

原 著

 $\alpha$  抗原を利用した結核菌の非放射性迅速薬剤感受性試験

重 藤 えり子\*

国立療養所広島病院呼吸器科

田 坂 博 信

広島大学医学部細菌学

受付 平成7年 6月21日

受理 平成7年 10月25日

DRUG SUSCEPTIBILITY TEST FOR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
USING NON-RADIOACTIVE SUBSTANCE, ALPHA-ANTIGEN

Eriko SHIGETO\* and Hiromichi TASAKA

(Received 21 June 1995/Accepted 25 October 1995)

BACTEC system is a reliable and rapid drug susceptibility test for mycobacteria and is widely accepted in Europe and in the United States of America. In Japan, it is impossible to introduce the BACTEC system in clinical laboratories because of strict regulations for the use of radioactive substances in Japan. To resolve this dilemma, we adopted alpha-antigen ( $\alpha$ -antigen), a widely distributed secretory protein of mycobacteria, as the index substance replacing the radioactive substance  $^{14}\text{C}$  in BACTEC system.

Alpha-antigen was detected by reverse passive latex agglutination (LA), using latex sensitized with rabbit anti- $\alpha$ -IgG.

Susceptibility of 17 *M. tuberculosis* strains isolated from patients, grown on Ogawa egg medium and then cultured in 7H9 medium, and of 46 *M. tuberculosis* strains freshly isolated from patients by 7H9 medium of MB check system, was tested for four antituberculosis drugs, isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM) and ethambutol (EB). Ninety four percent of the control cultures were positive for  $\alpha$ -antigen within 7 days after the inoculation. The MIC values of H37Rv strain in 7H9 medium determined by the method of Heifets were 0.05  $\mu\text{g/ml}$  for INH, 0.03  $\mu\text{g/ml}$  for RFP, 0.25  $\mu\text{g/ml}$  for SM and 1.9  $\mu\text{g/ml}$  for EB.

In 17 strains from Ogawa egg medium, the results obtained from all but 4 strains for SM, 1 for INH, 1 for RFP and 7 for EB were concurrent with that obtained by the method using 1% Ogawa egg medium. No strains were determined to be resistant to any drug by the  $\alpha$ -antigen method and be sensitive by the Ogawa medium method. In 46 strains cultured by the MB check system, the results of 42 strains for SM, 35 for INH, 39 for RFP and 36 for

\* From the National Hiroshima Hospital, 513 Jike, Saijo-cho, Higashihirosima-shi, 739 Japan.

EB coincided with those determined by the Microtiter method. Among the strains determined to be resistant by Microtiter method, 1/2 for SM, 10/14 for INH, 4/17 for RFP and 8/10 for EB were determined to be sensitive by  $\alpha$ -antigen LA method. The disagreement was seen mostly in strains which were determined to be resistant by the method using egg medium, while sensitive by the  $\alpha$ -antigen LA method. The discrepancy might originate from the difference of critical concentration due to heat inactivation of the drugs and absorption in the egg medium. However, some instability was observed in latex agglutination and its cause should be examined further.

This method of utilizing 7H9 medium for culture and  $\alpha$ -antigen as the index of mycobacterial growth can be an expedient and economical drug susceptibility test because it does not use radioactive substance as in the case of BACTEC system.

**Key words :** Mycobacterium, Drug susceptibility test, Alpha-antigen, Latex agglutination, BACTEC system

**キーワード :** マイコバクテリウム, 薬剤感受性試験,  $\alpha$ 抗原, ラテックス凝集反応, BACTEC システム

## はじめに

抗酸菌の薬剤感受性検査については、培地中の薬剤の有効濃度の低下など多くの問題点が指摘されている。また、その結果の信頼性や迅速性の他にも手技が簡単かどうか、経済性はどうかといったことも大きな問題となる。日本で広く利用されてきた小川培地を用いる方法は、長期培養のため薬剤力価の低下がおこるといふ大きな問題点がある。このため大量菌接種による迅速な方法としてマイクロタイター法が普及してきた。しかし、これも卵培地を用いることから、培地の加熱、凝固による薬剤の失活<sup>1)</sup>という問題点は克服できていない。

