

原 著

マイクロプレートハイブリダイゼーション法 による抗酸菌同定法の検討

山崎 利雄・高橋 宏・中村 玲子

国立予防衛生研究所細胞免疫部

受付 平成4年7月7日

EVALUATION OF DNA-DNA HYBRIDIZATION METHOD FOR IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA USING A COLORIMETRIC MICROPLATE KIT

Toshio YAMAZAKI*, Hiroshi TAKAHASHI and Reiko M. NAKAMURA

(Received for publication July 7, 1992)

DNA-DNA hybridization was applied for identification of mycobacteria and developed as a kit "microplate hybridization kit" (refers to MPHD) by Kobayashi Pharmaceutical Co. We received test samples of the microplates from the company and examined them for their and reliability using 180 mycobacterial strains of 21 species kept in our laboratory. The results of identification by MPHD were 100% identical to those of biochemical identification in the type or reference strains of mycobacteria, showing good reliability of MPHD method. Among clinical isolates, there were six *M. tuberculosis* strains which did not show typical characteristics for *M. tuberculosis*, i. e., niacin test negative or nitrate reduction weak positive, but all of these were identified as *M. tuberculosis* complex by MPHD method. Some strains from clinical isolates showed difference in identification between MPHD and biochemical methods: *M. avium* complex, identified biochemically were divided into *M. avium* and *M. intracellulare* by MPHD, *M. fortuitum* complex by biochemical identification were distinguished as *M. fortuitum* and *M. chelonae* by MPHD. Further, *M. chelonae* were separated into *M. chelonae* subsp. *chelonae* and *M. chelonae* subsp. *abscessus* by MPHD. *M. peregrinum* has been considered as a synonym of *M. fortuitum*, but we could distinguish *M. peregrinum* from *M. fortuitum* clearly by MPHD method. Thus, it is suggested that *M. peregrinum* and *M. fortuitum* are different species.

Keys for getting reliable results using the MPHD kit are (1) appropriate amount of bacteria for use, (2) purification of DNA, (3) enough deproteinization, and (4) appropriate timing to read colorimetry measurement of the plate.

Key words : DNA-DNA microplate hybridization, Identification of Mycobacteria

キーワード : DNA-DNA マイクロプレートハイブリダイゼーション, 抗酸菌同定試験

* From the Department of Cellular Immunology, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

緒言

抗酸菌の生化学的性状による同定検査法^{1)~7)}は、検査項目が多く、煩雑で最終検査結果がでるまでに3~4週間という時間がかかる。さらに、分離当初の菌は人工培地に発育が悪いために典型的性状を示さないことがあり⁷⁾、現在市販されている生化学的性状による抗酸菌同定キットを用いる方法では、同定を誤る場合がある。近年、Gen-probe法⁸⁾⁹⁾やPCR法¹⁰⁾¹¹⁾が開発され、特定の菌種については迅速診断が可能になりつつあるがまだ一般的ではない。

そこで迅速診断法の一つとして最近、アイソトープを用いないで、酵素によって被検菌DNAを標識し、マイクロプレート内に固定した基準株DNAとの間でハイブリダイゼーションを行ういわゆるマイクロプレートハイブリダイゼーション法(MPHD法と略す)が江崎および楠らによって報告^{12)~15)}され、キット化された。このキット試供品(小林製薬株式会社)を用いてわれわれは、当研究室保存の既に同定された抗酸菌株についてMPHD法の信頼度、その有用性、および試験手技の検討をしたので報告する。

材料と方法

被検菌：従来法^{1)~8)}にて同定した表1に示す当研究室保存19菌種2亜種の標準株と臨床分離株計180株を1%小川培地、あるいは、Middlebrook 7H9 Broth培地に培養した菌を用いた。遅発育菌は2~3週間培養菌を、速発育菌は3~5日間培養菌を用い、直ちに供試菌としない場合には、-20°Cに保存し、使用直前に室

温に戻した菌を供試菌とした。1%小川培地に発育しにくい菌株は、Middlebrook 7H9 Broth培地5mlに10~14日間培養後遠心分離して菌塊を集め、精製水で2回洗浄後精製水20μlにサスペンドし、全量を供試菌とした。

