

供給者との互恵関係	医療提供施設とその供給者（外注先等）は、それぞれ独立した存在であり、互恵関係により、それぞれの価値創造力を高める事を求める。供給者は医療提供施設に対するサービスや物の供給先を示すものであるが、これは連携・提携先と考えられ、この場合は「連携先満足」を示すものと考えられる。
-----------	---

PDCA のスパイラルアップ

PDCA とは以下のようなサイクルを指す。

P (Plan): 計画を立てる事

D (Do): 実施する事

C (Check): 点検する事

A (Act): 見直し、修正する事

PDCA のサイクルを完了すると、次年度には高次の品質目標を設定し、計画し、実行・点検・評価し、さらに改善を永続的に実現可能となる。

顧客満足

医療における顧客とは、言うまでもなく患者であるが、検査室に対する直接の顧客は医師であるとも言える。抗酸菌検査における顧客満足とはどのようなものかを考えれば、必要とされる品質とは何か自ずと明確である。医療の現場で抗酸菌検査に関してある苦情は、①複数検体提出のため何度も医療機関を受診するのが大変、②コストが高い、③検査結果（特に感受性検査）が遅い、④結果がわかりにくい、⑤侵襲的な検査が苦痛（困難）、⑥同定の間違いにより過剰な治療や検査を受けた、⑦複数の検査で結果が食い違うのはなぜか、⑧医療機関により実施可能な検査が異なるのはなぜか、⑨医療機関により検査結果が異なる事があるのはなぜか等様々である。これらの要求以外にも、明示されてはいないが意図されたサービス内容が既知である場合（検査の結果が正確であること等）、それらに対する要求を満たしている必要がある。また法令上の規制要求事項も満足していなければならない。

ここで言われている「満足」とは、決して最上の満足を意味していない。優良可で判断すれば、「可」程度を意味しており、あくまでも要求の達成が主眼である。

顧客満足の監視と測定

ISO9001 では顧客の監視・測定が規格要求事項（測定・分析および改善）として設定されている。医療提供機関は品質マネジメントの成果を含む実施状況の測定の一つとして、顧客要求事項の満足度合を、顧客の受け止め方などの情報を含めて監視する事とし、この情報の入手及び使用方法を決める事を求めている。これを抗酸菌検査にあてはめれば、患者あるいは医師の求めに応じて、的確な検査結果が提供されたか否

かを能動的（アンケート調査等）あるいは受動的な方法（顧客からの苦情等）により情報収集する事になると思われる。

顧客満足の定量評価

ISO9001では、顧客満足についての定量評価を規格として求めているが、要求を効果的・効率的に入手するためのプロセスを計画し確立する事、またそれらの情報を監視することを要求している。

品質関連責任者の選定

品質最高責任者の任務

組織における品質マネジメントシステムを確立し、文書化し、実施し、かつ維持するとともに、その有効性を継続的に改善する役割はトップマネジメント（一人あるいはグループ）が担う事となる。医療提供機関においては理事長あるいは院長ということになる。その役割は以下のようになる。

1. 法令・規則要求事項を満たす事は当然として、顧客要求事項を満たす事の重要性を組織内に周知する。
2. 品質方針を決定する。
3. 品質目標が設定される事を確実にする（環境を整える）。
4. マネジメントレビューを実施する。
5. 資源が活用出来る事を確実にする。

管理責任者の任務

管理責任者は品質マネジメントシステムの組織を推進、監視、評価、改善する実質上の責任を負う。その役割は以下の様になる。

1. 品質最高責任者の下、その組織の品質マネジメントシステムの運用、監視、評価、執行にかかる管理を行う。
2. 同上をPDCAサイクルにより改善する。
3. 事件事例の収集・分析・評価を行い、防止策を策定、実行する。
4. 各部門の品質責任者を管理・指導する。
5. 外部公報活動について、品質最高責任者を補佐する。

部門・品質責任者の任務

品質マネジメントシステムを実際の現場で動かし、推進する主体となる。その役割は以下のようになる。

1. 自己の担当部門の品質マネジメントシステムの推進・調整を図る。

2. 品質管理責任者の指示を受けて、担当部門での事故の内容分析を含む報告、その防止方法や改善方法に関する提言、顧客情報の収集や報告などを行う。
3. 上部での決定事項の自部門への伝達と調整を行う。

文書化および文書管理

文書化は、仕事（検査）のやり方の標準・基準を確定し、これを広く職員に周知し、個人による作業のばらつきをなくし、標準的な品質を得るために必要不可欠である。文書化されるべきものには、①品質マニュアル（方針を含む）、②規定（要領）、③手順書、④記録がある。

品質マニュアルの作成方法

品質マニュアルは品質システムの最高位にあり、品質方針を述べ、組織の品質システムを記述した文書である。ISO9001 では以下の事項を記述する事を求めている。

1. 品質マネジメントシステムの適用範囲、除外事項がある場合には、その詳細と正当な理由
2. 品質マネジメントシステムについて確立された文書化された手順またはそれらを参照出来る情報
3. 品質マネジメントシステムのプロセス間の相互関係に関する記述

規定、手順書類の作成方法

規定は、品質マニュアルにすべての手順の詳細を記述すると全貌が分かりにくくページ数も多くなってしまう場合に、手順を規定として記述する。さらに規定についてもページ数が多くなってしまう場合は、手順書に具体的な手順を記述する。これには目的、適用範囲、責任部門・役職、実施事項・手順内容、制定日・改定日、関連文書等の情報が含まれている必要がある。