欧米で普及している BACTEC 法<sup>2)</sup>は薬剤失活の問題も少なく、信頼性、迅速性とも優れている。しかし、検出系として放射性物質<sup>14</sup>Cを用いることが普及のさまたげとなり、日本では日常の検査として取り入れることはできなかった。これに対し、<sup>14</sup>Cの代わりに指標となる物質として luciferase や種々の蛍光物質を用いる<sup>3)-5)</sup>などいくつかの方法が検討されている。これらは、いずれも非放射性物質を用い、迅速に結果が得られるという利点をもっているが、それに要する費用面を考えると問題があるものも多い。特に、結核が多い発展途上国での利用には経済性は大きな問題であろう。

このような点を考慮し、BACTEC TB 460 system に準じた手法を用い、検出系として<sup>14</sup>Cのかわりに *Mycobacterium* が産生する特異的な  $\alpha$  抗原<sup>6)</sup>を用いたラテックス凝集反応を利用する方法を検討した。

## 方 法

### (1) 抗 $\alpha$ 抗体の精製

$\alpha$  抗原で免疫したウサギの polyclonal な抗  $\alpha$  抗体から、33%飽和硫酸アンモニウムで IgG 分画を  $\alpha$ -T 抗原結合 sepharose column を用いた affinity chromatography を行って精製した。

### (2) 感作ラテックスの作製

精製抗  $\alpha$ -T 抗体 20 mcg/ml に等量の 0.5% ラテックス (SDL 48GE, 武田薬品) を混和し攪拌しながら 37°C, 2 時間反応させた。その後 0.5% になるようにウシ血清アルブミンを加え、4°C, 一夜攪拌しブロッキングを行った<sup>7)</sup>。遠沈、洗浄後、緩衝液を 0.02M glycine 緩衝生理食塩水 (pH 8.6) に置換した。

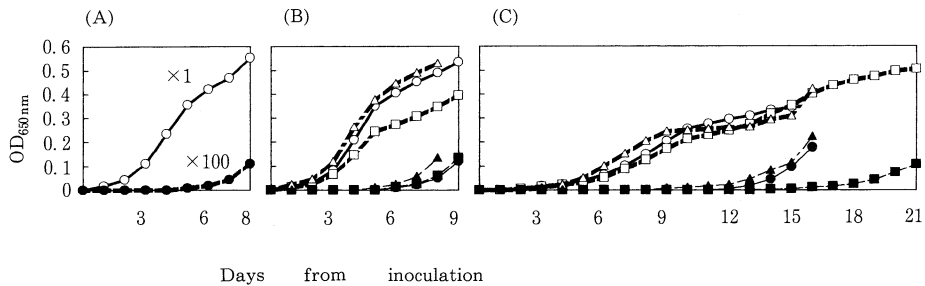
### (3) 逆受身ラテックス凝集反応

96 穴のマイクロプレート (v 型) を用いて抗原液 25  $\mu$ l と感作ラテックス液 25  $\mu$ l を攪拌し、室温に 8 時間以上放置した後、凝集の有無ないし程度を判定した。

### (4) 抗原液の作製と $\alpha$ 抗原の検出

H37Rv, また国立療養所広島病院の結核入院患者からの結核菌株 (小川培地) を Middlebrook 7H9 培地 (Difco) で前培養し、OD<sub>650nm</sub> = 0.328 となった菌液 0.1 ml を 7H9 培地 4 ml に接種 (control 1), また菌液を生理食塩水または PBS に Tween 80 を 0.1 ml/200 ml の割合に加えた希釈液で 100 倍または 50 倍に希釈した液 0.1 ml を 7H9 培地 4 ml に接種して (control 2) 培養し、日を追ってその培養液の OD<sub>650nm</sub> と感作ラテックスによる  $\alpha$  抗原の凝集価を観察した。