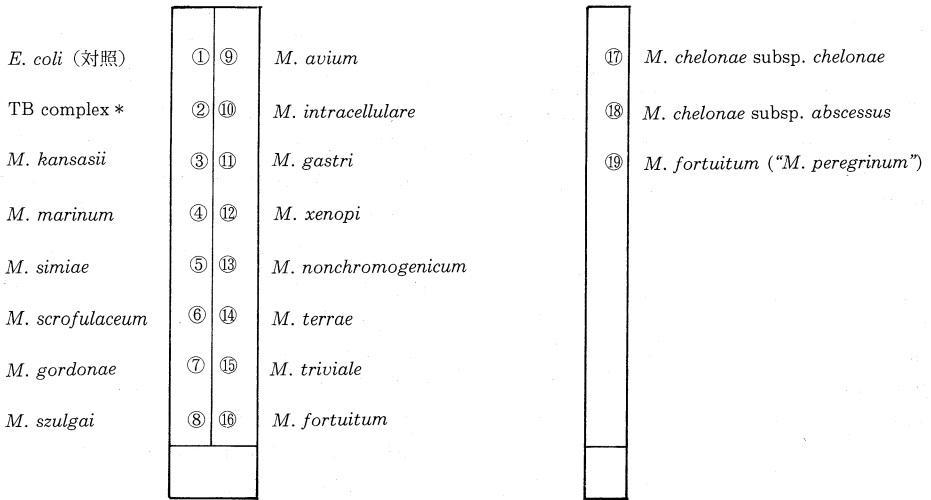
MPHD法同定キット：小林製薬株式会社より試供されたものを用いた。この中には、DNA抽出試薬、エタノール、DNA標識試薬、DNA変性試薬-1、DNA変性試薬-2、ハイブリダイゼーション液、プレート洗浄液(20倍濃度)、発色酵素、発色酵素用希釈液、発色基質-a、発色基質-b、発色基質用希釈液、マイコバクテリウム属菌同定用プレート、DNA抽出用試験管、スピッツチューブ、プレート用シールが含まれている。マイコバクテリウム属菌同定プレートは、既知の16菌種2亜種の基準株よりDNAを抽出し、100°C5分間加熱後急冷し、一本鎖としたDNA0.5μgをサーモンDNAでプレハイブリダイゼーションし50°Cで乾燥させた状態で図1に示した位置に固定してキットに含まれている。

試験方法：プロトコールは、基本的にはキット説明書に従った(図2)。しかし、バックグラウンドが高い場合、あるいは判定基準に達しない場合には、後述のように被検菌DNAを抽出後、再フェノール処理をした。

判定：発色後5~10分以内にELISAプレートリーダー(BIO-RAD社)を用いて630nmの吸光度を測定した。すなわちKusunoki¹³⁾らにあるように最も強く反応したウェルの吸光度(Max. Abs.)が対照ウェルの吸光度(Blank Abs.)の1.9倍以上でかつ、2番目に高い吸光度(2nd. Abs.)を示したウェルの相対類

表1 MPH D法供試標準菌株

菌種名	株 No.	菌種名	株 No.	菌種名	株 No.
<i>M. tuberculosis</i>	NIHJ1633	<i>M. scrofulaceum</i>	NIHJ1626	<i>M. nonchromogenicum</i>	NIHJ1622
	NIHJ1634		ATCC15978		ATCC19531
	NIHJ1635		ATCC19073		ATCC19532
<i>M. africanum</i>	NIHJ1601	<i>M. gordonae</i>	NIHJ1617	<i>M. triviale</i>	NIHJ1632
	NIHJ1602		ATCC23283		ATCC19386
<i>M. bovis</i>	NIHJ1606		ATCC19277		ATCC23390
	NIHJ1607	<i>M. szulgai</i>	NCTC10831	<i>M. fortuitum</i>	NIHJ1615
	NIHJ1608	<i>M. avium</i>	NIHJ1605		ATCC6841
<i>M. microti</i>	NIHJ1621	<i>M. intracellulare</i>	NIHJ1618		ATCC23010
	ATCC11152		ATCC15985	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	NIHJ1611
<i>M. kansasii</i>	NIHJ1619	<i>M. gastri</i>	NIHJ1616		NIHJ1610
	ATCC12478	<i>M. xenopi</i>	NIHJ1638		ATCC23000
<i>M. marinum</i>	NIHJ1620		ATCC19156	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	NIHJ1609
<i>M. simiae</i>	NIHJ1627		ATCC19276		NIHJ23003
		<i>M. terrae</i>	NIHJ1630		ATCC14472
				<i>M. peregrinum</i>	ATCC23001



