

## 結核菌の pyrazinamide 感受性試験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>1</sup>五十嵐ゆり子   <sup>1</sup>村瀬 良朗   <sup>2</sup>阪下健太郎   <sup>2</sup>大藤 貴  
<sup>1</sup>高木 明子

**要旨：**〔目的〕 pyrazinamide (PZA) は主要抗結核薬のひとつであるが、薬剤感受性試験法が一般の方法と異なり、偽耐性が多いことが報告されている。日本国内での同薬剤の試験精度の現状を明らかにするため、PZA 感受性試験について外部精度評価を実施した。〔方法〕 薬剤耐性既知の結核菌 10 株を使用した。被験薬剤は PZA を主要対象としたが、同時に isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM), ethambutol (EB), kanamycin (KM) および levofloxacin (LVFX) についても評価可能とした。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、施設あるいは薬剤ごとの感度、特異度、判定一致率、 $\kappa$  指数を算出した。〔結果〕 病院検査室 70, 検査センター 21, 地方衛生研究所 6 の計 97 施設で実施した。8 施設が複数の結果を提出したため、解析対象数は計 105 となった。検体の受領から結果報告までの日数は  $65.4 \pm 20.7$  (21–109) 日であった。PZA については 60 施設が実施しており、偽耐性が大変多く認められ、結果として感度は 96.6% (95% CI: 87.4–99.4%) であったが、特異度が 64.3% (95% CI: 50.8–76.0%) となった。使用キット別では極東 PZA 液体培地 (極東製薬工業) が 44 施設で使用され、特異度 69.5% (95% CI: 53.6–82.0%) であったのに対して、16 施設でミジットシリーズピラジナミド (バクトン・ディッキンソン) が使用され、特異度は 48.8% (95% CI: 24.5–73.5%) であった ( $p=0.0043$ )。〔考察〕 現行の PZA の試験特異度はきわめて低いと考えられた。ミジットシリーズピラジナミドについては偽耐性が発生しやすいという論文が既に複数報告されているが、極東 PZA 液体培地についても平均 70% 以下の特異度であった。液体培地による PZA 感受性試験は結果が比較的早く得られるため、臨床ではその検査結果を基に PZA の使用が中止される可能性もある。また、特に M/XDR-TB を治療する際に PZA は重要な薬剤であり、適切な訓練を通じて検査精度を高める、あるいは代替法 (Line probe assay や pyrazinamidase 試験) を採用する必要性が急務と考えられた。

**キーワード：**結核菌, pyrazinamide, 薬剤感受性試験, 外部精度評価

### はじめに

全世界的に Anti-Microbial Resistance (AMR) が問題となっており、2050 年までに 1000 万人が AMR で死亡するという報告も見受けられる<sup>1)</sup>。結核の分野では Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) や Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (XDR-TB) が AMR の点で注目されており、世界保健機関 (WHO)

の 2016 年の報告によると、2015 年に MDR-TB と RR-TB (rifampicin resistance TB: ほとんどが MDR-TB である) が 48 万人および 10 万人発生したと推定されている<sup>2)</sup>。これらの患者に対して、WHO は 2016 年に新たな 9–12 カ月の多剤併用短期化学療法への導入に関するガイドラインを出しており、その中で 4–6 カ月の kanamycin (KM) –moxifloxacin–prothionamide–clofazimine–pyrazinamide (PZA) –isoniazid (INH) <sub>high-dose</sub> –ethambutol (EB) に続く 5 カ月の

<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>長崎大学大学院医歯薬学総合研究科基礎抗酸菌症学

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 16 Apr. 2017/Accepted 6 Jun. 2017)

moxifloxacin-clofazimine-PZA-EBという治療法を提唱している<sup>3)</sup>。この併用療法においても、PZAは主要な治療薬の位置を占めており、今後bedaquilineやdelamanideなどの新薬を含む治療法が確立された場合にも、依然として多剤併用薬の一角を成すと考えられている<sup>4)</sup>。

