

### C. 研究結果

途上国においては塗抹検査を中心に外部精度保証(EQA、External Quality Assurance)への動きが活発である。その具体的な方法について検討を行った。

先進国を含む全世界的な精度管理の体系としては、薬剤耐性サーベイランスの展開をきっかけに設置された WHO/IUATLD による Supranational Reference Laboratory の認定とそのネットワークが重要である。アジア・太平洋地域では結核研究所が指定されており、多くの国の施設を指導している。

米国では外部精度保証制度による認定を検査施設にもとめており、その手順がマニュアルになっている。

日本では一般的に商業検査センターのほかに大小の病院検査室が結核菌の塗抹・培養・感受性検査等に様々に関わっており、系統的な精度管理は放置状態である。大きい施設では内部精度管理が曲がりなりにも実施されているが、それにしても系統的なものは見られず、とくに小さな施設においては問題が深刻とうかがえる。

### D. 考察

たとえば、結核罹患率が今の日本と同程度であった 1960 年代のデンマーク(人口約 500 万)では、全国の結核病院での結核菌培養検査を廃止し(塗抹のみに限定)、中央の国立施設(Statens Serum Institut)に集中していたことを想起すると、いまの日本における無数にある検査施設での精度管理の必要性とその実施上の困難さが目に見える。

内外の状況を本研究で俯瞰した結果、この精度管理(その強調する側面に応じて様々な呼称が与えられている)の必要性をはじめとして概念、当面用いるべき方法論は十分に確立されている感を深くする。要はそれをいかに実施し、維持するかである。

今後の研究は、関係機関へ働きかけを行い、自主的参加による実践を通してその意義の理解の浸透を図り、同時に監督官庁や関連機関(医師会、病院協会、学会など)へ働きかけて、認定制度などを導入することを目標とすべきである。

### E. 結語

日本の結核菌検査は大小の検査施設で無秩序に行われており、その精度に関しては何の系統だった管理も行われていない。診断や治療の基礎としての結核菌検査技術の精度保証が第三者機関によって行われるようになるために今後は実践的な研究が進められる必要がある。

### F. 健康情報

とくになし。

### G. 研究発表

1. 御手洗聡・森亨：肺結核症. 総合臨床 51: 1227-1233, 2002
2. 御手洗聡・和田雅子・尾形英雄・中島由槻：耐性から感受性菌に復帰したと思われる肺結核の 1 例. 結核 78: 74, 2003

### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

## 分担研究課題 結核菌検査の精度管理に関する研究 資料

分担研究者 御手洗 聡 結核予防会結核研究所疫学研究部臨床学科

### 研究背景

結核菌感染症に関して、日本では 10 万人あたりの新規登録患者数が平成 13 年度 27.9 となっており、平成 9 年から一時的に発生数が増加したものの平成 12 年以降は再び減少しつつある。この発生率はスウェーデンの 5.9 倍であり、米国と比較しても 4.8 倍の高率である。<sup>1</sup>また、大阪市では依然として 82.6 と高率であるなど、これまでの一般的な国民病としての伝染病ではなく、経済の悪化等を背景として都市に蔓延する疾患の様相を色濃くしている。

しかしながら、絶対数で新規登録患者数 35,489 人という数字は決して大きなものではない。このような背景から、一般内科外来等で結核患者に遭遇する事はあまり頻度の高くない事象となっており、それゆえ Doctor's delay 等の診断の遅れが見られがちである。結核の診断は臨床症状、放射線検査所見等の総合的評価に基づくが、結核菌（抗酸菌）検査が最も診断的価値の高い検査法であることは言うまでもない。細菌学的検査は菌種の同定や薬剤感受性試験などを行う上でも必須であるが、特に抗酸菌検査は菌の性質の特殊性等から実施が容易でない。さらには検査結果が患者個人あるいはその周辺に与える公衆衛生上の影響が大きいため、検査の信頼性には十分な配慮がなされなければならない。

しかし現状では臨床的にも抗酸菌検査の重要性が十分に理解・把握されておらず、平成 12 年度の結核緊急実態調査では 6,023 人の肺結核患者中 915 人で培養検査が実施されていない（あるいは情報が把握されていない）等、その重要性が正しく認識されていない。<sup>2</sup>このような状況下では、検査室において抗酸菌検査が正しく実施されているか否かを臨床家がコントロールすることを期待するのは困難と思われ、抗酸菌検査の精度管理はシステムとして自律的に行われる様に設定されるべきものと思われる。

そこで、一般病院検査室や検査センターにおける抗酸菌検査の現状を解析し、現状に対応した精度管理システムについて検討する事が必要と考えられた。

### 研究目的

日本における抗酸菌検査の現状を調査・解析し、国際的にも通用する適切な精度管理システムについて検討する。

1. 日本国内の現状での抗酸菌検査の実施状況について検討する。

2. 日本国内の現状での抗酸菌検査精度管理の実施状況を検討する。
3. 日本以外の抗酸菌検査精度管理の実施状況とその方法について検討する。
4. 抗酸菌検査精度管理のシステムを策定する。
5. 抗酸菌検査精度管理の具体的な実施方法について検討する。

## 研究方法

### I. 文献調査

これまでに日本国内で実施された一般細菌・抗酸菌検査精度管理の実施方法や問題点について文献的に考察する。また、日本以外で実施されている精度管理の方法について調査する。

### II. 面接調査

これまでに一般細菌あるいは抗酸菌に関して検査精度管理にかかわる研究を行っており、専門家としての発言が多い人物に抗酸菌検査精度管理の現状について面接調査を行う。また、衛生検査所で精度管理を担当する責任者にも面接調査を行う。調査内容は基本的に以下の項目に従い、それぞれの項目ごとの実践状況・方法、問題点、対策等について質問する。