* : *M. tuberculosis* complex

図1 基準株 DNA が固定されている位置

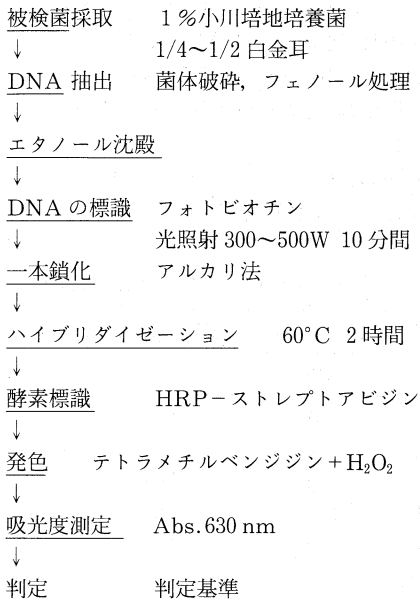


図2 MPHD 法の操作方法

結 果

1. 標準抗酸菌株を用いた MPHD 法による同定結果キットの基準株 DNA としてプレートに固定してある 16 菌種 2 亜種 (図 1) について、表 1 に示した、当研究室保存の各種抗酸菌の標準菌 45 株について MPHD 法で同定を行った。いずれの株もそれぞれ相当する基準株 DNA が固定されているウェル (図 1) に最も強くハイブリダイズし、このキットの信頼性が確認された。ただし *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* には特異性が認められず、すべて結核菌と同一に同定された。

2. 従来法による同定と MPHD 法による同定の比較 各種抗酸菌の標準菌 45 株を含む被検菌合計 180 株について、従来法¹⁾⁻⁸⁾ による同定と MPHD 法の同定結果を比較し、その結果を表 2 に示した。このうち *M. avium* 18 株と *M. intracellulare* 6 株は、Gen-probe 法⁸⁾⁹⁾ あるいは、Accuprobe 法によってそれぞれ *M. avium* または *M. intracellulare* と同定された株であり、*M. avium* complex と記載した 14 株は、生化学的検査法¹⁾⁻⁷⁾ により同定されたものである。

従来法による同定と MPHD 法による同定結果とを比較すると、被検菌 180 株のうち、169 株 (93.9%) は一致したが、不一致が 10 株 (5.6%)、判定不可が 1 株 (0.5%) あった。臨床株中には、ナイアシン試験 (-) の 4 株、および硝酸塩還元試験 (±) の 2 株の非典型的な性状を示した結核菌があったが、これらは MPHD

似度が 70% 以下の時の結果を採用し、この基準に達しないものは判定不可とした。相対類似度は次式によって算出した。

$$\text{相対類似度 (\%)} = \frac{2 \text{ nd. Abs.} - \text{Blank Abs.}}{\text{Max. Abs.} - \text{Blank Abs.}} \times 100$$

表2 保存菌株を用いた同定試験結果

既命名菌種名	供試菌株数	MPHD 法 同定結果 一致/不一致
<i>M. tuberculosis</i>	40	40/0
<i>M. africanum</i>	2	2/0
<i>M. bovis</i>	3	3/0
<i>M. microti</i>	1	1/0
<i>M. kansasii</i>	14	14/0
<i>M. marinum</i>	3	3/0
<i>M. simiae</i>	3	3/0
<i>M. scrofulaceum</i>	9	9/0
<i>M. gordonae</i>	4	4/0
<i>M. szulgai</i>	1	1/0
<i>M. avium</i>	18	17*
<i>M. intracellulare</i>	6	6/0
<i>M. avium</i> complex	14	12/2
<i>M. gastri</i>	3	3/0
<i>M. xenopi</i>	4	4/0
<i>M. nonchromogenicum</i>	3	3/0
<i>M. terrae</i>	3	3/0
<i>M. triviale</i>	3	3/0
<i>M. fortuitum</i>	19	14/5
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	11	9/2
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	13	12/1
<i>M. peregrinum</i>	3	3/0
計	180	169/10