一方、PZAの感受性試験については偽耐性を指摘する研究が相次いで報告されている。Simons SOらは、ミジットシリーズピラジナミド (MGIT AST PZA: ベクトン・ディッキンソン) において68%の偽耐性が観察されたと報告しており<sup>5)</sup>、Chedoreらはスクリーニング時にMGIT AST PZAによって24株耐性とされたものが、再検査によって10株に減少し、14株 (58.3%) は偽耐性であったと報告している<sup>6)</sup>。Werngrenらは*pncA*の変異とPZAのMICを比較し、MGIT AST PZAに使用されている100 µg/mlという濃度では偽耐性が出やすいと報告している<sup>7)</sup>。日本国内では青野らが極東PZA液体培地 (極東製薬工業) とMGIT AST PZAについて、pyrazinamidase陽性をもってPZA感受性とした場合、極東PZAは感度88.1%、特異度85.7%、一致率87.0%、kappa ( $\kappa$ ) 指数0.77であり、MGIT PZAは感度100%、特異度80.0%、一致率90.9%、 $\kappa$  指数0.81であると報告している<sup>8)</sup>。

日本国内にはPZA耐性に関する正確な疫学的データが存在しないが、2016年の結核療法研究協議会総会報告資料によると、既治療・未治療を合わせた全体でのPZA耐性率は2.1% (n=2,655) となっており、同じ報告にあるrifampicin (RFP) の1.6%よりも高い<sup>9)</sup>。PZAは一般に結核の治療初期2カ月間しか使用されないことを考慮すると、このPZA耐性率は高すぎるようにも思われ、前述の報告とも併せて試験精度の点で疑問がある。

これまで日本国内でPZAの感受性試験について大規模な外部精度評価が行われたことはなく、日本全体でのPZA感受性試験精度は明らかではない。今回、この点を明らかにするため結核菌薬剤感受性試験実施施設を対象として、当該薬剤を中心とした外部精度評価を実施した。

## 方 法

### (1) 研究参加要件

感染症法の要求する施設基準 (四種) 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、外部精度評価実施プロトコル (本文) 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。なお、この研究は平成28年度日本医療研究開発機構研究課題「地域における結核対策に関する研究」(主任研究者: 石川信克) の分担研究「結核病原体サーベイランスシステム構築に向けた広域分子疫学評価と検査精度保証」の一部として実施した。

### (2) 被験検体 (結核菌株)

結核菌10株を0.4~0.5 mlの液体培地中に懸濁した状態で参加施設担当者に送付した。今回使用した菌株は世界保健機関 Stop TB partnershipの一部である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。今回PZAを中心に評価したが、PZA感受性試験の基準となる方法として、被験菌10株についてプロモーター領域を含む*pncA*遺伝子変異 (アミノ酸置換を伴う) の有無を確認している。

streptomycin (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 (比率法二種および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。最終的にSRLNの方法に従い、参加施設全体での一致率が80%を下回った株については解析から除外した。また、PZA以外の薬剤についてMICを測定しているが、これは結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科でプロミックMTB-I (極東製薬工業) を使用して実施した。

送付する菌株の中には薬剤耐性株を含むが、感染症法の規定により三種病原体の運搬がきわめて困難であるため、被験菌に三種病原体等に相当する結核菌 (一般的に超多剤耐性結核菌) を使用しないことを事前に明確化した。しかしながら、多剤耐性結核菌を含めて他の耐性は存在するため、取り扱いには十分なる注意を要することを参加募集時のプロトコル中に示した。なお、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の規約に従って郵送した。

### (3) 試験薬剤

試験薬剤は、基本的にPZAとした。しかしながら、INH、RFP、EB、SM、KMおよびlevofloxacin (LVFX) も対象薬剤として同じパネルテスト株で実施可能であるため、対象施設の日常の精度保証についても考慮し、実施薬剤についてはPZA以外の薬剤だけの実施も可とした。

### (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 (PZA試験は液体培地のみ。その他の薬剤では固形培地のみで実施可能) 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 (エクセルファイル) 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、結果を別々のファイルとして報告を行い、それぞれ独立の結果として評価を行った。

#### (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  $\kappa$  指数を計算し評価した。ここで感度とは、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。

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) の計算には Wilson score を使用した。M/XDR-TB の診断精度の比較には Chi-square test を用いた。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]

計97施設（病院検査室70施設、検査センター21施設、地方衛生研究所6施設）の参加を得た。2016年2月28日時点で全施設から回答を受領した（回収率100%）。検体の受領から結果報告までの日数は  $65.4 \pm 20.7$ （21~109）

日であり、一部の施設で結果報告までに3カ月以上を要した。8施設が複数の方法で結果を送付していたため、結果セット数は105となった。以下、105件のデータとして解析を進めたが、施設および使用キットによって被験薬剤が異なるため、薬剤によって実施施設数が異なった。

