

[原 著]

抗酸菌塗抹検査外部精度評価の試み

青野昭男¹⁾・近松絹代¹⁾・山田博之¹⁾・村田正太²⁾・結城 篤³⁾三澤成毅⁴⁾・小栗豊子⁵⁾・御手洗 聡¹⁾¹⁾ 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部²⁾ 千葉大学医学部附属病院検査部³⁾ 防衛医科大学校病院検査部⁴⁾ 順天堂大学医学部附属順天堂医院臨床検査部⁵⁾ 亀田総合病院臨床検査部

(平成24年8月8日受付, 平成24年10月23日受理)

人工痰を使用したパネルテストスライドによる抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行し、本邦における抗酸菌塗抹検査の精度を評価するとともに、パネルテストの実践性そのものを評価した。参加施設は病院検査室(83施設)および検査センター(病院内ブランチラボを含む・4施設)の計87施設で、使用された染色法はチール・ネールゼン(Z-N)法が56施設、蛍光法(オーラミンO染色, オーラミン・ローダミン染色, アクリジンオレンジ染色)が31施設であった。また2施設が蛍光法とZ-N法の両方の結果を報告していた。陽性度既知の塗抹スライド5枚を各施設に送付し、435枚分の検査結果(100%)を受領した。標準予定結果との比較で判定一致405枚(93.1%), 低偽陰性26枚(6.0%), 低偽陽性2枚(0.5%), 高偽陽性・陰性各1枚(各0.2%)という結果であった。またZ-N法が蛍光法に対して陽性検出感度がやや低い傾向が認められた。今回のパネルテストの結果から、全体として抗酸菌塗抹検査の質が高精度に維持されており、さらに人工痰を用いた抗酸菌パネルテストスライドを使用することで、各検査室の抗酸菌塗抹検査の精度を比較的容易に評価できることが示された。

Key words: 抗酸菌塗抹検査, 外部精度評価, 人工痰

序 文

今日の抗酸菌検査において、遺伝学的手法や免疫学的手法が導入されたことで、検査結果が得られるまでの迅速性は飛躍的に向上した^{1),2)}。その中においても、迅速・簡便・安価で実施可能な塗抹検査は、なおも結核患者を発見するための重要な検査法の一つである。また、塗抹検査も他の検査と同様に、質の高い検査結果を臨床へ提供するためには、その精度が保証されなければならない。外部精度管理(External quality assessment, EQA)にはパネルテスト(Panel testing), 再検査試験(Cross re-checking), そして検査室立ち入

り評価(On-site evaluation)の三つの方法がある。パネルテストは検査室の総合的な技量に関する基本的なデータを収集するのに役立つ³⁾。

わが国において、薬剤感受性検査のパネルテストは実施されているものの⁴⁾、塗抹検査におけるパネルテストは実施されていない。これは塗抹検査において再現性の高い、安全で簡便な標本を作製する手法がないためと考えられる⁵⁾。しかし近年、結核研究所にて開発した、人工痰および人工痰にホルマリン固定済み結核菌を混ぜて作製した試料にて、標本を作製することで-, 土, 1+, 2+, 3+の五つの陽性度を正しく再現することが可能となった^{6)~8)}。

今回われわれは、この人工痰を用いた抗酸菌パネルテストスライドによる抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行し、パネルテストにより抗酸菌塗抹検査の精度を評価するとともに、パネルテストの実践性そのものを評価した。

著者連絡先: (〒204-8533) 東京都清瀬市松山3-1-24
結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンス部
青野昭男
TEL: 042-493-5711 (内線: 397)
FAX: 042-492-4600
E-mail: aono@jata.or.jp

対象と方法

1. 施設の参加要件

今回の抗酸菌塗抹検査外部精度評価を実施するにあたっては、実施要項に同意し、定められた期間内に結果を返送可能であること、また参加を希望する施設は、①施設名、②担当者名、③通信用メールアドレスをコーディネーターに連絡可能であることを条件とした。

2. 検査に使用する検体

結核研究所で開発した人工痰、あるいは人工痰にホルマリン固定した結核菌を混じた試料を作製し、これをスライドガラス（MASコートスライド：Matsunami）に塗布し、乾燥・火炎固定した5枚のパネルテストスライドを参加施設に郵送にて送付した。各パネルテストスライドの菌量は0 cfu/ml（陰性相当）、約 1×10^4 cfu/ml（±相当）、約 1×10^5 cfu/ml（1+相当）、約 1×10^6 cfu/ml（2+相当）、約 1×10^7 cfu/ml（3+相当）に調整した。