薬剤含有培地は、BACTEC 法に準じて 7H9 培地 4



**Fig. 1** Bacterial growth of some *M. tuberculosis* strain in 7H9 medium as measured in terms of  $OD_{650nm}$  (A) H<sub>37</sub>Rv strain; (B) clinical isolates (susceptible to all tested drugs); (C) clinical isolates (resistant to at least 3 drugs including INH and RFP). ○, △, □, Growth in medium (4 ml) planted with 0.1 ml of original inoculum ( $OD_{650nm}=0.3$ ); ●, ▲, ■, growth in medium (4 ml) planted with 0.1 ml of 100-fold dilution of the original inoculum.

mlにそれぞれSM (明治製薬製注射用硫酸ストレプトマイシン) 6.0  $\mu\text{g/ml}$ , INH (第一製薬) 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , RFP (第一製薬) 2.0  $\mu\text{g/ml}$ , EB (日本レグリー) 7.5  $\mu\text{g/ml}$ となるように調整したものを使用し, これに菌液 0.1 mlを加えた。対照に肉眼的に濁りを認め ( $OD_{650nm} \geq 0.1$ , おおむね 0.2 前後) たら各培養液の2倍希釈系列を作り, 逆受身ラテックス凝集反応を行った。

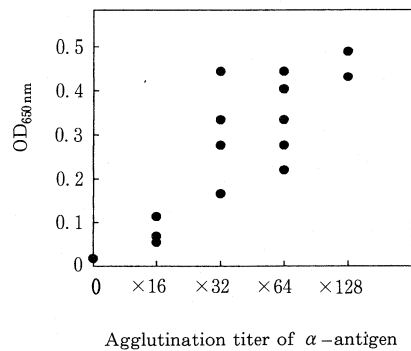
H37Rvについては Heifets ら<sup>8)</sup>の方法により MICの測定を行った。

#### (5) 臨床検体からの菌の薬剤感受性試験

患者喀痰をMBチェックシステム「ロシュ」(日本ロシュ)で培養して得た7H9の菌液を使用して同様の観察を行った。一方, 同じ患者喀痰から小川培地で分離された菌について従来法またはマイクロタイター法<sup>9)</sup>による薬剤感受性試験を行い, その結果を本法と比較した。従来法は1%小川培地を基礎培地とし, 検査濃度はSMは20および200  $\mu\text{g/ml}$ , INHは0.1, 1.0, 5.0  $\mu\text{g/ml}$ , RFPは10, 50  $\mu\text{g/ml}$ , EBは2.5および5.0  $\mu\text{g/ml}$ とした。マイクロタイター法は極東結核菌感受性スペクトル検査用培地で検査濃度はSM 20, 200  $\mu\text{g/ml}$ , INH 0.1, 5.0  $\mu\text{g/ml}$ , RFP 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ , EB 2.5および5.0  $\mu\text{g/ml}$ のものを使用した。

## 結 果

H37Rvと臨床分離株の7H9培地における増殖曲線はFigure 1のごとくであった。また,  $OD_{650nm}$ とラテックス凝集反応による $\alpha$ 抗原検出の関係はFigure 2に示すようで, 重相関係数R値は0.84であり ( $P < 0.001$ ),  $OD_{650nm}$ が0.05 (肉眼ではわずかに濁りが認められる程度)になると $\alpha$ 抗原を検出することができた。すなわち, H37Rvと感受性臨床株は接種菌液が1倍希釈では3日目, 100倍希釈では7日後で $\alpha$ 抗原を検出するこ



**Fig. 2** Correlation between the extent of bacterial growth of *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv in 7H9 medium measured in terms of  $OD_{650nm}$  and that estimated by  $\alpha$ -antigen detecting method.