今回、各施設に10株の結核菌を発送したので、送付総数は970株となった。全970株のうち、2株で発育不良が認められ、発育不良率は0.2%であった。Table 1にSRLNでの各菌株における判定一致率（判定基準の確からしさ）を示した。また、各株のSRLNでの標準判定とMICをTable 2に示した。PZAのMICについては、SRLNでもほとんどの施設がMGIT AST PZAを使用していたため、情報が得られなかった。

Table 3には株別の一致率の結果を示した。今回の株の中ではほとんど全ての株で95%以上の施設間一致率を示したが、株5および株8でSMにおいて偽耐性 (False resistance) が多く、一致率はそれぞれ60.0%および55.6%であった。それぞれの株のMICはTable 2に示したように2および4  $\mu\text{g/ml}$ であった。

PZAについては、4株で判定一致率が80%を下回った。株1では判定一致率67.2%、株4では60.0%、株9では51.7%、株10では55.0%であった。これらの株は全てSRLNではPZA感受性と判定されており、偽耐性の発生が多く認められた。

#### [施設タイプ別PZA試験精度]

Table 4には施設タイプ別のPZA感受性試験結果を示した。全体（実施施設数60）では、感度96.6%（95% CI: 87.4–99.4）、特異度64.3%（95% CI: 50.8–76.0）、一致率80.5%（95% CI: 67.9–89.2）、 $\kappa$ 指数0.610（95% CI: 0.475–0.730）であった。偽感受性が10例に対して、偽耐性が106例認められた。

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

Specimen ID	Diagnostic agreement among SRLN (%)						
	INH	RFP	SM	EB	KM	LVFX	PZA
1	96.8	100	NA	98.4	96.7	100	93.1
2	100	93.5	NA	93.5	90.3	100	96.6
3	100	90.3	NA	100	100	100	93.1
4	100	100	NA	100	98.4	100	96.4
5	100	100	NA	90.3	100	100	100
6	100	100	NA	88.7	100	100	100
7	100	96.8	NA	90.3	96.8	100	96.3
8	100	100	NA	93.5	98.4	100	98.3
9	100	100	NA	100	100	96.7	96.6
10	100	100	NA	100	98.4	100	96.4

ID; identification, NA; Not available, Agreement data was not available among Supra-National Reference Laboratory Network (SRLN), because streptomycin was excluded from the quality assurance programme since 2014.

INH: isoniazid, RFP: rifampicin, SM: streptomycin, EB: ethambutol, KM: kanamycin, LVFX: levofloxacin, PZA: pyrazinamide

**Table 2** Judicial diagnosis and MIC for each strain used in this study

ID	INH		RFP		SM		EB		KM		LVFX		PZA	
	JD	MIC	JD	MIC	JD	MIC	JD	MIC	JD	MIC	JD	MIC	JD	MIC
1	S	0.13	R	1	R	>128	S	1	R	8	S	0.5	S	NA
2	R	8	R	>32	R	32	S	1	R	32	S	0.25	R	NA
3	S	0.13	S	≤0.03	R	>128	S	1	S	1	S	0.5	S	NA
4	S	0.13	S	0.06	S	0.5	S	2	S	1	R	8	S	NA
5	R	16	R	32	S	2	R	16	S	2	R	4	R	NA
6	R	16	R	32	R	>128	R	16	R	>128	S	0.25	R	NA
7	R	8	R	>32	S	1	R	16	S	2	S	0.5	R	NA
8	R	16	R	>32	S	4	R	16	S	2	R	4	R	NA
9	R	4	S	≤0.03	S	1	S	2	S	2	S	0.5	S	NA
10	S	0.13	S	≤0.03	S	0.5	S	2	S	1	R	8	S	NA

JD: Judicial diagnosis, R: Resistant, S: Susceptible, MIC: Minimum Inhibitory Concentration (µg/ml), measured by broth microdilution method (BrothMIC MTB-I, Kyokuto pharmaceuticals), NA: Not available