3. 検査方法

上記のスライドをそれぞれの施設で通常使用している抗酸菌染色法にて染色し、鏡検した。鏡検の方法は各施設の標準法に従った。結果は結核菌検査指針にしたがって、簡易法（-、±、1+、2+、3+）にて記録し⁹⁾、ガフキー号数は解析が複雑化することから不可とした。

4. 結果の報告

パネルテストを実施する場合、繰り返し検査によるバイアスを回避するため、結果回収までの時間を制限するのが一般的であることから、検査結果の返送は検体受領後1週間以内とした。上記の方法で記録した結果をフォーマットに従ってスプレッドシートに入力し、電子メールにてコーディネーターに送付した。結果の返送を受けて、標準予定結果を各施設に報告した。

5. 結果の評価

それぞれのスライドの判定結果について、標準予定結果と比較評価した。External Quality Assessment for AFB Smear Microscopyの基準⁵⁾に従って、結果が一致している場合と、陽性度が1段階異なる場合を「一致：Correct」と判定した。陽性の判定であって、陽性度に2段階以上の差がある場合「定量エラー：QE (quantification error)」とした。さらに陰性検体を「±」と判定した場合は「低偽陽性：LFP (low false positive)」, 「±」を陰性と判定した場合は「低偽陰性：LFN (low false negative)」とする。陰性検体を「1+」以上と判定した場合は「高偽陽性：HFP (high false positive)」, 「1+」以上の陽性度の検体を陰性と

表1. パネルテスト結果と標準予定結果との比較 (全体)

| 施設判定 | 標準予定結果 | | | | |
|------|--------|----|----|----|----|
| | - | ± | 1+ | 2+ | 3+ |
| - | 84 | 26 | 1 | 0 | 0 |
| ± | 2 | 58 | 4 | 0 | 0 |
| 1+ | 1 | 3 | 63 | 2 | 0 |
| 2+ | 0 | 0 | 19 | 74 | 1 |
| 3+ | 0 | 0 | 0 | 11 | 86 |

参照：パネルテストスライドの標準的判定システム (世界保健機関)

| 施設判定 | 標準予定結果 | | | | |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | - | ± | 1+ | 2+ | 3+ |
| - | Correct | LFN | HFN | HFN | HFN |
| ± | LFP | Correct | Correct | QE | QE |
| 1+ | HFP | Correct | Correct | Correct | QE |
| 2+ | HFP | QE | Correct | Correct | Correct |
| 3+ | HFP | QE | QE | Correct | Correct |

LFN=low false negative, HFN=high false negative, LFP=low false positive, HFP=high false positive, QE=quantification error

判定した場合は「高偽陰性：HFN (high false negative)」とし、標準予定結果に対する各施設判定の評価を表1参照に示した。集計の利便のため、HFN, HFPおよびLFPに0点、LFNとQEに5点、Correctに10点を付与し、合計の点数を評価した。また間違いの起こりやすさの傾向など評価した。

6. 結果の解析

すべての参加施設のデータについて、陽性度別一致率などを総合評価した。統計解析にはJMP 6.0.3 (SAS Institute, CA, USA) を使用してカイ2乗検定を実施し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

今回研究に参加したのは病院検査室（83施設）および検査センター（病院内ブランチラボを含む・4施設）の計87施設であった。平成24年2月23日に結核研究所より郵送にて検体を発送し、同年3月8日までに1施設を除きすべての施設より結果の報告を受けた。また残り1施設についても同年3月13日には結果の報告を受けた。

総計としてスライド435枚分の検査結果（100%）を受領した。塗抹検査に使用された染色法はチール・ネールゼン（Z-N）法が56施設、蛍光法（オーラミン

O染色, オーラミン・ローダミン染色, アクリジンオレンジ染色のいずれかが31施設であった。また2施設が蛍光法とZ-N法の両方の結果を報告していた。一部の施設からスライドに記載した番号が読みづらいとの指摘があったが, 最終的にはすべての番号が予定(配布)番号と一致し, 評価が可能であった。また送付に関連して検体の破損や紛失は報告されていないが, 一部の地域で遅配があった可能性があった。