とができた。耐性菌株では1倍希釈で6日目, 100倍希釈では13~19日目に $\alpha$ 抗原検出可能であった。

H37Rv株のMICはSM 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , INH 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , RFP 0.03  $\mu\text{g/ml}$ , EB 1.9  $\mu\text{g/ml}$ であり, Heifetsらの7H12におけるもの<sup>8)</sup>と同程度であった (Table 1)。

小川培地での臨床分離株についての結果はTable 2に示すように, 小川培地法と本法の判定が一致したのは17株中SM感受性9株, 耐性4株, INH感受性5株, 耐性11株, RFP感受性7株, 耐性9株, EB感受性9株, 耐性1株であった。不一致であったのはすべて小川培地で耐性とされて本法では耐性とされなかったもので, SM 4株, INH 1株, RFP 1株, EB 7株であった。

喀痰からMBチェックで培養した菌液を使用した場合の結果はTable 3に示す。マイクロタイター法での感受性菌23症例26株, 4剤のいずれかの薬剤に耐性を示した10症例20株についての検討が行えた。マイクロ

**Table 1** Comparison of MIC values of 4 antimicrobials for *M. tuberculosis* determined by the  $\alpha$ -antigen-detecting method with those estimated by the BACTEC method<sup>1)</sup>

Drugs	MICs ( $\mu\text{g/ml}$ ) estimated by	
	$\alpha$ -antigen titration method	BACTEC method <sup>2)</sup>
INH	0.05	0.025-0.05
RFP	0.03	0.06-0.25
SM	0.25	0.25-2.0
EB	1.9	0.95-1.9

<sup>1)</sup> MICs of test drugs for *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv are indicated. The MIC value was read from the data of bacterial growth measured on the basis of  $\alpha$ -antigen agglutination titer.

<sup>2)</sup> MICs of the drugs for 17 clinical isolates of *M. tuberculosis* were previously determined by Heifets et al.<sup>3)</sup> using the BACTEC 460 TB System.

**Table 2** Detection of bacterial growth by the  $\alpha$ -antigen detecting method for various *M. tuberculosis* strains with different profiles of drug-resistance in 7H9 medium with or without addition of some antimicrobials

Strain No.	Agglutination titer of $\alpha$ -antigen in medium containing <sup>a)</sup>					Profile of drug-resistance <sup>b)</sup>
	None <sup>c)</sup>	SM <sup>d)</sup>	INH <sup>d)</sup>	RFP <sup>d)</sup>	EB <sup>d)</sup>	
1	×64	0	0	0	0	susceptible
2	×32	0	0	0	0	susceptible
3	×32	0	0	0	0	susceptible
4	×32	0	×16	×16	0	INH, RFP, EB
5	×16	×16	0	0	0	SM
6	×16	0	0	0	0	SM
7	×16	×16	×32	0	0	SM, INH, RFP, EB
8	×16	0	×16	×16	0	INH, RFP, EB
9	×32	0	×16	×16	0	INH, RFP, EB
10	×32	0	×32	×32	0	SM, INH, RFP
11	×16	0	×16	×16	0	INH, RFP
12	×16	0	0	0	0	SM, INH
13	×32	0	×32	×32	0	INH, RFP
14	×16	×16	×8	×16	0	SM, INH, RFP, EB
15	×16	×16	×16	0	0	SM, INH, RFP, EB
16	×16	0	×8	×16	×8	SM, INH, RFP, EB
17	×64	0	×64	×64	0	INH, RFP, EB

a)  $\alpha$ -Antigen titration was done for indicated strains in 7H9 medium containing SM (6  $\mu\text{g/ml}$ ), INH (0.2  $\mu\text{g/ml}$ ), RFP (2.0  $\mu\text{g/ml}$ ), or EB (7.5  $\mu\text{g/ml}$ ), or not.

b) Drug resistance profiles of test strains determined by the conventional method using Ogawa egg medium are indicated.

c) The control (drug-free) medium (4ml) was planted with 0.1ml each of 50-fold dilution of the original inoculum ( $\text{OD}_{650\text{nm}}=0.3$ ).

d) Drug-containing medium was planted with 0.1ml each of the original inoculum.