**Table 3** Diagnostic agreements among the participants and SRLN judicial diagnoses

ID	INH		RFP		SM		EB		KM		LVFX		PZA	
	JD	EFI	JD	EFI	JD	EFI	JD	EFI	JD	EFI	JD	EFI	JD	EFI
1	S	1.000	R	1.000	R	1.000	S	0.950	R	1.000	S	1.000	S	0.672
2	R	1.000	R	1.000	R	0.960	S	0.990	R	1.000	S	1.000	R	0.983
3	S	0.990	S	1.000	R	0.980	S	0.990	S	1.000	S	0.988	S	0.881
4	S	0.970	S	1.000	S	1.000	S	0.990	S	0.988	R	1.000	S	0.600
5	R	1.000	R	1.000	S	0.600	R	1.000	S	1.000	R	0.988	R	0.983
6	R	1.000	R	1.000	R	0.990	R	1.000	R	0.988	S	0.988	R	0.950
7	R	1.000	R	1.000	S	1.000	R	1.000	S	0.976	S	1.000	R	0.967
8	R	1.000	R	1.000	S	0.556	R	0.970	S	0.951	R	0.988	R	0.948
9	R	0.980	S	1.000	S	0.990	S	1.000	S	0.988	S	0.988	S	0.517
10	S	0.980	S	1.000	S	1.000	S	1.000	S	1.000	R	1.000	S	0.550

R: Resistant, S: Susceptible, JD: judicial diagnosis by Supra-National Reference Laboratory Network (\*JD of streptomycin was confirmed at the Research Institute of Tuberculosis, JATA), EFI: Efficiency (overall agreement of resistant and susceptible)

**Table 4** Sensitivity, specificity, efficiency and kappa coefficient of pyrazinamide drug susceptibility testing categorised by institutional types

Indicator	Facility							
	General hospitals (n=44)		Commercial laboratory (n=11)		Public health laboratory (n=5)		All (n=60)	
	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI
Sensitivity	0.982	0.872–1.000	0.982	0.656–0.997	0.783	0.286–0.986	0.966	0.874–0.994
Specificity	0.608	0.450–0.748	0.655	0.331–0.887	0.920	0.392–0.999	0.643	0.508–0.760
Efficiency	0.796	0.643–0.897	0.818	0.478–0.968	0.854	0.339–0.998	0.805	0.679–0.892
kappa coefficient	0.592	0.434–0.734	0.636	0.316–0.876	0.706	0.235–0.966	0.610	0.475–0.730

95% CI: 95% confidential interval

**Table 5** Sensitivity, specificity, efficiency and kappa coefficient of PZA drug susceptibility testing kits

Indicator	KPZA (n=44)		MPZA (n=16)		PZA (n=60)		Appendix
	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI	
Sensitivity	0.951	0.828–0.991	1.000	—	0.966	0.874–0.994	
Specificity	0.695	0.536–0.820	0.488	0.245–0.735	0.643	0.508–0.760	KPZA > MPZA: p=0.0043
Efficiency	0.826	0.677–0.918	0.744	0.468–0.913	0.805	0.679–0.892	KPZA > MPZA: p=0.0152
kappa coefficient	0.648	0.489–0.781	0.488	0.245–0.735	0.610	0.475–0.730	KPZA > MPZA: p=0.0180

95% CI: 95% confidential interval, PZA: pyrazinamide, KPZA: Kyokuto PZA liquid medium, MPZA: MGIT AST PZA

Table 5にはPZA感受性試験キット別の検査精度を示している。極東PZA液体培地（極東製薬工業）を使用していたのは44施設であり、16施設がMGIT AST PZAを使用していた。それぞれのキットでの感度・特異度は極東PZA液体培地で感度95.1%（95% CI: 82.8-99.1%）、特異度69.5%（95% CI: 53.6-82.0%）であり、MGIT AST PZAで感度100%、特異度48.8%（95% CI: 24.5-73.5%）であった。極東PZA液体培地との間にMGIT AST PZAの特異度、一致率およびκ指数において統計的有意差が認められた（それぞれp=0.0043, 0.0152, 0.018）。上記2種以外の試験方法（*pnca* 遺伝子変異検出, pyrazinamidase 試験, 等）を使用していた施設はなかった。

〔その他の薬剤における施設別・キット別検査精度〕

Table 6に施設別・薬剤別の精度を示した。全ての施設で全ての薬剤を試験しているわけではないので、薬剤ごとに試験施設数は異なっていた。薬剤別にはINH（n=100）の感度、特異度、一致率、κ指数の全体平均がそれぞれ99.7%（95% CI: 94.8-100）、98.5%（95% CI: 93.0-99.8）、99.2%（95% CI: 94.1-100）、0.983（95% CI: 0.927-0.998）であった。同様にRFP（n=100）では感度、特異度、一致率ともに100%であり、κ指数1.000であった。SM（n=100）では感度98.3%（95% CI: 92.6-99.7）、特異度85.8%（95% CI: 77.0-91.7）、一致率90.8%（95% CI: 82.9-95.4）、κ指数0.814（95% CI: 0.721-0.882）であり、