* 判定不可1株

法ではすべて結核菌群と同定された。

また、臨床細菌学的な簡易同定検査法では性状が類似し、区別が難しいいくつかの抗酸菌は便宜的に complex として一括して呼称されている。ところが MPHD 法では *M. avium* complex (以下 MAC と略す) は、*M. avium* と *M. intracellulare* に、*M. nonchromogenicum* complex は、*M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale* に、*M. fortuitum* complex は、*M. fortuitum* と *M. chelonae* にそれぞれ種のレベルまで区別できた。さらに *M. chelonae* は、*M. chelonae* subsp. *chelonae*, *M. chelonae* subsp. *abscessus* の亜種のレベルまで明確に区別できた。また、現在 *M. fortuitum* と同義語とされている *M. peregrinum* も MPHD 法によれば明確に区別できた。

3. MAC の同定における Gen-probe 法, Accu-probe 法, MPHD 法の比較

Gen-probe 法あるいは Accuprobe 法によって同定した MAC 24 株について MPHD 法による同定を行い、両者の結果を比較したものを表 3 に示す。*M. avium* は、18 株中 17 株が一致したが、1 株は *M. intracellulare* との相対類似度が 70% で判定不可であった。*M. intracellulare* は、6 株中 6 株が一致した。この MPHD 法による同定結果は、Gen-probe 法あるいは Accuprobe 法と一致する成績が確認された。

4. 従来の同定法と MPHD 法による同定の不一致株について

従来の同定法と MPHD 法による同定が一致しなかった 10 株は、いずれも臨床分離株である。その内訳を表

表3 Gen-probe 法, Accuprobe 法とマイクロプレートハイブリダイゼーション法との比較

株名	Gen-probe 法	Microplate hybridization 法		株名	Accuprobe 法	Microplate hybridization 法	
	菌種名	菌種名	2nd % (No.)		菌種名	菌種名	2nd % (No.)
Flamingo	M.a	M.a	53 (10)	CS	M.a	M.a	21 (10)
Simamoto	M.a	×	70 (10)	RO	M.a	M.a	31 (10)
Ueda	M.a	M.a	69 (10)	HK	M.a	M.a	22 (10)
Saitama 274	M.a	M.a	47 (10)	RH	M.a	M.a	42 (10)
277	M.a	M.a	36 (10)	HO	M.a	M.a	42 (10)
279	M.a	M.a	47 (10)	KO-1	M.i	M.i	38 (9)
302	M.a	M.a	48 (10)	TY	M.i	M.i	42 (9)
Kirchberg	M.a	M.a	20 (10)	KO-2	M.i	M.i	41 (9)
E 38686	M.a	M.a	40 (10)	SO	M.i	M.i	63 (9)
Elephant	M.a	M.a	48 (10)	JY	M.i	M.i	45 (9)
Gamo	M.a	M.a	69 (10)				
Horie	M.a	M.a	51 (10)				
Mino	M.a	M.a	45 (10)				
ATCC15984	M.i	M.i	54 (9)				

× : 判定不可, M.a : *M. avium*, M.i : *M. intracellulare*

表4 同定結果が不一致であった菌株

株名	既命名菌種名	MPHD 法による同定結果
略220	<i>M. avium</i> complex	<i>M. kansasii</i>
略308	<i>M. avium</i> complex	<i>M. szulgai</i>
Mf5	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>
Mf23	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>
Mf25	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>
略171	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>
略312	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>
ca7	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>
cc3	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>
cc10	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>

4に示す。MAC 14 株中2株, *M. fortuitum* 19 株中5株, *M. chelonae* subsp. *chelonae* 11 株中2株, *M. chelonae* subsp. *abscessus* 13 株中1株が不一致であった。MAC と同定した2株は分離当初小川培地に劣勢発育を示し, コロニーの色調, 光発色および, 硝酸塩還元試験も陰性であったが, その後, 小川培地に良く発育するようになるに従い, 集落の着色を認めたもので, MPHD 法の結果1株が *M. kansasii*, 他の1株は *M. szulgai* であった。この2株は, 後日生化学的検査を行い, それを確認した。