記録

要求事項への適合および品質マネジメントシステムの効果的運用の証拠を示すために作成し、維持する事が求められる。このためには標準的な記録形式を作成し、内容を決めておく事が必要である。

文書管理

ISO9001 では文書管理に関して次のように要求している。

1. 発行前に内容を確認して責任者が承認する事。
2. 文書をレビューし、必要に応じて更新し、再承認する事。

3. 文書の識別および現在の改訂版の識別をすること。
4. 適切な版が必要なときに、必要なところで、使用可能にすること。
5. 文書が読みやすく、容易に識別可能な状態にすること。
6. 外部文書を明確にし、配布管理を行う事。
7. 廃止文書の誤用を防ぐ事。

以上の活動に必要な管理方法を規定する文書自体も作成しなければならない。

内部監査

内部監査員は、内部品質監査規定に基づいて内部品質監査を実施する。内容としては①個別の医療サービスの実現計画への適合性、②規格要求事項への適合性③施設の定めた品質マネジメントシステム要求事項への適合性について監査を実施する。

これまでに挙げた他の精度管理プログラムと ISO の概念の整合性を考えると、トップダウンで実行するリーダーシップや、全ての人々の参画についてはどの精度管理プログラムでも前提としていると思われる。また内部精度管理 (QC) は「マネジメントへのシステムアプローチ」に相当し、品質改善活動 (QI) は「継続的改善」に、外部精度管理 (PT) は「意思決定への事実に基づくアプローチ」に相当すると考えられる。すると異なるのは特に「顧客満足」「連携先満足」「互恵関係」という事になる。先に挙げた CAP のプログラムでは患者のケアや検査技師の健康に直接的に影響する問題とそうでない問題を分類し、「検体ではなく患者」が重要であることを明確にしている。これは将来の日本の精度管理プログラム上でも明確化されるべきであると考ええる。

IV.関係法規から見た抗酸菌検査精度管理¹⁷

「信頼に足る精度の検査結果を医療機関等に保証するため、衛生検査所が行うべきことを定める」として、衛生検査所指導要領には以下の様な内容が定められている。

(歴史的背景)

昭和 55 年法律改正

衛生検査所について、任意登録から義務登録制となる。

昭和 61 年 4 月省令改正

衛生検査所の登録要件として、精度管理者の設置を義務づけた。また各標準作業書の作成を義務づけるとともに、各日誌、各台帳に日々の作業内容を記入させ、その日の作業に誤りがなかったかチェックさせることになっている。

衛生検査所の開設者は、その衛生検査所の検査業務について外部精度管理調査を受

けなければならないこと、検査業務に従事する者に必要な研修を受けさせねばならないこと、日誌台帳を2年間は保存する事等が義務付けられている。

平成4年医療法改定（平成5年4月1日施行）

業務委託に関する規定の整備

検体検査業務を医療機関から受託する者の基準は、医療機関外で受託する者については衛生検査所として都道府県に届け出を行っているものとされている。

平成10年省令改正

「衛生検査所の開設者は、管理者の下に精度管理責任者を中心とした精度管理のための体制を整備すること等により、検査に係るすべての作業を通じて十分な精度管理が行われるように配慮しなければならない」という義務規定が追加されている。

さらに精度管理責任者については、検査業務に6年以上の実務経験があること、精度管理についての3年以上の実務経験があること、当該施設の常勤者であることなどを要求している。また、検査業務に関して学会誌に論文を発表した実績があることが望ましい、とも規定している。

1. 検体の採取・受領

検体の採取条件、検体の保存条件、検体の提出条件等の項目が記載されている「検査案内書」が委託元の関係者に周知されなければならない。また検体受領時に発行する受領書の書式には、申し送り事項（委託元から、検査について特に注意すべきこと等について指示された事項）を記入する欄を設けなければならない。

2. 検体の搬送

検体搬送標準作業書を準備し、検体の搬送条件等業務の画一化を図る必要がある。

3. 検体の受付、仕分けについて

検体の受付仕分標準作業書に基づいて検体の数及び種類等の確認を励行しなければならない。

4. 検査・測定

① 検査・測定技術の標準化

「測定標準作業書」の中で、基準値および判定基準の設定に至った理由及び参考文献名、測定の原理、臨床的意義を明示しなければならない。

② 試薬、管理試料及び標準物質の適切な使用について

試薬の使用は用法に従い適切に行われていること、検査精度を適正に保つために必要な事項が表示され、適切な保管がなされ、さらにはそれらの管理データ等を提示できる体制が確立されている事等を義務づけている。

5. 結果の報告と苦情

検査案内書には「医療機関に緊急報告を行うこととする検査値の範囲」などが記載

される必要がある。また、検査結果の報告書には、検査・測定の責任者あるいは苦情処理担当者の氏名が明記されなければならない。さらに、問い合わせや苦情の内容に応じて原因究明及び改善措置が記載された「苦情処理台帳」が作成されていなければならない。

6. 外部精度管理とクロスチェックについて

都道府県や日本医師会等が行う外部精度管理調査に年1回以上参加していることを確認すること。また、精度管理専門委員（都道府県知事が任命）が同行して立入検査を行う場合（登録時あるいは業務内容変更時）は、既知検体又は既知標本を持参して、通常の検査工程の中で数種類の検査を行わせ、検査結果の信頼度を調査することが望ましいとしている。

