanding rapidly, there were the discrepancies of QFT-2G results between two different laboratories using same subjects. Thus, it has been noticed that the quality assurance of QFT-2G is important. We have carried out the quality assurances of QFT-2G twice so far. Among participated laboratories, nearly half of them were not acceptable in two quality assurances. However, many of those who had not been acceptable in the first quality assurance became acceptable in the second quality assurance, indicating that the introduction of the quality assurance could improve the accuracy of test skills. In addition to test skills, there are several factors which affect the QFT-2G test results. These include the storage time and storage temperature after blood collection. Our results showed that storage of blood samples at room temperature is more important factor than the storage time after blood collection, indicating that blood samples should be kept at room temperature until culture. The new version of QFT-2G (QFT-3G), which is more convenient in the first step of QFT (i.e. blood culture), has been approved in Japan. Therefore, the quality assurance including QFT-3G would be necessary to obtain more accurate test results.

2. Quality control and assurance for mycobacterial culture: Yoshimi HIGURASHI (Department of Infection Control and Prevention, The University of Tokyo Hospital)

It is important that carry on quality control and assurance for mycobacterial culture which patient care and prevent to hospital associated infection. According to NCCLS M22-A3 commercially prepared culture media, as routine quality control by the clinical laboratory, culture media is monitored by an overall quality program that correlates test procedure with clinical information, monitor items and specimen quality. When commercially prepared media used, check abnormalities in appearance of media or not and confirm no contamination before inoculate. For improvement culture test result that should perform quality control and assurance involve reagents, media, maintenance of incubator and automatic incubator system.

4. Quality assurance of anti-tuberculosis drug susceptibility

testing: Satoshi MITARAI (Deputy Head, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis)

Quality assurance (QA) is the key to improve and maintain the quality of anti-tuberculosis drug susceptibility testing. As the components of QA, internal quality control (IQC), external quality assessment (EQA) and training will be considered. Each component has advantage and disadvantage, so that all components should be well combined and implemented with good programmatic management. In practice, IQC and panel testing (QA) are most feasible methods, and will require systematic implementation and evaluation. It will be preferable if QA is systematically implemented and the laboratory performance is improved through the activity.

Key words: QuantiFERON, ISO15189, Quality control, Quality assurance, External Quality Assessment

¹Department of Clinical Laboratory, Kyoto University Hospital, ²Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis

Correspondence to: Satoshi Mitarai, Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.

(E-mail: mitarai@jata.or.jp)