M. fortuitum 19 株中一致しなかった5株の内訳は *M. peregrinum* 3株, *M. chelonae* subsp. *abscessus* 2株であった。前者は *M. peregrinum* が, *M. fortuitum* の同義語とされたために, *M. fortuitum* と同定されていたものであるが本質的には *M. fortuitum* と *M. peregrinum* は別の種とすべきものとする。

従来法で *M. chelonae* subsp. *chelonae* とされていたもの11株中2株は, *M. chelonae* subsp. *abscessus* と *M. fortuitum* であり, 同様に *M. chelonae* subsp. *abscessus* とされていた13株中1株は *M. chelonae* subsp. *chelonae* であった。このほか, 本実験の対象外の菌株に, いずれにもハイブリダイズしない遅発育の着色性菌1株を認めている。

5. MPHD 法試験の適正条件についての検討

われわれは, この同定試験を始めた当初は, キット使用説明書に従い作業をしたが, 対照ウェルの吸光度が高すぎ, また, 全部のウェルが発色してしまい, 判定基準をみたすことができなかった。そこで, いろいろな条件について検討した結果, このMPHD法試験の成否は, 被検菌からいかに純度の高いDNAを抽出するかに左右されることがわかった。

使用説明書には, 被検菌の採取菌量を1/4~1/2白金耳量に指示されている(図2)。しかし, 使用する白金耳の大きさによって, 被検菌量が異なる。菌量が少ない

と, 抽出される被検菌のDNA量も少なく検出できない。逆に多すぎるとボルテックス時間を長くしても除タンパク不足のためにバックグラウンドが高くなり, 判定基準に達しないことがおこる。そのため, 採取菌量が多過ぎたときには, 菌破碎時間を90~120秒に延ばし, 抽出試薬2mlで抽出し, 遠心分離後の上清を再び, フェノールにて再除タンパク後, エタノール沈殿以下の操作を行ってDNAの純度を上げる必要がある。

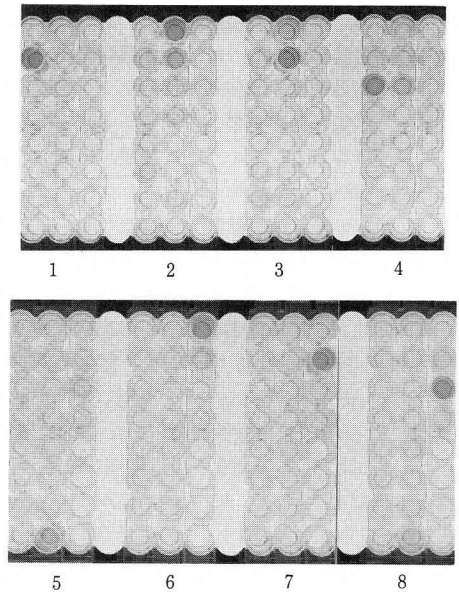


図3 MPHD 法による抗酸菌の同定

1: *M. tuberculosis*, 2: *M. kansasii*, 3: *M. avium*, 4: *M. intracellulare*, 5: *M. fortuitum*, 6: *M. chelonae* subsp. *chelonae*, 7: *M. chelonae* subsp. *abscessus*, 8: *M. peregrinum*

室温に5~30分間放置し, 他のウェルに比べ肉眼的に明らかに発色が確認できたウェルの菌名を同定菌名とすることも可能である。

そこでわれわれは菌を一定量採取するために白金耳の大きさを、内径3 mm、外径5 mm、厚さ1 mmに定めた。この白金耳でR型菌は1白金耳を、S型菌は1/2白金耳を採取し、菌破碎時間を60秒、抽出試薬添加後のボルテックス時間60秒、エタノール沈殿後沈渣をもう一度エタノール1 mlで洗浄するという手順を確実にまもることによって、常に適切な結果を得ることができた。また、相対類似度が比較的高い、*M. avium*と*M. intracellulare*、あるいは、*M. kansasii*と*M. gastri*については、上記条件で判定基準に達しない場合には、DNA抽出液をRNase(終末濃度0.1mg/ml)で37°C 30分処理すると良い結果が得られた。