また、特に微生物学的検査の精度管理については、既知検体を用いて、月1回以上検査担当者の技能（染色技術を含む）を評価すること、定期的、あるいはロットごとに、既知の微生物を用いて培地等（感受性ディスク、試薬等を含む）の活性を調べること、定期的に染色液のチェックを行うこととされている。

これらの関係法規からは、衛生検査所の業務内容の精度管理について厳しい規制があることがわかるが、当然ながらそれぞれの検査方法そのものの科学的な精度そのものには触れていない。然るにそれぞれの衛生検査所でどのような試験を行うかは各施設の意志にかかっており、統一した手順や方法と言ったものはない。よって外部精度管理を行うについてもそれぞれの検査施設で別個に行う必要があり、統一的に行うのは困難かと思われる。

V. 抗酸菌菌種同定検査のための方法開発

抗酸菌菌種同定の方法は従来の生化学的・生物学的方法（Phenotyping）から安定性や迅速性に優れた遺伝子解析的方法（Genotyping）に移行している。特に近年液体培地の導入により非結核性（非定型）抗酸菌の分離が増加しており、臨床的感染症診断上問題となる場合が多い。結核菌群・非結核性抗酸菌群同定のための方法として16S rRNAによる分類が一般的であるが¹⁸、一部の菌種はこれによって同定不能である。これを解決するため *rpoB* 遺伝子（DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ遺伝子）の多型性を利用した。¹⁹

結果として、基本的に American Type Culture Collection (ATCC)標準株について抗酸菌 94 種 107 株（亜種を含む）の *rpoB* 遺伝子解析を行い、通常 16S rRNA だけでは鑑別できない *M. kansasii* sqv. I&IV と *M. gastri*、*M. chelonae* sqv.I と *M. abscessus*、*M. peregrinum* と *M. septicum*、*M. fortuitum* 3rd biov. と *M. porcinum*、*M. fortuitum* ssp. *fortuitum* と *M. fortuitum* ssp. *acetamidolyticum* sqv.I、*M. murale* と *M. tokaiense*、*M. novocastrense* と *M. flavescens* sqv.II、*M. farcinogenes*、*M. senegalense* と *M. fortuitum* 3dr biov.のうち、

M. kansasii sqv. I&IV と *M. gastri*、*M. chelonae* sqv.I と *M. abscessus*、*M. peregrinum* と *M. septicum*、*M. fortuitum* 3rd biov. と *M. porcinum* の鑑別に有用であった。基本的に 16S rRNA にて第一段階の検査を行い、鑑別不可の菌となったばあい *rpoB* について検討することとなる。これらのシーケンスを用いて精度の高い抗酸菌種同定が可能であり、中央レベルでの精度管理ツールとして有用であると思われる。

表7 *rpoB* について検討した菌種一覧

菌種 (亜種を含む)	標準菌
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC19977
<i>Mycobacterium acaulcensis</i>	ATCC14473
<i>Mycobacterium africanum</i>	ATCC25420
<i>Mycobacterium agri</i>	ATCC27406
<i>Mycobacterium aichiense</i>	ATCC27280
<i>Mycobacterium alvei</i>	ATCC51304
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	ATCC25276
<i>Mycobacterium aurum</i>	ATCC23366
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	ATCC33464
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC25291
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC19698
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	ATCC49884
<i>Mycobacterium botniense</i>	ATCC700701
<i>Mycobacterium bovis</i>	ATCC19210
<i>Mycobacterium branderi</i>	ATCC51789
<i>Mycobacterium brumae</i>	ATCC51384
<i>Mycobacterium celatum</i>	ATCC51131
<i>Mycobacterium chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	ATCC35752
<i>Mycobacterium chelonae</i> chemovar <i>niacinogenes</i>	ATCC35750
<i>Mycobacterium chitae</i>	ATCC19627
<i>Mycobacterium chlorophenicum</i>	ATCC49826
<i>Mycobacterium chubuense</i>	ATCC27278
<i>Mycobacterium confluentis</i>	ATCC49920
<i>Mycobacterium conspicuum</i>	ATCC700090
<i>Mycobacterium cookii</i>	ATCC49103
<i>Mycobacterium diernhoferi</i>	ATCC19340
<i>Mycobacterium duvalii</i>	ATCC43910
<i>Mycobacterium engbaekii</i>	ATCC27353
<i>Mycobacterium fallax</i>	ATCC35219
<i>Mycobacterium farcinogenes</i>	ATCC35753
<i>Mycobacterium flavescens</i>	ATCC14474
<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	ATCC35931
<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	ATCC06841
<i>Mycobacterium gadium</i>	ATCC27726
<i>Mycobacterium gallinarum</i>	ATCC19710
<i>Mycobacterium gastri</i>	ATCC15754
<i>Mycobacterium genavense</i>	ATCC51233
<i>Mycobacterium gilvum</i>	ATCC43909
<i>Mycobacterium goodii</i>	ATCC700504
<i>Mycobacterium gordonae</i>	ATCC14470
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	ATCC29548
<i>Mycobacterium hassiacum</i>	ATCC700660
<i>Mycobacterium heidelbergense</i>	ATCC51253
<i>Mycobacterium hiberniae</i>	ATCC49874
<i>Mycobacterium interjectum</i>	ATCC51457
<i>Mycobacterium intermedium</i>	ATCC51848
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC13950