**Table 6** Results of external quality assessment to other drugs tested in this study

Indicator	Facility							
	General hospital (n=78)		Commercial laboratory (n=20)		Public health laboratory (n=7)		All (n=105)	
	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI
INH	[n=76]		[n=19]		[n=5]		[n=100]	
Sensitivity	0.996	0.933-1.000	1	—	1	—	0.997	0.948-1.000
Specificity	0.980	0.909-0.998	1	—	1	—	0.985	0.930-0.998
Efficiency	0.989	0.923-1.000	1	—	1	—	0.992	0.941-1.000
kappa*	0.978	0.906-0.997	1	—	1	—	0.983	0.927-0.998
RFP	[n=76]		[n=19]		[n=5]		[n=100]	
Sensitivity	1	—	1	—	1	—	1	—
Specificity	1	—	1	—	1	—	1	—
Efficiency	1	—	1	—	1	—	1	—
kappa	1	—	1	—	1	—	1	—
SM	[n=76]		[n=19]		[n=5]		[n=100]	
Sensitivity	0.977	0.904-0.997	1	—	1	—	0.983	0.926-0.997
Specificity	0.868	0.766-0.932	0.816	0.567-0.945	0.862	0.345-0.998	0.858	0.770-0.917
Efficiency	0.912	0.818-0.962	0.889	0.648-0.980	0.918	0.391-1.000	0.908	0.829-0.954
kappa	0.821	0.713-0.896	0.780	0.529-0.925	0.836	0.325-0.995	0.814	0.721-0.882
EB	[n=76]		[n=19]		[n=5]		[n=100]	
Sensitivity	0.990	0.924-1.000	1	—	1	—	0.992	0.941-1.000
Specificity	0.985	0.916-0.999	0.991	0.778-0.998	1	—	0.987	0.932-0.999
Efficiency	0.987	0.919-0.999	0.995	0.783-0.997	1	—	0.989	0.936-0.999
kappa	0.973	0.898-0.995	0.989	0.775-0.999	1	—	0.977	0.918-0.995
KM	[n=59]		[n=19]		[n=5]		[n=83]	
Sensitivity	0.991	0.914-1.000	1	—	1	—	0.994	0.938-1.000
Specificity	0.991	0.912-1.000	1	—	1	—	0.994	0.923-0.999
Efficiency	0.991	0.913-1.000	1	—	1	—	0.994	0.927-1.000
kappa	0.982	0.898-0.999	1	—	1	—	0.987	0.905-0.995
LVFX	[n=59]		[n=19]		[n=5]		[n=83]	
Sensitivity	0.994	0.910-1.000	1	—	1	—	0.996	0.935-1.000
Specificity	0.993	0.910-1.000	0.970	0.791-0.995	0.971	0.463-0.981	0.986	0.935-1.000
Efficiency	0.993	0.910-1.000	0.979	0.791-0.995	0.980	0.463-0.981	0.989	0.935-1.000
kappa	0.984	0.896-0.999	0.951	0.791-0.995	0.953	0.463-0.981	0.974	0.924-0.999

kappa: kappa coefficient

EB (n=100) では感度99.2% (95% CI: 94.1-100), 特異度98.7% (95% CI: 93.2-99.9), 一致率98.9% (95% CI: 93.6-99.9),  $\kappa$  指数0.977 (95% CI: 0.918-0.995) であった。KM (n=83) では感度99.4% (95% CI: 93.8-100), 特異度99.4% (95% CI: 92.3-99.9), 一致率99.4% (95% CI: 92.7-100),  $\kappa$  指数0.987 (95% CI: 0.905-0.995) であり, LVFX (n=83) では感度99.6% (95% CI: 93.5-100), 特異度98.6% (95% CI: 93.5-100), 一致率98.9% (95% CI: 93.5-100),  $\kappa$  指数0.974 (95% CI: 0.924-0.999) であった。施設間で各薬剤の感度, 特異度, 一致率,  $\kappa$  指数に有意な差は認められなかった。

#### 〔SMの不一致株と修正精度〕

今回, SMについては施設間一致率の低かった株5 (一致率60.0%) と株8 (一致率55.6%) を総合判定上の評価対象から除外した解析も実施した。これらの株を除外することで, 全ての株について (PZAを除く) 95%以上の一致率が得られた。また, これらの株を除外したことによって, SM全体では感度98.3% (95% CI: 92.6-99.7), 特異度99.7% (95% CI: 95.0-100), 一致率99.0% (95% CI: 93.8-99.9),  $\kappa$  指数0.980 (95% CI: 0.923-0.997) (n=100) となった。