- 1 現状での対象範囲（質問者ごとに異なる。専門家については国内全般に対する意見を、検査センターなどの責任者にはその監督する検査室についての意見を求める）における、抗酸菌検査制度管理に関する総括的意見
- 2 内部精度管理
  - 2.1 データ管理
  - 2.2 抗酸菌塗抹検査
  - 2.3 抗酸菌培養検査
  - 2.4 抗酸菌同定検査
  - 2.5 抗酸菌薬剤感受性検査
  - 2.6 抗酸菌核酸増幅検査
- 3 外部精度管理
  - 3.1 抗酸菌塗抹検査
  - 3.2 抗酸菌培養検査
  - 3.3 抗酸菌同定検査
  - 3.4 抗酸菌薬剤感受性検査
  - 3.5 抗酸菌核酸増幅検査

### III. 医学領域以外の検査・製品精度管理基準からみた抗酸菌精度管理の評価

現在、工業・製造業などの分野では世界的に ISO9001 などの精度管理システム評価が一般化しつつある。これは出来上がった製品そのものの品質を評価するものではな

く、それが生産されるプロセスを管理し、精度を維持しようとするシステムで、国際的な取引などには必要不可欠な基準である。結核を含む抗酸菌感染症検査のシステムは現在基本的に国ごとにまちまちであり、全てを同じ基準で評価することが困難である。将来的にこれらの検査にも「国際標準」の考え方が導入されることは確実であり、ISO の考え方から抗酸菌の精度管理のあり方を検討する。

#### IV. 関係法規からみた精度管理

検査精度管理に関する関係法規から、精度管理のあり方を考察する。

#### V. 抗酸菌菌種同定検査のための方法開発

現在日本で行われている抗酸菌検査には①塗抹検査、②培養検査、③菌種同定検査、④薬剤感受性試験、⑤核酸増幅検査がある。塗抹検査については全世界的に精度管理の方法がほぼ定式化されている。薬剤感受性試験については、国内において5年に一度結核化学療法研究協議会が全国的サーベイランスを行っており、精度管理活動の一部として有効である。核酸増幅法の精度管理は、疑陽性・偽陰性の発生の可能性が高いことから比較的多くの研究が行われている。一般的に見て精度管理活動があまりないと思われるのは②の培養検査及び③の菌種同定検査であろうと思われる。

今回、菌種同定検査に関する精度管理活動を支援し、かつ容易ならしめるため、遺伝子による同定法について新たな試みを行いたい。現在 16S rRNA の遺伝子相同性による菌種同定が一般的であるが、これのみで同定が不能あるいは困難である場合があり、その他の鑑別方法として *rpoB* 遺伝子の配列の相同性による同定法が提唱されている。しかしながら、データベースが整備されておらず、結果を簡単に評価することができない。16S rRNA との組み合わせによる新たな判定システム構築を考える。

### 研究結果

#### I. 精度管理に関する国内外の活動

##### A. 海外での抗酸菌検査精度管理

抗酸菌精度管理に関しては、その国の医療システムが大きく影響する。日本のように各医療機関が個々に検査室を持っており、それぞれの実施する内容も異なる場合には精度管理は困難になる。一般的に塗抹陽性患者が公衆衛生上重要であり、結核患者の90%以上が発展途上国にいることもあって、結核検査の精度管理に関しては抗酸菌塗抹検査に重点が置かれている。

一般途上国の National Tuberculosis Program において、末端の検査室では抗酸菌塗抹検査のみを行う。抗酸菌（結核菌）培養に関しては中間あるいは中央レベルで数施設が行う程度であり、これらに対して National Reference Laboratory が精度管理の責任を負うことになる。また、それぞれの National Reference Laboratory に対し

ては地域ごとに Supra-National Reference Laboratory が設定されている。

表 1 Supra-national Laboratory Network

Laboratoire de la Tuberculose, Institut Pasteur	Algeria
Queensland Mycobacterium Reference Laboratory	Australia
Département de Microbiologie, Unité de Mycobactériologie, Institut de Médecine Tropicale	Belgium
National Institute of Public Health	Czech Republic
Instituto de Salud Publica de Chile	Chile
Centre National de Référence des Mycobacteries, Institut Pasteur	France
Kuratorium Tuberkulose	Germany
National Reference Center for Mycobacteria	Germany
TB Research Centre (TRC), Indian Council of Medical Research	India
Instituto Superiore de Sanita, Laboratory of Bacteriology & Medical Mycology	Italy
Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association	Japan
Korean Institute of Tuberculosis	Korea
National Institute of Public Health and the Environment	Netherlands
Instituto Nacional de Saude	Portugal
Unit for TB Operational Research and Policy, Medical Research Council	South Africa
CVU "Vall d'Hebron", Universidad Autonoma	Spain
Swedish Institute for Infectious Disease Control,(SIDC)	Sweden
PHLS Mycobacterium Reference Unit, Dulwich Public Health Laboratory, Dulwich Hospital	United Kingdom
Mycobacteriology/ Tuberculosis Laboratory CDC	United States
Department of Public Health, Massachusetts State Laboratory Institute	United States

#### WHO の規定する一般的な検査施設の構成と役割

##### 末端の検査室（病院・治療センターレベル）

基本的に抗酸菌塗抹検査のみを実施する。他の臨床検査を実施する検査室のひとつの機能として備えられる場合が多い。精度管理上は内部精度管理のみを行う。

##### ① 中間検査室（市・郡・県・地域レベル）

抗酸菌塗抹検査に加えて検体からの抗酸菌分離培養および結核菌群の同定試験を行う。自施設の内部精度管理以外に、下位の検査室に対して外部精度管理を行う。

##### ② 中央検査室（州・国レベル）

抗酸菌塗抹検査、分離培養、すべての抗酸菌の同定および薬剤感受性試験を行う。内部精度管理以外に、中間レベルに対する外部精度管理を行う。外部精度管理のガイドラインそのものの作成も担当する。検査マニュアル等の作成・更新・配付等にも責任を負う。国家結核コントロールプログラムとの協調・調整を行う。