表1にすべての施設・検体に対する標準予定結果との比較を示した。全体では判定一致405枚(93.1%), 低偽陰性26枚(6.0%), 低偽陽性2枚(0.5%), 高偽陽性・陰性各1枚(各0.2%)という結果であった。評価点数を見ると50点(満点)が59施設(67.8%), 45点が25施設(28.7%), 40/35/30点がそれぞれ1施設(各1.1%)であった。平均点は48.0±3.4(30~50)であった。また土を陰性(-)と判定した施設が26施設(当該陽性度の29.9%)認められた。

検査方法をZ-N法と蛍光法に分けた結果を表2および表3に示した。Z-N法による結果は56施設(280枚)分であり, 蛍光法は31施設(155枚)分であった。

Z-N法による結果を見ると, 判定一致253枚(90.4%), 低偽陰性23枚(8.2%), 低偽陽性2枚(0.7%), 高偽陽性・陰性各1枚(各0.4%)という結果であった。評価点数を見ると50点が31施設(55.4%), 45点が22施設(39.3%), 40/35/30点がそれぞれ1施設(各

1.8%)であった。平均点は47.2±3.9(30~50)であった。また土を陰性(-)と判定した施設が23施設(当該陽性度の41.1%)認められた。

これに対して, 蛍光染色による鏡検を実施した施設は31施設あり, 判定一致152枚(98.1%)と低偽陰性3枚(1.9%)という結果であった。評価点数を見ると50点が28施設(90.3%), 45点が3施設(9.7%)であった。平均点は49.5±1.5(45~50)であった。また土を陰性(-)と判定した施設は3施設(当該陽性度の9.7%)認められた。Z-N法と蛍光法で低偽陰性(土を陰性と判定する誤り)率を比較したところ $p=0.007$ (カイ2乗検定・Yates補正值)であり, 統計的に有意差を認めた。陽性・陰性の判定だけで比較したところ, Z-N法の感度(陽性検出率)は65.6%(147/224)であり, 蛍光法の感度は72.6%(90/124)であった。

考 察

今回本邦で初めてとなる, 人工痰を使用した抗酸菌パネルテストスライドによる抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行した。抗酸菌検査の中で塗抹検査は, 最も多くの検査室で実施されている検査法である¹⁰⁾。また標本作成から結果判定まで, その工程の多くが的手法によるものである。こうしたことから検査の質の保証が強く求められる。しかし適切な標本作製することが困難であることから, わが国では抗酸菌塗抹検査のパネルテストは実施されてこなかった。今までに報告されたパネルテストスライド作製法は, 抗酸菌陽性および陰性の患者喀痰を集めるため, 陰性喀痰が確実に陰性であることの難しさ, また大量の陽性喀痰を扱う危険性, さらに標本中に含まれる菌量の標準化が困難であるなどの問題点があった^{5), 6)}。

今回われわれは結核研究所で開発した, ポリアクリルアミドを基材とし培養THP-1細胞を用いた人工痰と, ホルマリン固定した培養結核菌を用いてパネルテストスライドを作製した。これは人工痰に混ぜ合わせるホルマリン固定済み結核菌の量を調整することで, 正確に3+~陰性までの各グレードのパネルテストスライドを作製することが可能である^{7), 8)}。また用いる結核菌はホルマリン固定されているため, 標本作製の際のバイオハザードへの配慮も不要で, 一般的な実験台の上で作業が可能である。このためパネルテストスライドを100施設(500枚)分準備(塗抹)したが, ボランティア7名でおよそ2時間の作業により作製が可能であった(人工痰と定量したホルマリン固定済み結核菌は事前に準備した)。また参加ボランティア施

表2. パネルテスト結果と標準予定結果との比較 (チール・ネールゼン法のみ)

| 施設判定 | 標準予定結果 | | | | |
|------|--------|----|----|----|----|
| | - | ± | 1+ | 2+ | 3+ |
| - | 53 | 23 | 1 | 0 | 0 |
| ± | 2 | 32 | 4 | 0 | 0 |
| 1+ | 1 | 1 | 46 | 2 | 0 |
| 2+ | 0 | 0 | 5 | 51 | 1 |
| 3+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 55 |

表3. パネルテスト結果と標準予定結果との比較 (蛍光法のみ)

| 施設判定 | 標準予定結果 | | | | |
|------|--------|----|----|----|----|
| | - | ± | 1+ | 2+ | 3+ |
| - | 31 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| ± | 0 | 26 | 0 | 0 | 0 |
| 1+ | 0 | 2 | 17 | 0 | 0 |
| 2+ | 0 | 0 | 14 | 23 | 0 |
| 3+ | 0 | 0 | 0 | 8 | 31 |

