

微生物検査の精度管理

— 薬剤感受性検査 —

小松 方

ファルコバイオシステムズ総合研究所 検査三課：京都府久世郡久御山町田井西荒見 17-1 (〒 613-0036)

Key Words CLSI, EUCAST, 検査前工程管理, 検査後工程管理

はじめに

臨床微生物検査室が行う一般的な薬剤感受性検査の精度管理とは、米国の Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 旧 NCCLS) が刊行している Quality control¹⁾ に基づいた方法を指す。この方法は、培養環境や培地性能の不備、あるいは測定する抗菌薬の抗菌活性の低下等の原因による最小発育阻止濃度 (MIC) の変動について、ATCC[®]株 (American Type Culture Collection から市販されている標準株) を用いて、あらかじめ定めた規定の MIC を示すか否かを確認することで、方法論上のエラーを発見する手法である。この Quality control は、希釈法における MIC 値やディスク拡散法における阻止円径に対する精密性と正確性を管理する手法でもある。

Quality control を直訳すると「品質管理」と訳される。「品質管理」とは、生産する製品や提供するサービスの品質をほどよく、一定に保つために行う企業の一連の体系を意味する。それだけではなく、商品の買い手である顧客が満足するものを提供するためにはどのような活動をすればよいかを PDCA サイクルを回しながら系統立てて考えることにある²⁾。この観点で薬剤感受性検査の品質管理を考えると、CLSI ガイドラインに記載された ATCC[®]株を使用した Quality control の実施だけでは目的を達成することはできない。すなわち臨床微生物検査室は以下の事項を思考の根本に置いておく必要がある。『検査報告書 (商品) の品質をほどよく一定に保つ体系を確立し、買い手である臨床医を満足させるために、検査室はどのよ

うに努力すべきかを考え、検査報告書の内容について臨床医が下した診断、治療薬選択およびその効果と一定の相関が保たれるように、PDCA サイクルを回しながら改善していかなければならない』。

本稿では、上述した内容を念頭におきながら真に検査室が実施すべき薬剤感受性検査の精度管理をどのように実施すべきか解説する。

1. CLSI が提示する Quality control

薬剤感受性試験法は国内のおよそ 80% の施設で自動型感受性測定装置を導入し、感受性検査にまつすべての機器および試薬全般がメーカーより提供されている。製品は国際標準化機構である ISO 9001 マネージメントシステムに基づいてメーカーが生産管理しているため、ユーザーはメーカーが規定する条件下で使用する限り、改めて製品の品質を調べ直す必要はない。しかし、購入後の不適切な試薬管理、検査に従事するスタッフの熟練度 (菌液の調整、エンドポイントの読み間違い等)、あるいは機器のメンテナンス不備による異常等によって結果が左右されることを考慮し、これらのエラーを検出することを目的として、通常は CLSI のフローチャートに従った定期的なモニターが必要である¹⁾。一般的に、1 週間に 1 回あるいはロット変更毎に、定められた ATCC[®]株を使用してディスク阻止円径や MIC が CLSI の規定する精度管理限界値内に位置しているかを確認する。ただし冒頭でも述べたように、この

Quality control はあくまでも MIC や阻止円径の精密性と正確性を管理する手法であることに他ならない。なお、CLSI ガイドラインに記載のない抗菌薬（FDA によって承認されていない抗菌薬）のうち、特に国内で汎用されている抗菌薬の Quality control は日本化学療法学会が規定する MIC レンジ³⁾を参考に実施することが可能である。