<i>Mycobacterium kansasii</i>	ATCC12478
<i>Mycobacterium komossense</i>	ATCC33013
<i>Mycobacterium kubicae</i>	ATCC700732
<i>Mycobacterium lactis</i>	ATCC27356
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	ATCC51985
<i>Mycobacterium leprae</i>	Thai53
<i>Mycobacterium madagascariense</i>	ATCC49865
<i>Mycobacterium mageritense</i>	ATCC700351
<i>Mycobacterium malmoense</i>	ATCC29571
<i>Mycobacterium marinum</i>	ATCC00927
<i>Mycobacterium microti</i>	ATCC19422
<i>Mycobacterium moriokaense</i>	ATCC43059
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	ATCC49650
<i>Mycobacterium neoaurum</i>	ATCC25795
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	ATCC19530
<i>Mycobacterium novum (terrae)</i>	ATCC19619
<i>Mycobacterium obuense</i>	ATCC27023
<i>Mycobacterium paraffinicum</i>	ATCC12670
<i>Mycobacterium parafortuitum</i>	ATCC19686
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	ATCC14467
<i>Mycobacterium petroleophilum</i>	ATCC21497
<i>Mycobacterium phlei</i>	ATCC11758
<i>Mycobacterium porcinum</i>	ATCC33776
<i>Mycobacterium poriferae</i>	ATCC35087
<i>Mycobacterium pulveris</i>	ATCC35154
<i>Mycobacterium rhodesiae</i>	ATCC27024
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	ATCC19981
<i>Mycobacterium senegalense</i>	ATCC35796
<i>Mycobacterium septicum</i>	ATCC700731
<i>Mycobacterium shimoidi</i>	ATCC27962
<i>Mycobacterium shinshuense</i>	ATCC33728
<i>Mycobacterium simiae</i>	ATCC25275
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC19420
<i>Mycobacterium sphagni</i>	ATCC33027
<i>Mycobacterium szulgai</i>	ATCC35799
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC15755
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	ATCC19527
<i>Mycobacterium tokaiense</i>	ATCC27282
<i>Mycobacterium triplex</i>	ATCC700071
<i>Mycobacterium triviale</i>	ATCC23292
<i>Mycobacterium tuberculosis H37Ra</i>	ATCC25177
<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	ATCC27294
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	ATCC19423
<i>Mycobacterium vaccae</i>	ATCC15483
<i>Mycobacterium valentiae</i>	ATCC29356
<i>Mycobacterium wolinskyi</i>	ATCC700010
<i>Mycobacterium xenopi</i>	ATCC19250

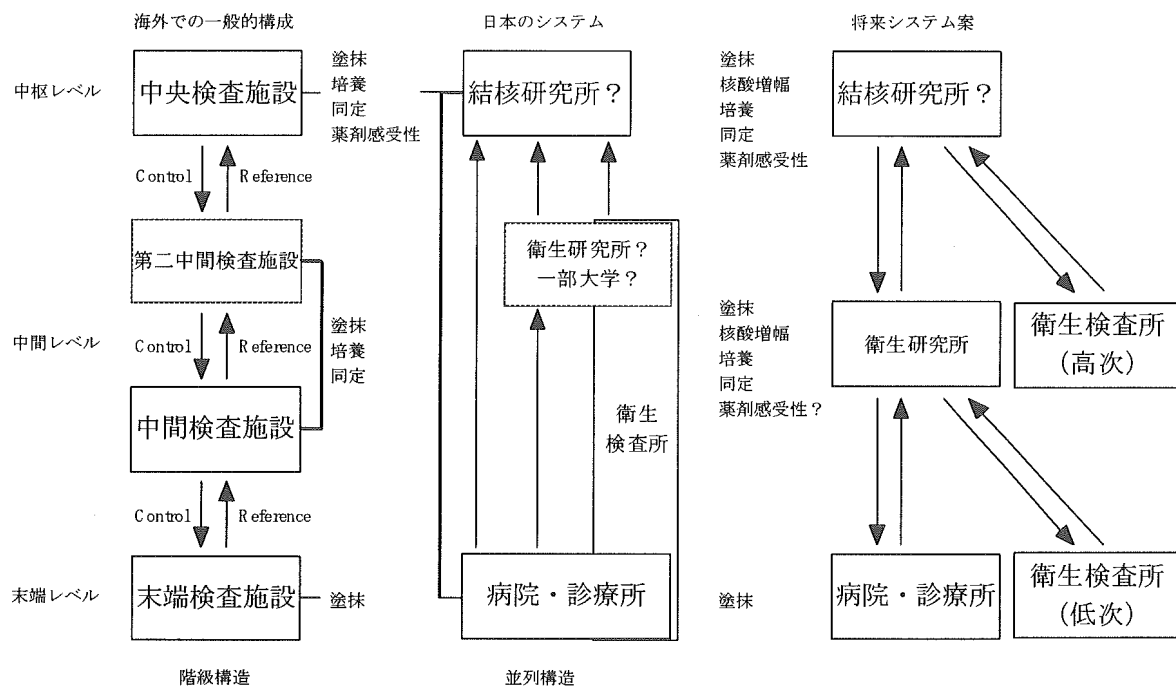
VI. 現状に鑑みた精度管理システムの将来像

現在の日本の抗酸菌検査システムは図1に示すように、多分に並列的であり検査室の機能に合わせた階層的システムではないため、対象が多様化し精度管理が困難になりやすい。

理想的には検査機能を限定する形でシステムの階層化を図るべきである。末端レベルの診療所や病院、あるいはそれらの施設から検査依頼を受ける衛生検査所について

は、抗酸菌検査検体の月ベース（あるいは四半期ベース）の数量によって機能を限定あるいは停止する事が必要になると思われる。具体的には WHO がその指針で示すように 10～15 枚/週の抗酸菌塗抹検査が行われない様なら、その施設については技術の維持が困難と考へて検査を中止し、しかるべき衛生検査所等に検査依頼を行うようにした方が良くと考へられる。また、検査室の安全設備にも配慮し、少なくとも安全キャビネットのない施設については抗酸菌塗抹検査のみと限定するべきである。