註：国の規模によって、中央と中間施設の間に地域レベルの検査室が設けられる。

抗酸菌塗抹検査の精度管理の具体的方法については 2002 年に Association for

Public Health Laboratories (APHL)から WHO/IUATLD の認証の下に外部精度保証マニュアルが刊行されている。<sup>4</sup>

ここでは、精度保証とは抗酸菌塗抹検査の信頼性と効率を永続的に維持するために精度と再現性について監視する事であると定義し、精度保証の要素として、精度管理 (Quality control: QC あるいは Internal Quality Assurance: IQA)、外部精度評価 (External quality assessment: EQA)、質的改善 (Quality improvement: QI) の三つを挙げている。このうち特に外部精度評価について、当該の検査室の能力を他の上位の検査室と比較する事によって評価する事として定義し、この方策として Panel Testing/Proficiency Testing (塗抹検査試験)、Cross checking (スライド二重盲検試験) および On-site evaluation/Inspection (検査室立ち入り評価) があることを示している。特に最新の EQA ガイドラインでは Cross-checking の際のサンプリングについて感度、塗抹陽性率および検体数により必要なサンプリング数を統計的に算出し (ガイドライン巻末に付表)、これを完全に無作為に割り付ける (Lot Quality Assurance System: LQAS) 方法を採用している。

精度保証の実施に最も重要なのは「計画」であるとして、利用可能な資源 (物的あるいは人的)、有効性あるいは持続性からみて最適な QA の方法、対象の選定、責任の所在の明確化、実施期間等を検討しておくべきことが強調されている。また、実施に先立って参加者全員の同意 (あるいは共通意識) を励起しておくことも重要としている。結果については参加者にフィードバックし、問題点に関しては速やかに矯正行動をとることとして、この立案→実践→評価→改善の一連の行動を連環させることが肝要と述べられている。

#### 抗酸菌塗抹検査の外部精度管理におけるスライド選択法

基本的に、通常業務としての塗抹染色の質を評価するには、全てのサンプルから完全に無作為に標本を抽出し、全体に対する代表性を確保する必要がある。具体的には設定した感度、特異度および信頼区間に従って抽出数を決定する。今回出版されたガイドブックによると、例えば年間 250 件の塗抹検査を行い、陽性率が 25%であった場合、感度 80%、特異度 95%、 $d=0$ 、信頼区間 95%を採用すると、巻末の表から 96 サンプルをチェックする必要があることがわかる。この場合、 $250 \div 96 = 2.6$  となる。2.6 を 2 と考えて最初から 2 つおきにスライドをサンプリングし、96 枚になるまで行うというのが今回の方法である。

註：このサンプリングについて Boston University の Dr Laing から方法的に誤りがあるとの指摘がなされている。彼の指摘によると、今回のガイドラインにある方法では完全に無作為ではないとしており、コンマ以下の数字を切り下げるのではなくこれをランダムなサンプルから開始して単純に加算していき、それぞれの数字を切り上げて無

作為抽出とするべきであるとコメントしている。<sup>5</sup> 具体的に上記の場合に当てはめると、 $2 \times 96$  では 192 となり最後の 58 枚は最初から選より漏れており、完全な代表とは言えないとするものである。また、抽出開始点も無作為でなければならず、一枚目から開始すると常に一枚目はサンプリングされることとなり、代表性に問題がある。よって、前出の条件下では、例えば乱数表などから数字を求めて、これを 2.6 に掛ける事によって開始点を得る。もし 47 という数字を用いれば、これを 0.47 と解して  $2.6 \times 0.47 = 1.22$  となり、常に繰り上げるようにして開始スライドを 2 枚目とする。次のスライドは  $1.22 + 2.6 = 3.82$  で、繰り上げて 4 枚目となる。さらに次は  $3.82 + 2.6 = 6.42$  で 7 枚目・・・という様にスライドを抽出していけば基本的に全体を代表するサンプルが得られることになる。それぞれの条件下での抽出数は添付の資料を参考にされたい。(資料1)

### 培養検査に関する精度管理

WHO のガイドブックでは、精度管理に関して以下のように述べられている。

#### 内部精度管理

内部精度管理は信頼性と再現性を保証するため、定期的に行われる必要がある。また、精度管理プログラムを価値あるものにするためには、実践可能である事が必要であると述べられている。

内部精度管理は通常以下の項目に関して行われる。

- 検査室内アレンジメント（機器の配置等）
- 機材
- 検体の採取と輸送
- 検体の取り扱い
- 試薬と培地
- 培養方法
- 結果の報告

ここで、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、実際的な手順の通常の使用、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志の疎通であるとしている。内部精度管理の実施のタイミングについては基本的に検査実施毎あるいはバッチ交換毎となっている。<sup>6</sup>

#### 検査室のアレンジメントについて

- ① 検査室の扉はいつも閉じられていること。器具は動線に従って効率的に配置されていること。室内は清潔に保ち、少なくとも一日に一回は効果的な消毒薬でベンチ上を拭くこと。

- ② 全ての手順書は正確に記述され、いつでも閲覧可能な様に検査室内に保管されていること。全ての変更点は変更日を記載し、検査室の管理者の了解を得ていること。
- ③ 全ての記録は最低2年間保存されていること。異常の範囲としては標準偏差の2倍(2SD)までは許容可能とされている。<sup>6</sup>
- ④ 検査室内の手順は須く一般の微生物学の成書、マニュアル、雑誌等にて知られているものであること。(証拠のないものや検査室毎に特異なものでないこと)