設からの申し込みおよび結果の報告にはすべて電子メールを使用したため、一部の施設で文字化け・セキュリティ上の問題による添付ファイルの開封などに問題があったが、大きな問題は生じなかった。さらに検体の送付も郵送によったためコスト上の問題も低く抑えることが可能であった。

総合的な結果として、Z-N法（1,000倍鏡検）が蛍光法（200倍鏡検）に対して陽性検出感度がやや低い傾向が認められ、特に土の検体について明確であり、Z-N法と蛍光法の間には統計的に有意な差が認められた。これは鏡検倍率の違いによる観察面積の差に由来するものと考えられた。1,000倍での実視野面積は視野数26.5の場合の1視野で0.0552 mm²であり、同様に200倍ではその25倍の1.3789 mm²となる。今回の検体は2×3 cmサイズで作製しているため、全体の面積は471.2389 mm²となり、1,000倍および200倍でそれぞれ300および30視野観察を行うと、観察範囲は1,000倍・300視野観察で全体の3.5%、200倍・30視野観察で全体の8.8%となる。つまり蛍光法で鏡検した場合、Z-N法のおよそ2倍の面積を検査することになり、検出感度は上昇する。なお1×2 cmサイズで塗抹を作製した場合、1,000倍・300視野でも全体の10.5%を観察することが可能と考えられる。しかし塗抹サイズを小さくした場合、塗抹作製の際の乾燥に要する時間が長くなり作業効率が低下すると思われる。

また今回蛍光法で1+を2+と判定した施設が14施設あったが、これは作製したパネルテストスライドの濃度（1+：約100,000 cfu/ml）が日本の基準⁸⁾では2+にオーバーラップするためであると考えられ、実際には定量の間違い（QE）ではないと思われる。

今回大きな間違いはほとんど認めなかったものの、Z-N法で検査された検体で偽陽性3件と偽陰性1件が認められた。検体を結核研究所に再送付してもらい原因を調べたが、明確な理由は不明であった。一般的な可能性としての偽陽性の原因としては染色液の汚染や夾雑物の誤判定が考えられ、また偽陰性の原因としては染色液の濃度や質、さらに染色温度や時間の影響が考えられたが、今回のパネルテストではそこまでの情報を収集していないため、詳細は不明であった^{11),12)}。さらに顕微鏡の質も結果に影響する可能性があることから¹³⁾、各施設の試薬や顕微鏡の種類および管理方法、また検査手順についての情報を得る必要があると考えられた。

今回本邦では初めての抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行した。パネルテストはその属性から、日常の検

体ではなく試験であることが明確であり、最大能力評価であると考えられている。今回のパネルテストでは各施設の情報を収集していないため、どのような状況で検査が実施されたか不明であるが、比較的短期のうちに回答を求めたことから、ある程度日常の検査を反映しているのではないかとと思われる。今回の成績のみの限定的な情報ではあるが、全体の96.5%の施設で評価点数45点以上を示したことから、抗酸菌塗抹検査の質が高精度に維持されていると推察された。さらに人工痰を用いた抗酸菌パネルテストスライドを使用することで、各検査室の抗酸菌塗抹検査の精度を比較的容易に評価できることが示された。また、一般に高精度と信じられていた抗酸菌塗抹検査においても偽陽性・偽陰性が認められており、継続的・拡大的実施が必要と思われた。

謝 辞 本研究を実施するにあたり、全国87の抗酸菌検査実施施設のご協力をいただきました。ここに改めて深謝申し上げます。なお本研究は、平成23年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）の研究課題「地域における効果的な結核対策の強化に関する研究」（H23—新興—一般—001：主任研究者・石川信克）による補助を受けた。