#### 〔多剤耐性結核菌同定精度に関する評価〕

今回対象とした7薬剤のうち, PZAを除く6薬剤の感受性試験を実施したのは83施設であった。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, SMで施設間一致率の低い2株 (株5および株8) を除外する前の段階では, 6薬剤実施した施設の基準達成率は60.2%であり, 一方INH, RFP, SMおよびEBの4薬剤のみ実施の施設 (n=100) では基準達成率は64.0%であった。SM一致率の低い2株を除外した後では, 基準達成率は88.0%に上昇した。SMに関する2株を除外した場合でも, PZAまで含んだ場合の7薬剤での基準達成率は46.3% (19/41) であった。

多剤耐性結核菌 (Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: MDR-TB) の定義は, INHとRFPの両方に耐性を有することであり, 両薬剤を試験した100施設のうち, MDR-TBを正しく同定していたのは96施設 (96.0%) であった。三種病原体等相当結核菌はいわゆる超多剤耐性結核菌 (Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: 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, これらの薬剤について試験を行っていたのは83施設であり, 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71施設 (85.5%) であった。MDR-TBとXDR-TBの同定精度には有意差が認められた ( $p=0.0257$ )。

## 考 察

2015年度に引き続いて, 結核菌の薬剤感受性試験外部精度評価を実施した。今回は, 主要抗結核薬のひとつとされいながら, これまで一度も外部精度評価を実施したことがなかったPZAを中心的対象薬剤として, 他の抗結核薬に関する外部精度評価も含めて実施した。今回の参加施設数は前回の88施設を上回る97施設であり, 外部精度評価の必要性が要件化 (検査施設における病原体等検査の業務管理要領の策定について, 健感発1117第2号, 平成27年11月17日) された影響が考えられた<sup>10</sup>。さらに一方でInternational Organization for Standardization (ISO) 取得による外部精度評価の義務化も影響しているものと思われた。PZAの感受性試験を実施している施設はあまり多くないことが予想されていたが, 最終的には60施設でPZAの感受性試験を極東PZA液体培地あるいはMGIT AST PZAを用いて実施していた。

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, SMのみ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った。結果として, 株5と株8のSMにおいて80%以下の施設間一致率であった。この結果から, 両株を評価対象から除外した結果, 評価基準に達した施設数は増加し, ほぼ90%となって2004年からの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外部精度評価を含めても過去最高となった<sup>11)12)</sup>。外部精度評価とその結果に対する改善活動を繰り返すことによる精度改善効果が考えられた。

今回初めて実施したPZAの感受性試験については, 結果に示したとおり偽耐性がきわめて多く報告された。PZAで偽耐性が多いとする同様の報告は序文にも記載したとおり, 海外・国内からも複数報告されている<sup>5)~8)</sup>。偽耐性を示す可能性として, 大量の菌を接種することによる培地のpHの上昇を指摘する報告がある<sup>13)</sup>。PZAはpHによって効果に変化し, 一般にpHが5.5のときにはPZAの結核菌に対するMICは50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であるが, pHが5.95では400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となり, ほぼ中性とすると活性はほとんどなくなるとされている<sup>14)</sup>。また, 同じ論文で培地中に含まれるウシ血清アルブミンもPZAあるいはその代謝物であるPyrazinoic acid (POA) の感受性を低下させると報告している<sup>13)</sup>。Chedoreらの報告にあるように, 培養陽性菌液から直接実施した場合と, 継代培養して再実施した場合で偽耐性数が減少することから, 検体に含まれる夾雑物の影響も考えられる。一方, Chedoreらは再

現性の問題としてこの現象を説明しており<sup>6)</sup>、同じ Phenotype 試験としての pyrazinamidase 試験での再現性の問題を指摘する論文もある<sup>15)</sup>。Werngrenらは46株の臨床分離結核菌株についてPZAのMICを測定し、*pncA*の変異との相関で耐性・感受性のブレイクポイントを決める方法 (epidemiological wild-type cutoff: ECOFF) を検討しており、MIC ≤ 64 µg/mlに有意な*pncA*変異はなく感受性と判断し、ECOFFを64 µg/mlとしている。一方で256 µg/ml以上は耐性、その間にある128 µg/mlは*pncA*変異株と野生株の混合であり、intermediateとすることを提唱している<sup>7)</sup>。この報告から、現在PZA試験の標準濃度として使用されている100 µg/mlという濃度設定はintermediate濃度に近いため、再現性の問題として感受性株を耐性と判断してしまう可能性が考えられた。