図3は、上記のMPHD法試験手技の検討後の写真である。このプレートの吸光度(O.D.630nm)を測定し、判定基準に照らし判定するが、発色後、長時間経過すると判定基準を満たさなくなる場合があるので、5~10分間に測定を終了した。

考 察

わが国の抗酸菌同定試験法は、日本結核病学会抗酸菌分類委員会報告¹⁾により体系づけられ、その後、内藤³⁾、東村⁴⁾、斎藤⁵⁾、高橋⁷⁾らにより、日常遭遇する抗酸菌の簡単な同定法について実用的な方法が報告されている。また、抗酸菌同定キットも市販されている。しかし、いずれも最終同定結果が出るのに2~4週間必要である。また、分離当初の菌は、典型的な性状パターンを取らないことも多く、判定に経験を要し誤同定を生じる場合もあるように見受けられる。そのため、簡便、迅速で客観性のある同定試験法が望まれている。われわれは、江崎ら¹⁴⁾¹⁵⁾により報告され、楠ら¹²⁾¹³⁾によりキット化されたMPHD法を用いた抗酸菌同定キットを用いて、この方法による抗酸菌同定試験の有用性について検討した。

従来の同定法ですでに同定されている当研究室保存の21菌種180株をMPHD法で同定し、従来の同定結果およびGen-probe、Accuprobeを用いた同定結果と比較検討した。各菌種の標準株を用いた45株で100%一致したことにより、このキットの信頼性が確認された。臨床株135株では、MAC、*M. fortuitum* complexに一部不一致が見られた(表4)。この中で*M. fortuitum*とされていた3株は、MPHD法の結果は*M. peregrinum*であった。楠らは、*M. fortuitum*に既知名と一致しない株が多くあったと報告しているが、その中で*M. peregrinum*と反応する株があると述べている¹²⁾¹³⁾。本キットでは、*M. peregrinum*の基準株が固定されている。われわれの扱った菌株では、本キットを用いた場合、明らかに*M. fortuitum*と*M. peregrinum*の区別が可能であった。*M. fortuitum*と*M. peregrinum*は、独立した別の菌種とすべきものと考えられる。

MPHD法では、*M. tuberculosis*、*M. africanum*、*M. bovis*、*M. microti*の各菌は同一の反応を示しTB complexとしか鑑別できない。しかし、現実的には、わが国の臨床材料の分離菌でTB complexと判定したものは*M. tuberculosis*として初期治療を行っても差し支えないと考える。従来法では、ナイアシン試験を行うために、菌が分離されても十分な菌量に達するまで同定検査を待ち、しかも、ナイアシン試験の他にも、数種類の同定試験を行うので、最終結果がでるまでに長時間を要している。MPHD法の検出に必要な菌数は、青木らによれば最低 10^5 cfu/ml必要とし、喀痰ではガフキー6号以上必要であると報告している¹⁶⁾¹⁷⁾。これから計算するとMPHD法に必要な菌量は 3×10^6 cfuとなる。内径3 mm、外径5 mm、厚さ1 mmの白金耳を用いた場合、一白金耳の菌量がれば十分検査に足りるので、比較的早期に同定試験を実施することが可能である。

楠らは、MPHD法では、*M. gordonae*、*M. non-chromogenicum* complexに判定基準に達しないため判定不可となったものが比較的多く見られたと報告¹²⁾している。われわれも、ただ1例であったが本実験の対象外の菌株で、いずれのウェルにも反応しない、遅発育の着色抗酸菌1株を経験した。例えば、*M. smegmatis*、*M. phlei*、*M. flavescens*、*M. vaccae*といった非病原性の基準株DNAは、プレートに固定されていないので、このキットによって同定できないことになるが、いたずらにプレートに固定する菌種を増やすことは、臨床検査の目的に照らして現実的ではない。分離菌が、人の病気の起因菌である可能性を考えあわせて対処すべきである。

MPHD法は、キット化によって、術者が適量の菌量を正しく守って説明書にしたがって作業を行えば、同定試験を初めて行う術者であっても簡単に正確な同定ができる方法であり、再現性も良い。また、数値として残るので、客観性がある。もし、吸光度を測定する機械をもたない施設であっても、肉眼的に最初に発色し、明らかに最も濃いところを判定すれば、菌種が同定できる。ただし、発色後長時間放置すると、バックグラウンドが高くなったり、相対類似度が高い菌種では、判定不可になるので注意を要する。