2. 微生物検査の検査前工程管理⁴⁾

分離培養検査を実施する目的は、疫学調査や保菌検査の目的を除き、感染症の原因となる起炎菌を分離することにある。一方、薬剤感受性検査を実施する目的は、分離培養検査で分離した起炎菌と判断された株に対する治療薬を決定することにある。つまり、起炎菌を分離・決定し、治療薬を探索するという一連の流れを遂行するためには、起炎性の評価が困難となる品質の悪い材料が提出された場合、検体の再採取を改めて臨床側へ依頼する必要がある。品質の良い材料を得るためには、まず初めに検体の適切な採取時期、採取方法および搬送・保存方法が記載されたマニュアルを作成し、臨床医や看護師に知らせ、このマニュアルが適切に順守されているかを検査室レベルで確認しておく必要がある。以上の作業は「検査前工程管理」と呼ばれ、検査室に検体が到着するまでの工程管理を意味する。微生物学的検査は特に検査前工程管理の遂行の是非によって、報告書の品質が大きく左右される。しかしこの工程管理は検査室の直接的に目の届かない範疇であり、疎かにされやすい工程でもあるため、特に意識をおいて取り組む必要がある。

3. 薬剤感受性検査の試験対象株の決定

良質な検体と判断された検体は、「炎症」の評価を実施する⁵⁾。感染症の起炎菌は原則として急性期の場合にのみ認められる。急性期を過ぎた検体は、宿主免疫や抗菌薬投与により、病原体が淘汰され菌量が急激に減少するため、分離培養や塗抹検査の感度

は極端に低下する。このことは検査を依頼する臨床医や検体採取に関与する看護師に知らせておく必要がある。感染を疑う炎症を認めた検体は、原因となる微生物をグラム染色等による塗抹検査で特定する。報告書を作成する際に注意すべき点は、塗抹検査で認めたすべての菌を網羅的に記載するのではなく、炎症との関連、常在菌叢の混入等を詳しく報告書に記載し、また検査室内でも以降実施される分離培養検査の判読に有益な情報となるよう記録しておく必要がある。

以下に、感受性検査を実施するうえでの検体の品質や炎症と分離された株との関連づけについて2つの具体例を用いて解説する。一つは誤嚥性肺炎の患者様より得られた喀痰のグラム染色所見と培養結果である⁵⁾ (図1)。形態のはっきりした新鮮な好中球の細胞内外に複数の細菌が多数認められ、嫌気性菌を含む複数菌感染症を疑う所見である。これの分離培養結果として口腔内細菌叢 (*a*-streptococci, *Neisseria* sp.) を検出した。仮に、この菌叢内に *Pseudomonas aeruginosa* が 10^2 CFU/mL (1+) 相当検出された場合、この *P. aeruginosa* に対して読者諸氏はどのような判断をもって薬剤感受性検査を実施されるであろうか？ この症例は嫌気性菌を主体とする感染を示唆するため、治療薬としてこれらをターゲットとしたアンピシリンやクリンダマイシン、あるいは重症例であればカルバペネム系等が選択されるべきと考えられる。しかし、この検体について顕微鏡下で検出された菌と分離培養で分離された菌名を何の説明もなく網羅的に報告書に羅列し、なおかつ *P. aeruginosa* 分離株のみに感受性試験を実施し報告した場合、医師はこの報告書を閲覧してどのようなアクションを行うと想像されるだろうか？ ひょっとしたら、*P. aeruginosa* だけをターゲットにした嫌気性菌や連鎖球菌にあまり抗菌力を有さないセフトジジムやアミノグリコシド等が治療薬として選択される可能性も考えられないわけではない。