#### 検査室の機材について

- ① 機材は全てメーカーの規格に適合するものであること。
- ② 全ての機材の操作および清掃に関する手引きは正しく保管されていること。
- ③ 機材管理サービスの記録は全ての機材について保管されていること。
- ④ 機材は定期的にモニターされるべきこと。
  - (ア)安全キャビネットに関して以下の項目は毎日点検すること
    - A) 空気の流量は Class I で 75 linear feet/min、Class II で 75-100 linear feet/min であること。
    - B) 排気ダクトのゲージをチェックすること。もしゲージが適性以下の流量であることを示している場合にはフィルターを交換すること。
  - (イ)Class I および II の安全キャビネットでは年に一回は以下の試験を行うこと。
    - A) 下降流の速度と流量
    - B) 向内流速試験(開口部からの流速測定)
    - C) 気流パターン試験(気流の方向を調べ、外部への漏れがない事を確認)
    - D) HEPA フィルター漏気試験(吸気・排気の HEPA フィルターに漏れがないことを確認)
    - E) キャビネット漏気試験(キャビネット自体に漏れがないか圧力保持試験を行う。これは移動や修理の後にも行う。)
    - F) 漏電およびアース試験
    - G) 光量試験
    - H) 振動試験
    - I) 騒音試験
- ⑤ 遠心機：ブラシとベアリングを6ヶ月ごとにチェックする。
- ⑥ ふらん器：庫内の温度を毎朝記録する。湿計を庫内のいくつかの場所に置いて温度をテストする。
- ⑦ 凝固器：温度を毎日チェックする。培地作製ごとに内部を清掃する。
- ⑧ pHメーター：毎回温度補正を行う。標準液の使用開始日を記録し、劣化したもの



は交換する。毎回 pH 4.0 および pH 7.0 の標準液で補正する。

- ⑨ ウォーターバス：使用前および使用中に温度をチェックする。毎月清掃する。
- ⑩ 冷蔵庫：毎日温度をチェックする。毎月清掃し、3 カ月毎に霜取を行う。
- ⑪ 冷凍庫：毎日温度をチェックし、6 ヶ月ごとに清掃する。
- ⑫ ガラス器具：傷やひびのあるガラス器具は廃棄する。洗剤が残留していない事を確実にし、滅菌した器具は3 週間以内に使用する。

#### 検体および検査依頼書

- ① 検査は必ずあらかじめ決められた依頼者から一定の申請書による依頼があった場合にのみ行い、口頭指示では行わないこと。
- ② 依頼書は検体とは別に保存し、汚染された場合はオートクレーブ滅菌すること。
- ③ 適正に記入された依頼書とともに提出された検体のみを受領すること。また、検体自身も適正にラベルされていること。これらを満たさない場合は受領を拒否すること。
- ④ 検体の質をチェックし、報告の際は質についても記載すること。
- ⑤ 検体が容器から漏れている場合は直ちにオートクレーブ滅菌し、検体の再提出を求めること。
- ⑥ 検体の受領時刻を記録し、採取から受領まで時間が経過している場合は報告書に明記すること。

#### 試薬および染色

全ての試薬について受領日と使用開始日を明記する。品質に問題がある試薬は記録後速やかに廃棄する（あるいは別の場所に移す）。基本的に試薬のストックは6 ヶ月以内として、無用な期限切れを避けるためストックの定期的な循環を行う。

#### 検体の前処理

- ① 喀痰検体は遠心機の容量にしたがって一群ごとに処理する。
- ② 毎月の培地の汚染率を記録し、2-5%に収まっている事を確認する。汚染率2%以下の場合は雑菌処理が過剰であり、多くの結核菌も雑菌とともに処理されていると考える。5%を越える場合は、十分に均一化されているかどうか確認する。遠心チューブの内壁が十分に処理される様に十分に転倒攪拌する。

#### 培地

- ① 卵培地の作製には新鮮な卵を準備する。
- ② 凝固時間と温度をチェックする。培地が変色していたり、泡のあるようなものは

廃棄する。

- ③ 全群の培地を 24 時間、35～37℃に保ち、培地汚染がないことを確認する。
- ④ 全ての培地を冷暗所（冷蔵庫内）に保存し、4 週間を経過したものは廃棄する。

#### 培養方法

- ① 厳密な無菌操作を行い、それぞれ別のピペットやエーゼを使用してクロスコンタミネーションを避ける。
- ② 大量の菌が発育した検体があった場合、それに引き続いて陽性となったいくつかの検体あるいは少数のコロニーが陽性となった検体に関してはコンタミネーションの可能性を考慮する。

#### 生化学試験

試薬は指示書通りに準備し、適当な陽性および陰性コントロールを置いて期待される反応があるかどうかチェックする。

#### 水

滅菌蒸留水および水道水について、抗酸菌の混入を定期的にチェックする。水に異常がありそうな場合は 200～250ml の水をいくつかの遠心チューブに分けて遠心し、沈渣を合わせて塗抹標本を作製する。あるいは、1000ml の水を 0.22μm のフィルターでろ過し、フィルター自体を培地上で培養する。

#### 外部精度管理

培養検査の外部精度管理は既知の検体を各施設に送付し、Proficiency Testing として以下のように行われる。

- ① *M. tuberculosis* (H37Ra) 及び *M. fortuitum* を混じた喀痰検体をそれぞれ一組（二本）ずつ作成する。同定検査についても評価する場合は他の非結核性抗酸菌を準備する。
- ② 必要であれば雑菌処理のステップを評価するため *E. coli* を混ざる。
- ③ 抗酸菌陰性の喀痰検体が入手困難な場合は、1%メチルセルロース溶液 1000ml にホモジナイズした全卵一個を混じるとやや膿性の喀痰様となる。
- ④ 各施設で通常の手順に従って培養、同定検査を行う。
- ⑤ 結果を中央での判定と比較する。

また、精度管理に関して、必ず統一された（基本的には国家レベル）検査方法、手

順、技術を持つこととされている。(6)

精度管理先進地域であるアメリカでは Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS) が Clinical Laboratory Improvement Amendment (CLIA) に基づいて、その認証を受けたいいくつかの組織を通じて精度管理プログラムに参加する事を義務づけている。代表的なのは College of American Pathologists (CAP) であり、検査室をいくつかのカテゴリーに分類して精度管理を行っている。これは精度管理の概念から実施の要領、認証の維持に至るまで詳細にマニュアル化されている。(資料 2, 3)