また、供試菌は、従来法のように対数増殖時の新鮮菌を使う必要がなく、多少古い菌であっても、あるいは、-20°Cに凍結保存した菌であっても使用可能である。アイソトープを使う必要がなく、同定試験に必要な時間は、1検体なら、3~4時間で終了するので迅速な同定法である。現在の臨床検査の同定試験法を迅速化するためには、極めて有用な方法であろうと考えている。

ま と め

MPHD法による抗酸菌同定キットをもちいて21

菌種180株を試験したところ、標準株は既知名と一致したが、臨床株では、菌種によって一部不一致が見られた。現在、*M. fortuitum* と *M. peregrinum* は同義語とされているがMPHD法では明らかに区別でき別の種であると考えられる。このキット使用による同定の成否は、①適切な菌量、②DNA抽出法、③十分な除タンパク、④発色後の測定時間、にかかっている。これらを適切に行えば、通常同定法より迅速・明確な菌種同定が可能である。

本研究の要旨は、第67回日本結核病学会総会（広島）にて発表した。

謝 辞

マイクロプレートハイブリダイゼーション法抗酸菌同定キットを提供していただいた小林製薬株式会社と、MACを分与いただいた結核予防会結核研究所阿部博士に感謝致します。

文 献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌分類委員会：臨床材料に見いだされる抗酸菌とその鑑別，同定法 抗酸菌分類委員会試案，結核. 1976；51：247-256.
- 2) 室橋豊穂，他：結核菌検査指針，1979年版，日本公衆衛生協会.
- 3) 内藤裕子，久世文幸，前川暢夫：抗酸菌の臨床細菌学的同定に関する一考察，結核. 1979；54：481-490.
- 4) 束村道雄，水野松司，村田 浩：簡単な検査による抗酸菌の同定法，結核. 1982；57：335-342.
- 5) 斎藤 肇：非定型抗酸菌とその類似菌の鑑別，同定法，臨床検査. 1985；29：394-404.
- 6) 微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3版，日本公衆衛生協会，1987.
- 7) 高橋 宏：抗酸菌の培養同定検査，Medical Technology. 1988；16：135-142.
- 8) 斎藤 肇，富岡治明，佐藤勝昌，他：Gen-probe[®]による *Mycobacterium avium-intracellulare* complex の鑑別・同定，結核. 1988；63：261-269.
- 9) 富岡治明，佐藤勝昌，斎藤 肇：諸種抗酸菌の *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* および *Mycobacterium intracellulare* 各特異的 DNAプローブ (Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System) に対する反応性，結核. 1991；66：405-411.
- 10) Sjöbring U, Mecklenburg M, Andersen AB et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1990；28：2200-2204.
- 11) 山崎利雄，中村玲子：ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法による抗酸菌の検出，結核. 1992；67：441-447.
- 12) 楠 伸治，為定 誠，畑中康代，他：マイクロプレートハイブリダイゼーション法によるマイコバクテリウム属菌の同定，第13回臨床抗酸菌研究会講演内容，1990，9-16.
- 13) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al. Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 mycobacterium species. J Clin Microbiol. 1991；29：1596-1603.
- 14) Ezaki T, Hashimoto Y, Yamamoto H, et al. Evaluation of the Microplate Hybridization method for rapid identification on *Legionella* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1990；9：213-217.
- 15) 江崎孝幸，Shatha Adnan，三宅正美：菌種の分類学的類似度を測定する定量的マイクロプレートハイブリダイゼーション法，日本細菌学会雑誌. 1990；45：851-857.
- 16) 青木洋介，加藤 収，山田穂積，他：DNA Hybridization (Microplate 法) による肺結核の迅速診断の試み—基礎的検討，第66回日本結核病学会総会抄録，結核. 1991；66：275-276.
- 17) 青木洋介，加藤 収，山田穂積，他：DNA Hybridization を用いた肺結核の迅速診断—喀痰中結核菌の直接検出—，第67回日本結核病学会総会抄録，結核. 1992；66：278.