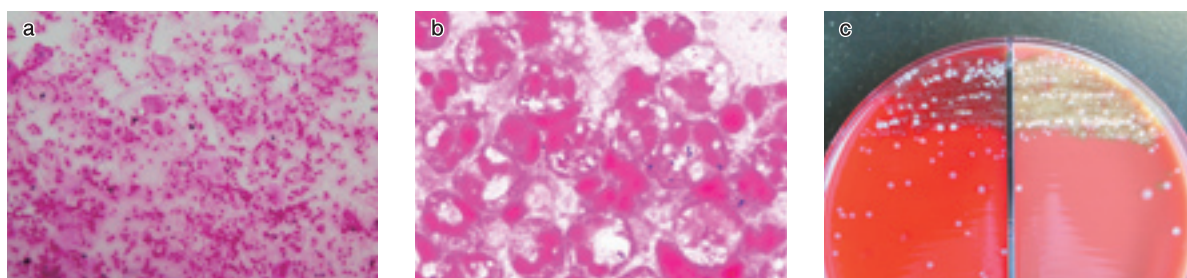


図1 誤嚥性肺炎を来した患者由来のグラム染色像

写真 a (× 100)：ゲックラー分類 4。新しい好中球の浸潤と好中球に取り囲まれた扁平上皮をわずかに認める。
 写真 b (× 1000)：多種多様な細菌を好中球の細胞内外に多数認め、嫌気性菌を含む口腔内細菌叢による感染を疑う。
 写真 c：血液・チョコレート培地。48 時間炭酸ガス培養後の所見。α-streptococcus および口腔内ナイセリアを検出。口腔内細菌叢と判断。

次に一例を示す⁴⁾。それぞれ別々の患者様から提出された喀痰を分離培養してみたところ、両検体とも MRSA が純培養状に検出され、いずれも有意な印象を受けた(図2)。しかし、喀痰の品質評価法であるゲックラー分類を行った結果、一方はゲックラー分類 1 (症例 A)、他方はゲックラー分類 5 (症例 B) という所見であった。分離培養所見は一見同じような結果であるが、喀痰の品質は全く異なり、症例 A 由来の検体はほとんど唾液性状を示す材料であった。この所見から、症例 A の MRSA は単なる上気道の定着菌である可能性が高く、MRSA をターゲットとした積極的な抗菌薬治療の対象とはならない。医師からの特別な要望がない限り感受性試験を実施する対象ともならないと判断される。他方、症例 B 由来の検体は検体の品質が良好で、かつ変性のほとんどない炎症細胞の中にブドウ球菌形態のグラム陽性球菌が認められ、感染を強く示唆する所見であり、薬剤感受性試験を実施する対象となると判断される。

以上の 2 例の経験から検査室は、分離培養で発育した菌が患者様に対して起炎性があるか否かを慎重に吟味し、くれぐれも医師が誤った起炎菌の決定や誤った抗菌薬療法に導かれないようなコメントを報告書に記載すべきである。なおかつそれでも不十分

と判断された場合は積極的に医師と会話することが必要である。これらの行動は検査室のレベル、強いて言うならば個々の検査技師の技量によって左右される。すなわち、これらが一定の品質で行われなければ、様々な報告体系が生まれる可能性がある。そのため、複数の検査技師が同じ検体を担当して検査を行っても同じ回答が得られることができるように、各々の施設内で起炎菌の推定方法と感受性検査の実施基準について事前に取り決めを行い、標準測定作業書 (SOP) を作成し、文書による管理を行っておく必要がある。SOP 作成には検査室だけではなく、実際に患者の診療を行う複数の臨床医の意見を含ませることが望ましい。

次に、SOP が正しく遂行されているかを評価するために定期的な内部ブラインドサーベイやオープンサーベイを実施し、統一したターゲットの決定が実施できているかをモニターする。なお、施設によっては疫学調査あるいは保菌調査を目的とした感受性検査と起炎菌に対する感受性試験を区別せずに(検査室が検査の目的を把握できない場合も含む)実施している施設があるが、疫学調査の対象となる菌は起炎菌でないことが往々にしてあるため、明確に分けて報告する必要がある。