表 2 検査室の分類<sup>7</sup>

分類	検査室機能
1	抗酸菌塗抹検査のみ
2	抗酸菌塗抹検査および培養検査
3	抗酸菌塗抹検査、培養および結核菌同定検査
4	抗酸菌塗抹検査、培養および抗酸菌同定検査
5	抗酸菌塗抹検査、培養検査、抗酸菌同定検査および薬剤感受性検査

表 3 内部精度管理に関する CLIA および CAP の規定条件<sup>7</sup>

方法	必須事項	
	CLIA	CAP
抗酸菌塗抹 (蛍光法)	陽性・陰性コントロール毎週	陽性・陰性コントロール毎回
抗酸菌塗抹 (キニヨン/チール・ネールゼン法)	陽性コントロール毎週	陽性コントロール毎週
生化学試験	陽性コントロール試験日毎	陽性・陰性コントロール試験日毎
DNA プローブ法	陽性・陰性コントロール試験日毎	陽性・陰性コントロール毎回
市販培養培地試験 試薬	NCCLS ガイドライン バッチ (あるいは出荷) 毎に陽性・陰性の反応性をチェック	NCCLS バッチ (あるいは出荷) 毎に 陽性・陰性の反応性をチェック
BACTEC NAP 試験	陽性コントロール検査日毎	陽性・陰性コントロール検査日毎
薬剤感受性試験	感受性株を検査週毎	感受性株検査毎

FDA に承認されている市販キットを用いる場合は、その手順説明書の精度管理基準を遵守する。HPLC を用いた同定法については特に言及していないがいくつかの市販のコントロールを用いることを勧めている。

CAP における品質改善活動 (Quality Improvement: QI)

QIとは基本的にQCと重複する部分を多く含むが、QCが多分に手順や方法といった面に関する概念であるのに対して、QIはその結果や産物に対する概念である。Q-PROBES（同レベルの施設間の比較サーベイ）あるいはQ-TRACKS（施設内部の長期継続的サーベイ）という方法により、QI後の評価などを行う。<sup>8</sup>

#### CAPにおけるProficiency Testing (PT)

基本的に各検査室にサンプルを送付し、通常の検体と同様に処理し、検査方法と結果を報告する。PT精度管理プログラムとして認められるためには、①最低年二回は試験を行うこと、②各試験には最低5検体含まれること、③ヒト検体で最もよく見られる5菌種 (*M. tuberculosis* complex, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. avium* complex, *M. terrae*, *M. fortuitum*) を含むこと、④少なくとも半分のサンプルは常在細菌と混合されていること、⑤感受性検査については必ず耐性パターン既知の結核菌を含むこと、⑥少なくとも施行6ヶ月前までにUS Department of Health and Human Services (HHS) に実施内容を届けることが必須とされている。

#### 海外における精度管理の実践的研究から

Kinyanjuiらは、いくつかの末端の検査室（病院）において、塗抹検体を作成する際に1検体あたり二枚作成し、これを中央へ送って再検する方法と通常の再検法を比較して、複製する場合はコストと時間の問題があり、再検については輸送中の破損などが問題になるとしている。<sup>9</sup> よく言われる検体の褪色については、検査の際の陽性コントロール検体をチェックする事でこれを評価する事が可能である。検体を再染色する方法もあるが、薄い塗抹では抗酸菌が失われる可能性があるとの指摘もある。<sup>10</sup>

Monkらは精度管理活動への参加の意識および日常の検査への意欲を高めるため、検査室間で検体を交換し、審判を置いて相互に結果を比較し、フットボールの試合に準えて勝敗を競うという方法を試みている。<sup>11</sup>

Aberらは、人工的に作製した喀痰をすべてオートクレーブ滅菌し、特殊な薬剤耐性パターンの結核菌を含む喀痰検体とともにいくつかの検査室（アフリカおよびイギリス）に送付して、耐性結核菌の感受性パターンをマーカーとして、陽性検体から陰性検体へのコンタミネーションを評価している。これによると滅菌した検体において0.4～1.8%の割合で培養陽性の結果が得られている。マーカー付きの検体を用いることでコンタミネーションの原因を推定する事が可能である。<sup>12</sup>

#### 内部・外部精度管理以外の精度管理上の重要な因子

精度管理プログラム以外に精度上重要な因子として、技師の訓練と意識の維持がある。精度管理を如何に精緻に行っても、最終的には検査の質は検査技師の練達度にか

かっており、その維持には一定の訓練と経験が必要である。そのためには定期的なリフレッシュトレーニングへの参加や他の施設との交流は不可欠である。また、一定期間に一定の検査量の依頼・実施がない施設については検査を中止して他の施設と統合すべきである。検査に対する職業的な意識も重要であり、モチベーションを維持するためにも臨床との緊密な連絡、結核対策プログラムへの参加などにより結核対策チームとしての意識を持たせることが重要である。

## B. 日本国内における抗酸菌検査精度管理

抗酸菌検査の精度管理に関する活動は散発的には行われているが、これまでのところ、日本国内で大規模かつ系統的行われた抗酸菌検査精度管理活動はないと思われる。これまでに幾つか行われた精度管理に関する研究について以下に概要を述べる。

### 1. 結核療法研究協議会による5年に一度の薬剤耐性サーベイランス調査

結核療法研究協議会（以下療研）では、5年に一度全国の抗酸菌検査施設に呼びかけ、有志を対象として結核菌薬剤感受性検査に関する調査を行っている。

最新の結果は2001年に報告されており、方法としては、1997年6月1日から11月30日までの期間に入院した患者のうち、抗酸菌培養陽性の全症例を対象として菌株を結核予防会結核研究所細菌学科に送付し、同研究所において感受性試験および菌種同定を行っている。この際、各施設から対象患者についての臨床的情報（初回あるいは再治療等）および各施設での感受性検査結果について調査票を提出する。結核研究所をリファレンス施設として各検査室の検査結果を評価している。

調査結果によると、<sup>13</sup>参加した78施設から送付された2,167株の抗酸菌について菌種同定を行っているが、それぞれの施設で使用している同定法が異なっている（表4）。また、リファレンス施設と各検査室での同定の不一致も見られている（表5）。