図 1 精度管理のシステム構成



海外では培養、同定検査について一般的に中間レベルの検査室機能としているが、日本においては人口規模等から考へて核酸増幅法と感受性検査も中間レベル検査として良いかと思われる。これらは各県にある衛生研究所やある程度高次の機能を持った衛生検査所を以て当てれば良いかと思われる。

中央レベルにはそれらに対するリファレンス機能および精度管理機能を持った施設を設定し、キットでは同定不能な非結核性抗酸菌菌種を同定する機能までを持たせるべきである。

いずれにしても、それらのシステムの構築には公的機関および民間の施設（病院・衛生検査所等）の双方を取り込むことになるので、基礎となる法的な規制と保険上の適切な措置がなされなければならない。これは結核診療施設の統合を含むことになると思われる。また、精度管理による検査の質の向上・維持の証明が各検査施設（特に民間の衛生検査所）にとって生存競争上有利である様に、認証には権威付けが必要と思われる。

精度管理プログラムを実行する際には、その構成や実施のための資源（マニュアル・質問法等）が充実しているアメリカの CAP のプログラムを参考に実施するのが良いと思われる。いくつかの検査施設を図 1 の将来システム案の如く組織し、実践性と有用性を評価する。

実際に実施する場合の手順は以下のようになると思われる。第一回は大規模に実施することは不可能であろうから、先に述べた如くいくつかの施設でシステムを構成し、試験的に実施する。これにより実際の労力等も正確に評価できる。

- ① プロジェクト委員会の設定
 - (ア) QA の方法の選定
 - (イ) QA に必要な資金・資材等の評価
 - (ウ) QA を実施する施設の選定
 - (エ) QA 実施に使用する標準化された手引書（マニュアル・質問表）の作製
- ② チェックリスト等による QC の励行
- ③ Proficiency Testing の実施
 - (ア) 複数の対象から問題点のある施設を抽出し順位づけする。
 - (イ) 下位の施設から査察（Inspection）を実施する。
- ④ 各施設に対する査察（Inspection）による QI（On site supervision による問題点の指摘と改善）の実施
 - (ア) 検査室管理（事務的レベルを含む）
 - (イ) 機材・試薬等の管理
 - (ウ) 検査
 - (エ) 記録・報告
- ⑤ QI 実施後の QA による再評価
- ⑥ Cross checking による QA の実施
- ⑦ QA 実施による検査室評価と QI の実施

結核菌検査指針での精度管理²⁰

2000年に改定された結核菌検査指針では、精度管理の項目が設けられている。基本的に内部精度管理プログラムであり、内容は以下の通りである。

一般的注意

1. 全ての精度管理記録をファイルに綴じるかあるいはノートに記録し、少なくとも2年間保存する。
2. 培地、染色液、試薬の購入日と使用開始日を記録する。定期的に再チェックし、満足な成績が得られない場合は新しいものと交換する。
3. 仕事を効率よく行うために、設備機器や作業場所を配列する。作業場所は清潔に保ち、安全キャビネット内は少なくとも一日に一回は効果的な消毒薬で拭く。
4. 細菌検査に従事する検査技師は定期的に健康診断を受ける。

設備機器の点検

安全性と検査成績の精度を保持するために設備機器を定期的に点検する。

1. オートクレーブ：毎回到達温度を確認する。チャンバー内をきれいに保つ。月に一回、または汚染がみられたときに一時間滅菌する。
2. 安全キャビネット：風量を定期的に測定し記録する。排気ダクトのゲージの目盛りが下がったときはフィルターを交換する。UVランプをチェックする。
3. ふらん器：自記温度計あるいは最高・最低温度計によりふらん器内の温度変化をチェックする。
4. pHメーター：標準液の購入日と使用開始日を記録する。
5. 顕微鏡：抗酸菌陽性標本を検査後の油浸レンズは念入りに拭き取る。
6. 冷蔵庫・冷凍庫：温度を毎日確認する。異常温度を知らせるアラームを設置する。フリーザーについた氷をときどき解凍する。
7. 恒温槽（湯浴）：使用前と使用中に温度をチェックする。
8. 超音波洗浄器：スイッチを入れたときに水面が波打つことを確認する。水位を指示レベルに保つ。
9. ヒートブロック：ブロックの内側と外側で温度差がみられる場合がある。温度計を差し込み、チェックする。
10. サーマルサイクラー：設定温度までの到達時間が通常と異なる場合、設定温度に到達した後でも安定しない場合には専門技師に修理を依頼する。
11. その他の専門機器：定期的にマニュアルに従い指定項目をチェックする。