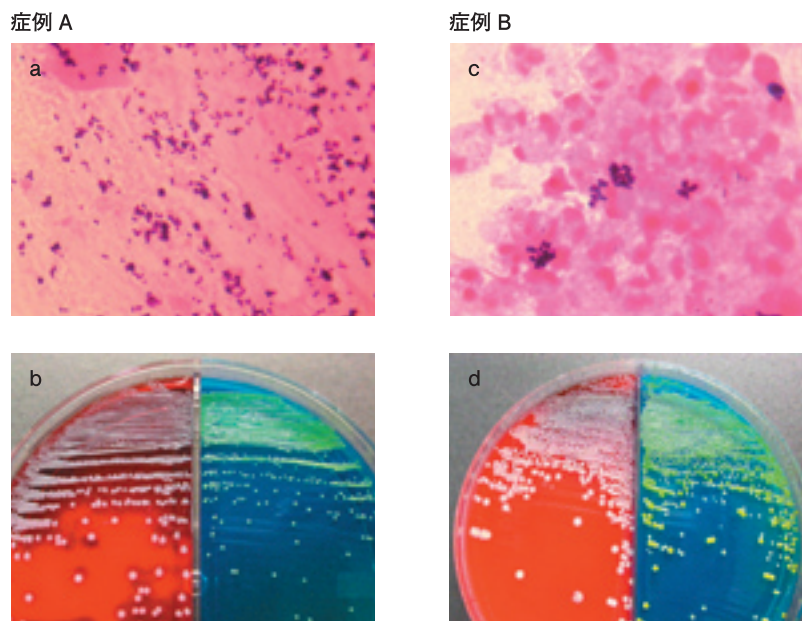


図2 喀痰中に出現する *Staphylococcus aureus* (MRSA) の臨床的評価

症例A : a (左上, グラム染色×1000) b (左下, 血液寒天/BTB 寒天培地の集落所見)
 症例B : c (右上, グラム染色×1000) d (右下, 血液寒天/BTB 寒天培地の集落所見)

4. 薬剤感受性試験結果と耐性因子との関連づけ

近年、様々な耐性因子を保有した菌が発見され、この菌と抗菌薬感受性の関係はかなり複雑化している。検査室においては、特に耐性因子獲得と治療効果に直接的に影響を与える耐性因子の検査に精通するとともに、これらの関係性を正確に報告できる仕組みを保有しておく必要がある。一方で、測定中のランダムエラー等の発生により誤って判定されてしまう内容との識別も必要となる。最近は感受性検査の全自動化が進み、そのようなエラーも機械的に発見できるようになりつつある。メーカーによっては CLSI だけではなく、欧州の EUCAST⁶⁾ あるいは欧州各国が取りまとめた薬剤耐性因子獲得に関する解釈がプログラミングされたシステムが導入されたものも存在する。これらの考え方も有効に活用しながら、適切な耐性因子の検索と臨床的な解釈を報告書に書き込むことが望ましい。表1に検査結果の整合性確認のためのルールを一部示す⁴⁾。

5. 薬剤感受性試験結果と治療効果の一致性に関する評価

検査室は、感受性試験から導き出された結果が抗菌薬治療の効果と一致しているか、個々の症例別に経過観察を行うことが必要である。特に治療に難渋するような中等症や重症感染症に絞り込んで臨床医と密な連携をとりつつ、検査室で判り得た最大限の情報提供を行うことが大切である。これらの作業は手間暇を要するが、臨床医と検査室を強く結び付ける作業であり、院内検査、外注検査を問わず検査室の存在価値を高めるものと考えている。そのためには、抗菌薬の臨床薬理学的知識の習得と検査への応用力が必要となる。

検査室で使用している感受性検査のブレイクポイントとして、国内の99%以上の施設が米国 CLSI の判断基準を使用している。しかし、CLSI ブレイクポイントはあくまでも米国における用法用量に基づき設定されているため、必ずしも日本の使用実状に合っていない。米国の投与方法はサンフォードガイ

表1 薬剤感受性試験の結果値の整合性

○菌種と薬剤との結果値の整合性

・原則耐性を示す

誘導型AmpC産生腸内細菌 <i>Klebsiella</i> spp.	アミノペニシリン, 第一世代セファロスポリン アミノペニシリン, ホスホマイシン
インドールピルビン酸産生腸内細菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Enterococcus</i> spp.	テトラサイクリン カルバペネム アミノ配糖体 (高濃度耐性除く), セファロスポリン, クリンダマイシン, ST合剤

・原則感性を示す

腸内細菌全般 <i>Enterococcus faecalis</i> β -hemolytic streptococci <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Haemophilus influenzae</i>	カルバペネム アミノペニシリン ペニシリン, セファロスポリン グリコペプチド 第三世代セファロスポリン, フルオロキノロン
--	--