感受性検査方法もそれぞれの施設で異なっており、INH 1.0 $\mu$ g/ml、RFPおよびSMについてはリファレンス施設の結果との高い一致率が見られているが、INH 0.1 $\mu$ g/mlとEBについては一致率が90%以下であり、各検査施設で耐性と評価される例が多かった（過大評価）とされている。感受性検査の一致率は方法によって大きく異なっており、普通法では中央値95.9%（75.0～100%）であるが、マイクロタイター法では93.2%（37.5～99.4%）、ウエルパック法では96.4%（75.0～97.8%）であったとしている。

表 4 各施設結核菌群の同定鑑別に利用された方法

方法	施設数
ナイアシンテスト+他の方法	49
アキュプローブ+他の方法	27
DDH マイコバクテリア+他の方法	44
核酸増幅法+他の方法	25
従来 of 生化学的方法+他の方法	17

表 5 各施設と結研の同定不一致

各施設	結核研究所	培養数
<i>M. tuberculosis</i>	MOTT	32
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> +MOTT	16

MOTT: Mycobacteria other than tubercle bacilli

この研究から、結核と診断された症例の中に非結核性抗酸菌感染の混在がありうる  
ことが明確であり、特にナイアシン試験等ではある種の非結核性抗酸菌も陽性になる  
ことが知られており、結核検査指針の推奨するごとく遺伝子相同性を基礎とする同定  
法を用いる事が重要であろう。また、市販の遺伝子同定法にて明確に判断できない検  
体について迅速に判定を行うシステムが必要と考えられる。

感受性検査に関しては、方法によって差異が大きくなることが示されており、標準  
菌株を用いた精度管理の必要性が示されている。

いずれにしても、この研究では有志の参加施設のみを対象としており、これらの施  
設についてはある程度の技術的な自負はあるものと思われる。問題は参加していない  
施設（特に Private sector）であり、何らかのシステムのアプローチが必要であろう。

## 2. 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会による抗酸菌検査の精度管理（1）市販 培地の発育試験成績について<sup>14</sup>

この研究では結核研究所より *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC25177)、*M. kansasii*  
(ATCC12478)、*M. scrofulaceum* (ATCC19981)、*M. intracellulare* (ATCC13950)および  
*M. fortuitum* (ATCC6841)の5菌株を各施設（8施設）に送付し、同時に送付した5種類の  
市販卵培地に標準化した方法で菌を接種し、発育支持力について検討している。

結果的にそれぞれの培地に関して、標準菌株を用いた限りでは発育支持力に差異は  
ないという結論である。これにより基本的に市販培地のいずれを用いても培養結果に  
差が出ることはないと言われていたが、試験に供されることが明確であることを考えると、  
あるいは各メーカーにて十分に良好な培地のみを提供した可能性もあり、やはり  
通常の培地について各施設で定期的な検討を行う必要があると考えられる。また、臨  
床レベルでの初回抗酸菌分離を考えると前処理の方法によって分離率は大きく変化

する事から「培養検査」としては前処理の方法の統一が必要であることの証明であるとも言える。

### 3. 日本臨床衛生検査技師学会・微生物検査研究班による抗酸菌検査に関するアンケート調査<sup>15</sup>

日本臨床検査衛生技師学会では 1999 年に抗酸菌検査を行なっている施設を対象として、その実践的内容に関するアンケート調査を行っている。

これによると 130 施設（大学病院 29、国立病院 21、公立病院 40、市立病院 40）からの回答で、抗酸菌塗抹検査では 72%の施設が直接塗抹法を用いており、集菌法を用いていたのは 23%であった。染色方法としては 60%がチール・ネールゼン法（Z-N 法）であり、蛍光法と Z-N 法の組み合わせが 27%であった。蛍光法だけとする施設が 6%見られている。報告もガフキー号数による記載が 97%であり、77%の施設が 24 時間以内に結果を報告している。

培養に関する喀痰前処理も一様でなく、喀痰融解剤を使用して均一化し、遠心沈渣を用いているのは 32%であった。また、融解剤の添加量も等量から 10 倍量までさまざまであり、前処理時間についても 15 分とするものが 27%で一番多かったものの、2 分～1 晩とまちまちであったとしている。小川培地を中心として 1～2 種類の培地で培養を行い、その平均的培地汚染率は 1.6～3.3%となっている。

菌種の鑑別・同定検査には 2～3 種類の方法を併用している施設が 59%であり、DDH マイコバクテリアと核酸増幅法が多く利用されている。しかしながら、同時期の日本臨床衛生検査技師学会調査では、3312 施設の 54.7%がナイアシンテストのみで同定しているとの結果である。

薬剤感受性検査についてはマイクロタイター法が 50%を占めており、次いで試験管による普通法が 25%となっている。78%の施設が 1 種類の方法で感受性検査を行っており、簡易法が広く使われていることがわかる。

この調査では抗酸菌検査を行う施設についても検討しており、大学病院や国立病院では 70%以上の施設で安全キャビネットを用いて検査を実施しているが、公立や私立の病院ではおよそ半数程度にとどまっていることが示されている。同時期の日本臨床衛生検査技師学会調査では、抗酸菌検査を実施している 1622 施設のうち、安全キャビネットを使用しているのは 24%としている。

この研究からわかるように、ある程度施設規模の大きい大学病院や公立病院などでは比較的検査の安全性にも配慮し、フェイルセーフを考えた検査を行っていることがわかるが、事業規模の小さな施設では安全を含む精度管理が不十分であることが考えられる。

また、喀痰塗抹培養については十分に標準化されているとは言い難く、施設間の結果を比較検討することも困難と考えられる。さらに培養検査、感受性検査、同定検査の全てについて統一された方法あるいは手順が定められておらず、2000年に検査指針が改定されているので改善は見られていると思われるが、現状で統一的に一定の手段で全国的に精度管理を行うことは困難と考えられる。