検査の精度管理

塗抹染色

精度管理のためのスライドを用意し、染色性のみならず一連の作業工程をチェックする。

スライドの調整

- ① 抗酸性陽性菌として *M. bovis* BCG 東京株 (KK12-02)、陰性菌として大腸菌 (ATCC25922) を選ぶ。
- ② 滅菌冷生理食塩水または蒸留水で McFarland No.1 濁度の菌液を調整する。
- ③ スライドガラスに AFB コントロール、スライド作製者名、日付を記入する。
- ④ スライドのつや消しから離れた端に陰性菌、つや消しと陰性菌の間に陽性菌を一滴 (約 50 μ l) 落とす。
- ⑤ 自然乾燥する。
- ⑥ ガスバーナーの炎の中を 3~4 回通過させ固定する。これを塗抹試験のための精度管理スライドとする。
- ⑦ スライドを数十枚作製し、箱に入れ保存する (一ヶ月以内)。

注：患者材料を試験する場合は 1 枚のスライドガラスに複数の材料を塗抹してはいけない。

精度管理スライドによる試験

- ① 精度管理スライドを試験したとき陽性菌が陽性のシグナル、陰性菌が陰性のシグナルを示さない場合および背景がしかるべく脱色されないときは、染色工程と染色液および染色の際に洗浄に使用した水道水をチェックする。
- ② 染色液を新しく調整したときは精度管理スライドで試験する。
- ③ 染色液の変化をチェックするために 2~4 週間に一度試験する。

患者材料の塗抹標本

- ① 陽性スライドは再チェックのために保存する。
- ② 陽性率を毎日グラフにプロットし、異常値がみられた場合は染色液、水、油浸レンズをチェックする。
- ③ 治療前の患者材料では「塗抹陽性・培養陰性」例は少ない。このような例がみられたときは保存スライドを再度鏡検する。

分離培養

材料の前処理

培養で汚染がみられた検査材料の割合を記録する。汚染培地の許容範囲は 2~5% の

間である。汚染の割合が2%以下であれば過度に汚染除去を行ったことになり、含まれる抗酸菌までも殺菌してしまうことになる。一方、汚染率が5%を超えた場合は前処理が弱いか均等化が不完全かのどちらかである。常に汚染率をチェックする必要がある。

分離培地

培地の無菌試験

臨床材料から分離された菌が患者由来か、培地または混入物由来かを確認するために培地の無菌試験が必要である。自家製培地については、製造した培地の1〜3%を選び無菌試験する。市販培地は既に無菌試験を終えている。しかし購入時に、培地の色、凝固水の量、できれば培地のpH、有効年月日を記録する。

発育試験

(1)試験標準菌

発育試験のために次の標準菌を用いる。結核菌 H37Ra (ATCC25177)、*M. kansasii* (ATCC12478)、*M. scrofulaceum* (ATCC19981)、*M. intracellulare* (ATCC13950)、*M. fortuitum* (ATCC6841) と大腸菌 (ATCC25922) を利用する。培地製造会社では製造ロットごとにチェックしているが、使用者の元でも数ヶ月に一度は試験する。治療前の患者材料で「塗抹陽性・培養陰性」例が増えた場合にも標準菌を用い発育試験をする。

(2)標準菌による試験

- ① 液体培地を用い若い培養菌から McFarland No.1 濁度の 1/2 濃度の菌液 (OD=0.1) を調整する。凍結保存可能なプラスチックチューブに 0.5〜1ml ずつ分注し、-20℃ 以下 (可能なら-70℃) に保存する。必要時解凍して使用する。
- ② 培地に 10 μ l 接種する。
- ③ 35〜37℃で3週間培養する。
- ④ 抗酸菌はすべて発育するが、大腸菌は一部抑えられるか選択培地 (Septi-Check, MGIT) では発育が阻害される。
- ⑤ 培養の結果に加え、培地の種類、製造年月日、有効年月日、試験日、ロット番号、製造会社名を記録する。

抗酸菌の鑑別同定

抗酸菌の鑑別同定のために、表8に示した抗酸菌を陽性および陰性コントロールとして用いる。

表 8 抗酸菌標準株

菌 種	株 名
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	JATA 11-01
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	JATA 11-02
<i>M. bovis</i>	JATA 12-01
<i>M. africanum</i>	KK 13-02
<i>M. kansasii</i>	KK 21-01
<i>M. marinum</i>	JATA 22-01
<i>M. simiae</i>	KK 23-01
<i>M. intermedium</i>	JATA 9H-01
<i>M. asiaticum</i>	KK 24-01
<i>M. scrofulaceum</i>	JATA 31-01
<i>M. szulgai</i>	JATA 32-01
<i>M. interjectum</i>	JATA 9G-01
<i>M. lentiflavum</i>	JATA 9N-01
<i>M. gordonae</i>	JATA 33-01
<i>M. avium</i>	JATA 51-01
<i>M. intracellulare</i>	JATA 52-01
<i>M. xenopi</i>	KK 42-02
<i>M. nonchromogenicum</i>	JATA 45-01
<i>M. terrae</i>	KK 46-01
<i>M. triviale</i>	KK 50-01
<i>M. gastri</i>	KK 44-01
<i>M. malmoense</i>	JATA 47-01
<i>M. haemophilum</i>	KK 49-01
<i>M. ulcerans</i>	KK 43-02
<i>M. shimoidei</i>	JATA 54-01
<i>M. shinshuense</i>	JATA 9J-01
<i>M. genavense</i>	JATA 9K-01
<i>M. celatum</i>	JATA 9L-01
<i>M. branderi</i>	JATA 9M-01
<i>M. fortuitum</i>	JATA 61-01
<i>M. chelonae</i>	JATA 62-01
<i>M. abscessus</i>	JATA 63-01
<i>M. mucogenicum</i>	JATA 9P-01
<i>M. peregrinum</i>	JATA 61-02
<i>M. smegmatis</i>	JATA 64-01
<i>M. flavescens</i>	JATA 67-01
<i>M. vaccae</i>	KK 66-01