○耐性因子と感受性結果値の整合性

MRSA, MRCNS ESBLs産生 メタロ β -ラクタマーゼ産生 誘導型メチラーゼ産生 (Dテスト陽性) エフラックスポンプ過剰発現 (<i>mef</i> , <i>msr</i>) PRSP, BLNARの <i>pbp</i> 変異	すべての β -ラクタム耐性 第三世代セファロスポリン, モノバクタム耐性 すべての β -ラクタム耐性 マクロライド, リンコマイシン, ストレプトグラミン耐性 14員環マクロライド耐性, リンコマイシン感性 経口セファロスポリン耐性 (例外あり)
---	--

○同一系統間の感受性結果値の整合性 (通常ありえないパターンを記載)

マクロライド, リンコマイシン セファロスポリン フルオロキノロン (ニューキノロン) アミノ配糖体	14員環マクロライド感性, リンコマイシン, 16員環マクロライド耐性 第一世代セファロスポリン感性, 第三世代セファロスポリン耐性 グラム陽性菌: LVFX感性, GFLX, GRNX耐性 グラム陰性菌: LVFX感性, CPFX, PZFX耐性 GM感性, AMK耐性
---	--

○臓器移行との整合性 (報告すべきでない薬剤を記載)

尿路感染 化膿性髄膜炎 腸管感染 (特にサルモネラ, シゲラ)	マクロライド, リンコマイシン アミノ配糖体 (髄注を除く), 第一世代, 第二世代セファロスポリン, セファマイシン, クリンダマイシン, マクロライド, テトラサイクリン, フルオロキノロン, 経口抗菌薬全般 第一世代, 第二世代セファロスポリン, セファマイシン
---	--

ド (熱病), 国内の投与方法はそれぞれの抗菌薬の添付文書を参照されたい。例えば β -ラクタムであれば米国の方が投与量も投与回数も多く, フルオロキノロンであれば米国は1回の投与量が多く投与回数は1日1回であるが, 国内では1回の投与量は米国のそれよりも少量で, 1日複数回投与する傾向がある。このように同一薬剤でも投与方法に差を認めるため, 体内動態においても当然差を認める。一方, 日本化学療法学会の判断基準は, 国内で一般的に使用されている投与方法に基づき, 疾患別に設定されている臨床的ブレイクポイントである。一部の抗菌薬でこ

の日本化学療法学会ブレイクポイントとCLSIブレイクポイントの間に差を認めることを知っておく必要がある^{4,5)}。国内検査室はこのような差異を認めるにも関わらず, CLSIブレイクポイントを漫然と使用している。この理由として, 検査室が購入できる試薬類のほとんどがCLSI規格であり, さらにCLSIブレイクポイント付近のMICのみしか測定できないパネルの流通, 付属するシステムがCLSIブレイクポイントのみにしか対応しない, あるいは外部精度管理の報告体系がCLSIブレイクポイントを参照させる慣習があるなどの理由により, 日常検査レベルで

他のブレイクポイントの介入を妨げる原因となっている。

最近、欧州の EUCAST は CLSI と同様に菌種別のブレイクポイントを提示した⁷⁾。このブレイクポイントは臨床的ブレイクポイントとして位置づけられており、また抗菌薬毎の脚注に CLSI と同様に詳細な解釈が記載されているため、参考にしやすいと思われる。ただし、ディスク拡散法の阻止円径の対比表はわが国で市販されている CLSI 規格のディスク含有量と異なる薬剤（特にセフェム系等）があるため、注意が必要である。*P. aeruginosa* を例に表 2 に上述した MIC ブレイクポイントを比較してみた。

以上のような比較表を凡例に、各施設で採用している抗菌薬の整理をし、臨床医、薬剤師、そして臨床検査技師が話し合い、相互にコンセンサスを得ながらどのようなブレイクポイントを使い分けていくべきか今後議論していく必要があると考えられる。