## II. 面接調査から得られた抗酸菌検査の現状に関する意見

### A. 外部精度管理

#### 専門家 1

日本の臨床検査外部精度管理には第一に日本臨床検査技師会の精度管理事業（年一回：およそ30年の歴史あり）がある。基本的に微生物検査に関する Proficiency Testing であり、全国に約1500あると推定される（技師会に加盟している1200施設ほどは確実だが残りは推定）のうち、1200施設程度が参加している。臨床検査技師会に所属する検査技師の数はおよそ5000人程度で、微生物検査にかかわるのはそのうち400～500人（約10%）程度である。

方法として、一般細菌に関して中央で準備したサンプルを送付し、1週間ほどで結果を返送してもらう。これまでに抗酸菌に関して同様の精度管理試験が行なわれた事はない。また、全国に抗酸菌を扱っている検査室がどれだけあるかは正確には把握されていない。抗酸菌塗抹検査、培養、同定、感受性試験のそれぞれのレベルに対応した検査室が各々どれだけあるか不明である。

第二には日本医師会の外部精度管理調査（年一回）があり、医師会で行なっている外部精度管理調査にはおよそ800程度の施設が参加している。

第三には都道府県レベルでの精度管理事業がある。都道府県、医師会、技師会が連携して行なう地方レベルでの精度管理調査で、都道府県の事業（あるいは補助事業）として予算執行し、医師会が窓口となって実務を技師会が執り行う。20都道府県程度で実施されていると思われるが、予算が比較的はっきりとしているのは埼玉県等数県のみと思われる。これも一般細菌では行われるものの、抗酸菌では実行されていない。

#### 専門家 2

抗酸菌の塗抹検査の精度管理などは重要であるが、人員、検体の輸送、（試験や準備に要する）時間の問題もあって、実行は困難かと思われる。さらには均一な検体を作製する技術的困難もあるので、具体的には一度スライドを送付し、結果とともに返送してもらって結果を評価することになると思われる。あるいは評価と言うことを強調せずに臨床衛生検査技師会のサーベイのように教育的な意味合いでスライドを送



付し、結果のみを見る方法しかないであろう。医師会のサーベイランスは評価的な側面が強いため、これに依って具体的な方法の一つとして、先に述べたサーベイランスのシステムを利用し、追加的に抗酸菌のスライドを送付するのは実行可能性が高い。臨床衛生検査技師会のチャンネルを利用するのであれば、施設を幾つか指定してパイロット的に（あるいはやや広汎にも）外部精度管理（基本的に Proficiency Testing）を実施することは比較的容易と思われる。いずれにしても精度管理が重要であるとの認識はあるので、施行するという事になれば参加する施設は多いと思われる。

今現在一番重要と思われるのは薬剤感受性検査の精度管理であろうと思われる。特にビット培地やマイクロタイター法などの簡便法に問題が多い。問題がある方法についてはこれを明確に示し、販売を中止させる等の対応を考えるべきである。外部精度管理として実行するにはやはり検体の準備や輸送が困難と考えられる。

アメリカの CAP サーベイは微生物検査の一部として抗酸菌の精度管理を行なっているが、稀な非結核性抗酸菌を出題するなど難度は高い。これに参加している施設はあると思われる（20 施設程度）が、費用も結構かかるらしく、全体に普及するには困難があると思われる。

精度管理という意味合いではないが、臨床検査技術師の試験には抗酸菌の実技試験も含まれている。これは資格試験であり取得によって給与が上がるなどのメリットがあることが一つの動機づけとなっている。検査室にとって抗酸菌検査は基本的に「片手間」であるが、実施に時間がかかるなど面倒であるので嫌悪する傾向があると思われる。実施が簡単である事が重要である。

どの検査室がどのレベルの検査を行なっているのかの情報も不十分である。特に民間の施設での実態は不明であり調査は必要と思われる。

さらに外部精度管理の方法としては臨床検査技師が集まる機会をとらえるか、積極的に募集するかして講習会（トレーニング）を行なうことが考えられる。臨床微生物学会でも同様の実技講習を年に一回行なっているので、抗酸菌検査の実習を含めてみるのも一つの手段である。

### 専門家 3

外部精度管理を実施する主体がないため、全く行われていない。スタンスとしては信頼出来る母体があればコストをかけても実施する用意がある。基本的に国や学会の認証があることが理想的である。

## B.内部精度管理

### 専門家 1

技術的精度管理について、抗酸菌に関しては①標準株を検査室で維持していないと

ころが殆どである、②長期保存方法がはっきりしない③日常業務のなかで対処するのは作業量的にも困難である、等の理由により 2000 年度版結核検査指針にある精度管理法でさえ行なっているところは殆どないと考えられるとのことであった。

感受性検査については NCCLS に従って行なうことは可能であるが、実際に検査を行なっている施設でも、精度管理としてこの方法をとっているところは半数程度と考えられるとのこと。

施設や試薬、培地等の精度管理については、基本的に省力化、自動化の方向が望ましい。上記の様に内部精度管理が困難な状況なので、培地等の精度管理は外部（企業等）に任せることになる。各企業は ISO の取得など精度管理に真剣に取り組んでいるが、厳密な精度管理を求めると PL 法等の関連もあり、場合によっては取り扱いを中止してしまう可能性もある。別の問題として検査室施設等の問題があるが（安全キャビネットの設置等）、現在でも安全設備を整備している施設は少ない（感染するのは技師の未熟のせいであるとする向きさえある）。コストの問題上自主的にこれを整備させるのは困難なので、政府が補助金を出すなどの対策が必要であると考えられる。これらの対策なしに規制のみ強化すると施設内での検査を中止して外注とするところが増加すると思われるが、検査センターでも微生物検査は基本的に非採算であり、数量が増加するとこれも検査を受注しなくなる可能性がある。

現状では、臨床家の認識不足もあり、微生物検査室が守られているとは言い難い。このような状況下でコストの増大をもたらすような規制強化はかえって不利益が大きいと考えられる。