核酸増幅法

操作中の汚染の防止

核酸増幅法は感度の高い検査法である。ピペット操作中の汚染やエアロゾールによる飛散など、不用意な操作による汚染を防がなければならない。市販のキットに記載されているマニュアルに従い操作することが大事である。毎回陰性および陽性コントロールを置く。汚染は増幅操作中のみならず、患者材料の前処理工程でも起こる。患

者材料の代わりに滅菌蒸留水を陰性コントロールとして置き、前処理工程で起こる汚染をチェックする。

核酸増幅法の精度管理

(1)精度管理用サンプルの調整

- ① 凍結保存可能なプラスチックチューブに非感染性の喀痰を 100 μ l ずつ分注する。
- ② 固形または液体培地培養 *M. bovis* BCG から Mcfarland No.1 濁度の菌液を調整する。
- ③ 滅菌蒸留水で BCG 原液の 1,000 倍と 10,000 倍希釈液を作る。
- ④ 1,000 倍あるいは 10,000 倍希釈液の 10 μ l を喀痰に加える。同様に BCG なしのコントロールとして蒸留水の 10 μ l を加えた群を作る。喀痰 100 μ l に含まれる BCG の菌数は約 100 個 (1,000 倍希釈)、約 10 個 (10,000 倍希釈)、0 個 (蒸留水添加) となる。
- ⑤ 数十セット調整し、-20 $^{\circ}$ C以下に保存する。
- ⑥ 同様に *M. avium* と *M. intracellulare* を含むサンプルを調整し、-20 $^{\circ}$ C以下に保存する。

(2)試験の頻度

- ① 市販のキットの製造ロットが新しくなったときに試験する。
- ② 製造ロットとは無関係に一ヶ月に一回日常検査に加え試験する。
- ③ 毎日の陽性率をグラフにプロットし、離れたところにプロットされた場合には精度管理サンプルで試験する。
- ④ 初めて核酸増幅法の作業に従事する検査技師は、このサンプルを用い熟練する。

薬剤感受性試験

精度管理のための標準菌株

全ての抗結核薬に感受性をもつ結核菌 H37Rv (ATCC27294) と、INH と RFP に耐性をもつ結核菌臨床分離株を選び、精度管理のために用いる。それぞれの薬剤に耐性を獲得している結核菌 H37Rv の変異株、INH 耐性 (ATCC35822)、RFP 耐性 (ATCC35838)、PZA 耐性 (ATCC35828)、SM 耐性 (ATCC35820)、EB 耐性 (ATCC35837)、KM 耐性 (ATCC35827) 株も利用できるが、これらの変異株は高度耐性株であり、患者分離株で低レベルの耐性をもつ株を選択するのがよい。

日常の精度管理に使用する菌株の保存

- ① 液体培養菌から液体培地を用いて、OD=0.1 の菌液を調整する。
- ② 凍結保存可能プラスチックチューブに 1ml ずつ分注する。
- ③ チューブをラックに収め、-20 $^{\circ}$ C以下 (可能なら-70 $^{\circ}$ C) に保存する。

- ④ 1 菌株につき数十本保存、必要時開封、使用後は再度凍結しない。
- ⑤ 使用時、被験菌と同様に希釈する。10,000 倍希釈菌液接種培地に 100～300 個のコロニー、その 10 倍希釈培地に 10～30 個のコロニーがみられる。

試験の頻度

次のように精度管理試験を行う。

- ① 薬剤感受性試験培地の製造ロット番号を記録する。
- ② 製造ロットが変わったときに標準菌株を用い試験する。
- ③ 保存中の安定性を確認するため 1 週間に 1 度試験する。
- ④ 簡便法を用いる場合は、上の 1、2、3 に加え、月に一度普通法と並べ比較検討する。
- ⑤ 初めて薬剤感受性試験の業務に就く技師は熟練するまで被験菌に加え標準菌も試験する。

菌株の保存 保存中に起こる変異を防ぐために標準菌株を凍結保存する。

凍結保存用分散媒

- ① スキムミルク 3g を 50ml の蒸留水に溶解し、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。
- ② グルコース 5g を 50ml の蒸留水に溶解し、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。
- ③ 分散媒：室温まで冷却後①と②を混ぜる。分散媒は 4℃に保存する。

手技

- ① 2ml の凍結保存可能プラスチックチューブに分散媒を 1ml ずつ分注する。
- ② 若い固形培地培養菌（3～4 週）の 1～2 エーゼを分散させる。
- ③ チューブラックに納め、-20℃以下（可能なら-70℃）に保存する。1 菌株につき数十本保存、必要時開封、使用後は再度凍結保存はしない。

内部精度管理プログラムとしては WHO や NCCLS、American Society for Microbiology (ASM) の勧奨内容とほぼ同じ内容であり、国際的なコンセンサスに合致する。

培養あるいは感受性検査に用いる小川培地は鶏卵を用いるため、季節や飼育農家により品質に差がある場合がある。これらを回避するため人工寒天培地（Middlebrook 7H10）を用いた検査法を将来的に利用する事が考えられるが、この人工培地について