しかしながら、単純に再現性の問題であれば、偽感受性と偽耐性はほぼ同一の確率で発生しなければならない。今回の外部精度評価では感度・特異度共に低下しているわけではなく、明らかに耐性に偏って結果が判断されている。これは、現在設定されている薬剤濃度が特にMGIT AST PZAで低すぎる可能性を示している。ところがSRLNでは同じMGIT AST PZAを用いて93.1%以上の一致率を示しており、今回参加した施設の中にもPZAで100%の一致率を示した検査室が9施設認められた。これらを総合すると、現在のPZA薬剤感受性試験キットのPZA濃度はやや低すぎる可能性があり、さらに技術上非常に困難な方法であることが考えられた。標準手順書の改善や実施技術に関する適切な訓練が急務と考えられた。

今回の薬剤感受性試験外部精度評価では85.5%の施設がINH, RFP, KMおよびLVFX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。これは2015年度に実施された外部精度評価での基準到達率71.3%と比較して、有意な増加ではなかったが (p=0.3295)、精度の改善傾向を示すものと思われた。同時に、MDR-TBの診断精度も92.2%から96.0%に上昇していた (有意差なしp=0.4224)。ただし、2015年度と今回の研究 (2016年度) では多くの参加施設が同一であるものの、完全に一致はしていないため、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。

抗結核薬4剤による6カ月の標準治療とPZAを除いた3剤による9カ月治療では、一般に前者の再発率が低いと考えられる<sup>16) 17)</sup>。過去において、ウエルパックS (日本ビーシー製造) に1%小川培地を基礎とするPZA感受性試験が組み込まれており、青野らが感度78%、特異度66%、一致率72%と報告した<sup>18)</sup>。このキットのPZA感受性試験はその後中止されたが、実際には固形培地を

用いていたため、結果を得るまでに2カ月程度を要し、結果が出るころには患者のPZA投与期間はほぼ終了していたと思われる。PZA投与後の耐性報告によって治療期間が9カ月に延長された可能性は考えられるが、多剤耐性結核などを除いてこの結果が結核患者の再発率を含む治療効果に直接的不利益をもたらした可能性はあまり高くないと考えられた。一方、液体培地によるPZA感受性試験は比較的迅速であり、早ければ1カ月以内に結果が得られる。偽耐性によりPZAを中止した結果として治療期間の延長等の措置が具体的に行われ、さらに再発率の上昇などの可能性が高まれば、それは患者への直接的な不利益となりうる。また特にM/XDR-TBを治療する際にPZAは重要な薬剤であり、適切な訓練を通じて検査精度を高める、あるいは代替法を採用する (Line probe assayやpyrazinamidase試験) などして、PZAの薬剤感受性試験精度を早急に改善する必要性が考えられた。

## 謝 辞

この研究は平成28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) de Kraker ME, Stewardson AJ, Harbarth S: Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? PLoS Med. 2016; 13: e1002184.
- 2) World Health Organization: Global tuberculosis report 2016. WHO/HTM/TB/2016.13
- 3) World Health Organization: WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. WHO/HTM/TB/2016.04.
- 4) Diacon AH, Dawson R, von Groote-Bidlingmaier F, et al.: 14-day bactericidal activity of PA-824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial. Lancet. 2012; 380: 986-93.
- 5) Simons SO, van der Laan T, Mulder A, et al.: Rapid diagnosis of pyrazinamide-resistant multidrug-resistant tuberculosis using a molecular-based diagnostic algorithm. Clin Microbiol Infect. 2014; 20: 1015-20.
- 6) Chedore P, Bertucci L, Wolfe J, et al.: Potential for erroneous results indicating resistance when using the Bactec MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J Clin Microbiol. 2010; 48: 300-1.
- 7) Werngren J, Sturegård E, Juréen P, et al.: Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of

- Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and *pncA* gene sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 ; 56 : 1253-7.
- 8) 青野昭男, 近松絹代, 五十嵐ゆり子, 他: Pyrazinamide 薬剤感受性試験法の評価. *日本臨床微生物学会雑誌.* 2015 ; 25 : 314-319.
  - 9) 御手洗聡: 結核療法研究協議会総会資料, 2017, 1-4.
  - 10) 厚生労働省健康局長: 検査施設における病原体等検査の業務管理要領の策定について. 健感発1117第2号, 平成27年11月17日. 厚生労働省, 2015.
  - 11) 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.
  - 12) 御手洗聡, 山田博之, 青野昭男, 他: 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. *結核.* 2016 ; 91 : 717-725.
  - 13) Zhang Y, Permar S, Sun Z: Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol.* 2002 ; 51 : 42-49.
  - 14) Salfinger M, Heifets LB: Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988 ; 32 : 1002-1004.
  - 15) Chang KC, Yew WW, Zhang Y: Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 ; 55 : 4499-4505.
  - 16) 馬場治賢, 新海明彦, 井樋六郎, 他: 肺結核短期療法の遠隔成績 第2次研究-B, 9ヶ月4方式による肺結核治療終了後5年以上の遠隔成績. *結核.* 1987 ; 62 : 511-520.
  - 17) 和田雅子, 吉山 崇, 吉川正洋: 初回治療肺結核症に対するPyrazinamideを含んだ6ヶ月短期化学療法. 1994 ; 69 : 671-680.
  - 18) 青野昭男, 近松絹代, 山田博之, 他: PZA薬剤感受性試験法の評価. *日本臨床微生物学会雑誌.* 2012 ; 22 : 142.



## Original Article

EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT OF PYRAZINAMIDE SUSCEPTIBILITY TESTING AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

<sup>1</sup>Satoshi MITARAI, <sup>1</sup>Hiroyuki YAMADA, <sup>1</sup>Akio AONO, <sup>1</sup>Kinuyo CHIKAMATSU,  
<sup>1</sup>Yuriko IGARASHI, <sup>1</sup>Yoshiro MURASE, <sup>2</sup>Kentaro SAKASHITA, <sup>2</sup>Takashi OHFUJI,  
and <sup>1</sup>Akiko TAKAKI

**Abstract** [Objective] Pyrazinamide (PZA) is one of the major anti-tuberculosis drugs. The drug susceptibility testing (DST) method for PZA is unique and many false-resistant results are reported. To reveal the accuracy of DST for PZA in Japan, the external quality assessment (EQA) was implemented.

[Method] A total of 10 *Mycobacterium tuberculosis* strains of which the resistances are confirmed in the Supra-National Reference Laboratory Network of STOP TB partnership was used in this study. The major target of EQA in this study was PZA, but other six drugs, isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM), ethambutol (EB), kanamycin (KM) and levofloxacin (LVFX) could be included in the EQA. The participating facilities performed DST using their routine methods and the results were compared with the judicial diagnoses. The evaluation factors were sensitivity, specificity, efficiency and kappa coefficient.

[Results] A total of 97 facilities (70 hospitals, 21 private commercial laboratories, and 6 public health laboratories) participated in this study, and the overall results became 105 because 8 laboratories submitted multiple results. The average turn-around time (TAT) was  $65.4 \pm 20.7$  (range: 21–109) days. A total of 60 facilities performed phenotypic PZA susceptibility testing, and resulted the sensitivity of 96.6% (95% CI: 87.4–99.4%) and specificity of 64.3% (95% CI: 50.8–76.0%). Forty-four facilities used Kyokuto PZA liquid medium (Kyokuto PZA; Kyokuto Pharmaceuticals) and 16 used MGIT series PZA (MGIT AST PZA; Becton Dickinson). The specificities of Kyokuto PZA and MGIT AST PZA were

69.5% (95% CI: 53.6–82.0%) and 48.8% (95% CI: 24.5–73.5%), respectively. There was a significant difference in specificity between two kits ( $p=0.0043$ ).

[Discussion] The specificity of current PZA DST kits was quite low. There already exist several reports that are showing the low specificity of MGIT AST PZA, the Kyokuto PZA test also showed less than 70% of specificity. Due to the relatively short TAT of liquid PZA DST, it will be happening that the doctor stops PZA in the standard regimen according to the wrong DST result. PZA also contributes deeply for the treatment of drug resistant tuberculosis, then the accuracy of DST results are surely important. It will be recommended to conduct appropriate training of DST for PZA, to revise the standard operational procedure, and to use alternative DST like line probe assay or pyrazinamidase testing to improve the performance of PZA DST.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, Pyrazinamide, Drug susceptibility testing, External quality assessment

<sup>1</sup>Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), <sup>2</sup>Basic Mycobacteriology, Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University, Japan

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