## 専門家 2

塗抹検査では特に蛍光法に問題が多いと思われる。検査ごとに正しく陽性と陰性のコントロールを置いている施設がどれだけあるかさえ不明である。染色液についてもロットごとにチェックしているかも不明である。培養のための培地の精度管理などはまず実践的でない。コントロールに使用する菌株に関しても、病原性の株である取り扱いに困難があるうえ、結核検査指針にあるようなコントロール株すべてを保有維持するのはほぼ不可能である。

内部精度管理がどの程度行われているかは殆どわかっていないので、特に **Private Sector** に重点を置いて調査を実施してみることは意義があると思われる。

検査の方法は二極分化するべきかもしれない。ある程度の間違いは起こりうるものの実施が簡単で管理の容易な方法を臨床に周知して利用する施設と、高度なレファレンス機能を有した施設とを区別するのも一つの方法である。施設の機能と能力によっては検査する項目を制限する必要もあると考えられる。

### 専門家 3 (衛生検査所)

基本的に検査室は 24 時間稼働しており、抗酸菌塗抹検査に関しては受付直後に検査を実施し、24 時間以内には結果を報告している。その他の検査 (培養や核酸増幅) についても、遅くとも 12 時間以内には検査を施行している。データは最低でも 3 ヶ月から 6 ヶ月は保存している。定期的に統計的処理を行い、現場の精度管理にフィードバックさせる。データの管理は別個に精度管理部門を設けて管理している。蓄積されたデータについては平均的陽性率などを求めているが、これは今後地域的なファクターを持たせたより細かなデータベースに改変する予定である。

抗酸菌塗抹検査について、前処理としては基本的に集菌法を用いているが、医師によって集菌法ではなく直接塗抹による Gaffky 号数を未だに求められるため、直接塗抹を行う場合もある。精度管理上、毎回陽性および陰性コントロールをおいて染色を行い、ディップする染色液については毎回交換している。また、試薬のロット交換ごとに陽性・陰性コントロールによりチェックを行っている。抗酸菌検査に用いる試薬はそれぞれのロットの規模が小さいため頻度としては一週間に一回程度となる。Proficiency Testing については年に最低 4 回はテストを行っているが、これははっきりと明示して行う場合と、架空の病院などを設定して盲験する場合とがある。また、クロスチェックとして検査センター間で検体を巡回させ、それぞれの検査センターでの結果を比較する場合もある (内的外部精度管理)。On-site-visit についてはデータ異常が発生した時点で行われる。

使用される試薬については、購入するメーカーから製品の品質保証書を取っているが、染色性については自施設で結核検査指針にもとづいてチェックを行っている。

抗酸菌培養試験に関して、発育試験については結核菌標準菌株をもとに、月一回あるいは製品ロットごとに発育支持力を検査している。基本的に結核検査指針に沿っている。培養検査については液体培地が現在 70% 程度のオーダーであり、残りが固体培地となる。液体培地のみをオーダーされた場合、センターとして自主的に小川培地を追加している。およそ 1% の検体で小川培地のみ陽性である。やはり製品については外部からの購入であるが、品質保証書をもらっているが自社での製品管理は実行している。

同定検査については現在最初に Accuprobe を用いて検査を行ない、その後判定不能の場合にのみ DDH マイコバクテリアを用いて同定している。この段階で同定不能の菌株については「同定不能菌」として報告する。精度管理上、*M. tuberculosis* 株、*M. avium* 株により月一回、あるいは使用ロットの変更ごとにチェックを行う。

検査センターへの抗酸菌検査外注について、基本的に日本の細菌検査の市場は 580 億円程度であり、そのうち外注に出されているのは 180 億円分程度である。細菌検査はコスト的には赤字であり、現在の保健点数では採算は取れない。企業としての公的

な側面から（黒字部門ばかり実施すると批判がある）実施しているものの、これまではなるべく受け付けない方向であった。今後は受け付けるが、積極性があるわけではない。

### III. International Organisation for Standardisation (ISO)による品質管理システムの医療への適用<sup>16</sup>

#### ISO の内容と仕組み

ISO は、国際標準機構が定めた国際規格のことであり、スイスのジュネーヴに本部を置く国際標準機構（民間の非営利組織）が 1947 年に創設され、各加盟国に一ヶ所ずつ認定機関を設置して、審査登録機関の認定・審査等を行っている。日本における認定機関は財団法人日本適合性認定協会（JAB）である。

日本で普及している代表的な規格は ISO9001 である。これは品質マネジメントシステムであり、品質マネジメント 8 原則を中核とする PDCA のスパイラルアップによる継続的改善のしくみを特徴としている。これは国際的に通用する、定量的プロセス評価を重視した全員参加型のシステムである。医療に関しても国際的に検査室の管理、検査データの管理のための基準が提案され、世界的に認証する段階に到達している（ISO11737 等）。

表 6 品質マネジメント 8 原則

顧客重視	医療提供施設は、その顧客（患者等）に依存しており、そのため現在と将来の顧客ニーズを理解し、顧客要求事項を満たし、顧客の期待に応えるよう努力すべきこと。
リーダーシップ	リーダーは医療提供施設の目的と方向を一致させるとともに、その達成に十分参画できる内部環境を整備維持する。
人々の参画	全ての階層の人々は、医療提供施設にとっての基本的構成要素であり、その全面的な参画により、その施設の便益のためにその能力を活用することを求める。
プロセスアプローチ	医療提供施設の運営活動などに関連する資源が、一つのプロセスとして効率良く運営されることを求める。
マネジメントへのシステムアプローチ	医療提供施設の目的・方針を最も効率的に達成するため、相互に関連するプロセスを一つのシステムとし、明確にし、理解し、運営管理することを求める。
継続的改善	医療提供施設の総合的パフォーマンスの PDCA のスパイラルアップによる継続的改善を目標とすることを求める。
意思決定への事実に基づくアプローチ	医療提供機関での効果的な意思決定は、客観的な事実に基づくデータおよび情報の分析に基づいて行う事を求める。