もロットにより性能に差がある事が報告されており、いずれにしても試験毎にコントロールによる管理が必要となる。²¹

主要参考文献

1. 厚生労働省健康局結核感染症課. 結核の統計 2002. 結核予防会, 東京. 2002.
2. 厚生労働省. 平成 12 年度緊急実態調査報告書. 厚生労働省. 2001.
3. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998. WHO/TB/98.258.
4. Association of Public Health Laboratories. External quality assessment for AFB smear microscopy. Association of Public Health Laboratories, Washington, 2002.
5. Laing R. Suggestions to revise the sampling procedures in the manual on External quality assessment for AFB smear microscopy. Meeting on laboratory services in countries of the western pacific region with a high burden of TB. Cebu, Philippines 26 November 2002.
6. Laszlo A. Related Articles, Links Tuberculosis bacteriology laboratory services and incremental protocols for developing countries. Clin Lab Med. 1996;16: 697-716.
7. Woods GL, Ridderhof JC. Quality assurance in the mycobacteriology laboratory. Quality control, quality improvement, and proficiency Testing. Clin Lab Med. 1996; 16: 657-675.
8. College of American Pathologists. Laboratory Accreditation Program Manual. 2002. <http://www.cap.org/lap/acstandards.html>
9. Kinyanjui MG, Githui WA, Kamunyi RG, Omwega MJ, Waiyaki PG, Muthami LN. Quality control in the laboratory diagnosis of tuberculosis. East Afr Med J. 1991; 68: 3-9.
10. Van Deun A, Roorda FA, Chambugonj N, Hye A, Hossain A. Reproducibility of sputum smear examination for acid-fast bacilli: practical problems met during cross-checking. Int J Tuberc Lung Dis. 1999; 3: 823-829.
11. Monk S. Laboratory quality control league. Trop Doct. 2000; 30: 11-12.
12. Aber VR, Allen BW, Mitchison DA, Ayuma P, Edwards EA, Keyes AB. Quality control in tuberculosis bacteriology. 1. Laboratory studies on isolated positive cultures and the efficiency of direct smear examination. Tubercle. 1980; 61: 123-133.
13. 平野和重、和田雅子、阿部千代治、青柳昭雄. 入院時薬剤耐性に関する研究: 1997 年度の各施設と結研の成績の比較. 結核. 2001 ; 76 : 461-471.
14. 長澤光章. 臨床検査技師から見た抗酸菌検査の現状と問題点. 第 76 回日本結核病学会総会ミニシンポジウム. 2001.
15. 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 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. 結核. 2003 ; 78 : 61-54.

16. 松田紘一郎. ISO9001 の導入による医療事故防止. じほう. 2001.
17. 厚生省精度管理研究会. 検査における精度管理関係法規. 新企画出版. 2000.
18. Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3637-3648.
19. Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol. 1999; 37: 1714-1720.
20. 日本結核病学会抗酸菌検査検討委員会. 新結核菌検査指針：第8章精度管理. 結核予防会. 2000.
21. Guthertz LS, Griffith ME, Ford EG, Janda JM, Midura TF. Quality control of individual components used in Middlebrook 7H10 medium for mycobacterial susceptibility Testing. J Clin Microbiol. 1988; 26: 2338-2342.

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核治療の向上に関する研究

分担研究者 山岸文雄 国立療養所千葉東病院副院長

研究要旨 再治療例は、アルコールの多飲、前回の治療中断や不適切治療例が多く、順調に治療終了した症例は少なかった。標準治療後の再発例では菌陰性化が遅れた症例が多かったが、順調に治療終了していれば薬剤耐性は認められなかった。再発時発見方法は、管理健診での発見が目立った。初回治療から1年以内に再治療を行った症例は48.5%、2年以内の症例は69.7%と早期再治療例が多かった。再治療の治療成績は治療成功55.3%、加療継続6.4%、中断脱落25.5%、転出8.5%、死亡4.3%と悪かった。コホート観察調査から治療失敗の分析についての検討では、治療失敗した症例は喀痰塗抹陽性にもかかわらず、INH・RFPの2剤投与のみで標準治療が行われていなかった。肺結核治療において、25.4%にニューキノロン剤が投与されていた。投与理由は副作用59.4%、薬剤耐性12.8%、再治療例10.6%などであった。なお初回治療例におけるLVFXの感受性試験ではすべて感性であったが、LVFXを6ヶ月以上投与された多剤耐性肺結核患者では全例耐性であった。初回治療肺結核患者8.4%に胃切除の既往を認めた。胃切除症例は体重が少なく、低栄養状態であった。某企業の職員を症例として観察したオッズ比より、胃切除は結核発病のリスクファクターであることが明らかとなった。

A.研究目的

わが国における結核治療の現状について分析・検討を加えることにより、結核治療の向上に寄与できるものと考え、各種の調査検討を行った。

わが国において、再治療の肺結核症例に対する標準治療法は確立していない。そこで肺結核再治療例に対する標準治療法を確立するため、肺結核再治療例の背景因子を詳細に検討することにより、再発しないためにはどのような注意が必要かを追及すると同時に、WHOに準じた治療レジメンでの治療成績の研究を行った。

WHOによる再治療のレジメンは、

2HRESZ+1HREZ+5HREであるが、SMが聴力障害などで使用できないものに対しては、2HREZL+1HREZ+5HREにて治療を行うこととした。なお、H:INH、R:RFP、E:EB、S:SM、L:LVFXである。肺結核再治療例や、副作用のためにRFPなどの主要薬剤が使用できない場合に、しばしばニューキノロン系薬剤が使用される。そこで、肺結核治療におけるニューキノロン剤投与の現状についての検討も行った。

さらにコホート観察調査から治療失敗の分析を行い、また、結核発病のリスクフ