文 献

- 1) Mitarai, S., A. Kurashima, A. Tamura, H. Nagai, H. Shishido. 2001. Clinical evaluation of Amplicor Mycobacterium detection system for the diagnosis of pulmonary mycobacterial infection using sputum. *Tuberculosis* 81: 319-325.
- 2) Hillemann, D., S. Rüscher-Gerdes, E. Richter. 2005. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 9: 1409-1411.
- 3) Martinez-Guarneros, A., S. Balandrano-Campos, M. A. Solano-Ceh, F. Gonzalez-Dominguez, H. B. Lipman, J. C. Ridderhof, A. Flisser. 2003. Implementation of proficiency testing in conjunction with a re-checking system for external quality assurance in tuberculosis laboratories in Mexico. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 7: 516-521.
- 4) 御手洗 聡（日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会）. 2006. 抗酸菌検査施設に対する結核菌薬剤感受性試験外部精度評価. *結核* 81: 501-509.
- 5) Aziz, A. M., F. Ba, M. Becx-Bleumink, et al. 2002. External quality assessment for AFB smear microscopy. p. 1-111. Washington, DC, USA: Association for Public Health Laboratories.
- 6) Yamada, S., S. Mitarai, L. Aguiman, H. Matsumoto,

- A. Fujiki. 2006. Preparation of mycobacteria-containing artificial sputum for TB panel testing and microscopy of sputum smears. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10: 899-905.
- 7) Yamada, H., S. Mitarai, M. R. Wahyunitisari, N. M. Mertaniasih, T. Sugamoto, K. Chikamatsu, A. Aono, H. Matsumoto, A. Fujiki. 2011. An improved polyacrylamide-based artificial sputum with formalin-fixed tubercle bacilli for the training of tuberculosis microscopists. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3604-3609.
- 8) 山田博之, 松本宏子, 御手洗 聡, 藤木明子. 2008. ポリアクリルアミドを用いた人工痰の長期保存と塗抹鏡検所見の再現性. *Kekkaku*, 83(2): 65-71.
- 9) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 2007. 結核検査指針2007. 東京: 結核予防会.
- 10) 御手洗 聡. 2004. 結核菌検査とくに薬剤感受性検査の信頼性に関する研究. 平成15年度厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「小児結核および多剤耐性結核の予防, 診断, 治療における技術開発に関する研究」(主任研究者 森 亨) 分担研究報告書.
- 11) Selvakumar, N., M. G. Sekar, F. Rahman, A. Syamsunder, M. Duraipandian, F. Wares, P. R. 2005. Narayanan. Comparison of variants of carbol-fuchsin solution in Ziehl-Neelsen for detection of acid-fast bacilli. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9: 226-229.
- 12) Van Deun, A., A. Hamid Salim, K. J. Aung, M. A. Hossain, N. Chambugonj, M. A. Hye, A. Kawria, E. Declercq. 2005. Performance of variations of carbol-fuchsin staining of sputum smears for AFB under field conditions. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9: 1127-1133.
- 13) Lumb, R., A. Van Deun, P. Kelly, I. Bastian. 2006. Not all microscopes are equal. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10: 227-229.

External Quality Assessment for Direct Acid-Fast Bacilli Smear Microscopy

Akio Aono,¹⁾ Kinuyo Chikamatsu,¹⁾ Hiroyuki Yamada,¹⁾ Syota Murata,²⁾
Atsushi Yuki,³⁾ Shigeki Misawa,⁴⁾ Toyoko Oguri,⁵⁾ Satoshi Mitarai¹⁾

¹⁾ Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

²⁾ Department of Clinical Laboratory, Chiba University Hospital

³⁾ Department of Laboratory Medicine, National Defense Medical College Hospital

⁴⁾ Department of Clinical Laboratory, Juntendo University Hospital

⁵⁾ Department of Laboratory Medicine, Kameda Medical Center

A panel testing was conducted to assess the laboratory performance of smear microscopy examination for the detection of acid-fast bacilli (AFB), and its feasibility. A total of 87 volunteer facilities, including 83 hospitals and 4 private laboratories, attended the external quality assessment (EQA) trial. The conventional Ziehl-Neelsen (Z-N) and fluorescent (i.e. auramine-O, auramine-rhodamine, or acridine orange) staining methods were used in 56 and 31 facilities, respectively. Two facilities reported the results of Z-N and fluorescent staining methods. Five unstained slides with known AFB smear positivity which were prepared using artificial sputum specimen were sent to each volunteer facility by mail, and the total of 435 reading results (100%) was reported. Comparing to the standard results, 405 (93.1%) results were correct, while 26 (6.0%), 2 (0.5%), 1 (0.2%) and 1 (0.2%) were low false negative, low false positive, high false positive and high false negative, respectively. Z-N was relatively less sensitive than fluorescent staining method in general. The EQA for AFB smear microscopy was implemented. It was relatively easy to conduct using standardized panel testing slides, and showed generally high quality of performance in the participating facilities. The activity could be further expanded to monitor the general quality of smear microscopy in Japan.