6. 微生物学的検査報告書が臨床医にどのように利用されているかをモニターする

微生物学的検査報告書が臨床医にどのように利用されているかを検査室は常日頃からモニターする必

要がある。この行為そのものは 2 項目で述べた「検査前工程管理」と同様、検査室では直接的には見えない部分でもあり、煩雑な点でもある。現在は多くの病院でインфекションコントロールチーム (ICT) が結成され、臨床検査技師も ICT の一員として病棟ラウンドを行う機会が増えてきた。今後検査室はこのようなチーム活動へ積極的に進出し、検査報告書が臨床で有効に活用できるように臨床微生物学の専門家としての意見を述べながら、チーム医療の一員としての地位を確立すべきと考える。

おわりに

本稿では 6 つのポイントに主眼を置いて、薬剤感受性検査の品質管理をどのように遂行すべきか解説を行った。これらの内容を遂行するには、感染症診断治療のプロセスに関する一般的な知識や抗菌薬の使用法と体内動態等の薬理学全般の知識も必要となる。また従来あまり意識がなされていなかった、検査前工程や検査後工程にも眼を向ける必要がある。今回の解説が、より一層臨床に踏み込んだ検査体系を構築するうえでの参考となれば幸いである。

表 2 CLSI, EUCAST および日本化学療法学会の MIC ブレイクポイントの違い (*P. aeruginosa* の場合)

	MIC ブレイクポイント (μg/mL)					
	EUCAST*		CLSI			日本化学療法学会 (肺炎)
	S	R	S	I	R	
Piperacillin	≤16	>16	≤64	—	≥128	2 (2g i.v.)
Cefepime	≤8	>8	≤8	16	≥32	4 (1g i.v.)
Ceftazidime	≤8	>8	≤8	16	≥32	4 (1g i.v.)
Imipenem	≤4	>8	≤4	8	≥16	2 (500mg i.v.)
Meropenem	≤2	>8	≤4	8	≥16	2 (500mg i.v.)
Doripenem	≤1	>4	—	—	—	1 (0.25g ×2 div)
Aztreonam	≤1	>16	≤8	16	≥32	4 (1g i.v.)
Levofloxacin	≤1	>2	≤2	4	≥8	2 (100mg p.o.)
Ciprofloxacin	≤0.5	>1	≤1	2	≥4	4 (300mg i.v.)
Amikacin	≤8	>16	≤16	32	≥64	4 (200mg i.m.)
Gentamicin	≤4	>4	≤4	8	≥16	2 (60mg i.m.)
Fosfomycin (静注)	≤32	>32	—	—	—	—

*EUCASTには *Pseudomonas* sp.として記載されている

参考文献

- 1) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; 20th informational supplement (M100-S20). Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2010.
- 2) 財団法人日本規格協会 品質管理検定センター . 品質管理検定 (QC 検定) 4 級テキスト . 2005.
<http://www.jsa.or.jp/kentei/qc/pdf/grade4text.pdf>
- 3) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会 . 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会最終報告 (2007 年). 日本化学療法学会誌 . 2008 ; 56 (1) : 49-57.
- 4) 加藤貴代子 , 小松 方 . 抗菌薬感受性試験の内部精度管理 . 検査と技術 . 2008 ; 36 (12) : 1362-1368.
- 5) 小松 方 . 現代の臨床検査に必要な基礎知識・技術 (4) : 微生物検査学 . 医療と検査機器・試薬 . 2008 ; 31 (4) : 339-364.
- 6) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Version 1. 2008.
http://www.eucast.org/expert_rules/
- 7) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.0.2010.
http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

Total Quality Management for Antimicrobial Susceptibility Testing

Masaru KOMATSU, Ph. D.

Central Laboratory Technical Section3, FALCO biosystems, Ltd.,
17-1 tainishiarami, kumiyama-cho, kuse-gun, Kyoto 613-0036

Key Words CLSI, EUCAST, Susceptibility Testing, Quality Control