タイター法での耐性基準は SM 20  $\mu\text{g/ml}$ , RFP 50  $\mu\text{g/ml}$ , EB 5  $\mu\text{g/ml}$  とした。INH についてはマイクロタ

イター法での検査濃度が 0.1  $\mu\text{g/ml}$  と 5  $\mu\text{g/ml}$  のみであり、今回は 0.1  $\mu\text{g}$  を基準とした。

**Table 3** Detection of bacterial growth by the  $\alpha$ -antigen detecting method for clinical isolates of *M. tuberculosis* in 7H9 medium with or without addition of some antimicrobials

Strain No.	Agglutination titer of $\alpha$ -antigen in medium containing				Profiles of drug-resistance <sup>b)</sup>			
	none (1) <sup>a)</sup>	(2) <sup>a)</sup>	(3) <sup>a)</sup>	SM	INH	RFP	EB	
1	× 16		× 32	—	—	—	—	susceptible
2	× 16		× 16	—	—	× 4	—	susceptible
3	× 32		× 16	× 4	—	—	—	susceptible
4	× 256		× 4	—	× 2	—	× 2	susceptible
	× 128		× 16	—	× 2	—	—	susceptible
5	× 128		× 4	—	—	—	—	susceptible
6	× 128		× 4	× 4	× 2	× 2	× 2	susceptible
7	× 32		× 16	—	—	—	—	susceptible
8	× 64		× 4	—	—	—	—	susceptible
9	× 256		× 8	× 2	× 4	× 32	× 16	susceptible
10	× 128		× 8	—	—	—	—	susceptible
	× 256		× 16	—	—	—	—	susceptible
11	× 256		× 4	—	—	—	—	susceptible
12	× 256		× 4	—	—	—	× 2	susceptible
13	× 128		× 8	× 4	× 4	× 8	× 4	SM, INH, RFP, EB
	× 256		× 4	× 16	× 4	× 128	× 2	SM, INH, RFP, EB
14	× 64		× 16	—	—	—	—	INH, RFP, EB
15	× 256		× 8	× 4	× 2	× 8	× 4	RFP
16	× 64		× 16	× 2	× 4	× 4	× 2	INH
17	× 128		× 4	—	× 2	× 4	—	INH, RFP
	× 64		× 4	× 4	× 4	× 64	× 4	INH, RFP, EB
		× 256		× 128	× 16	× 256	× 64	INH, RFP
18	× 64		× 16	—	—	× 8	—	RFP
		× 128		× 16	× 256	× 16	× 32	INH, RFP
		× 256		—	× 8	× 256	× 32	RFP
		× 64		× 4	× 16	× 16	× 4	INH, RFP
19	× 64		× 4	—	—	—	—	RFP, EB
		× 64		× 2	—	—	—	RFP, EB
		× 128		× 8	× 8	× 128	× 16	RFP, EB
20		× 256		× 16	× 16	× 16	× 16	susceptible
21		× 128		× 8	× 8	× 64	× 2	susceptible
22		× 16		× 4	× 16	× 64	× 16	susceptible
23		× 128		—	× 4	× 8	× 2	susceptible
24		× 256		× 8	× 16	× 16	—	susceptible
		× 256		—	× 4	× 4	× 16	susceptible
25		× 128		× 4	× 8	—	—	susceptible
26		× 64		—	× 32	× 4	× 4	susceptible
27		× 256		—	× 8	× 16	× 2	susceptible
28		× 32		—	—	—	—	susceptible
29		× 128		× 4	× 2	× 16	× 16	susceptible
30		× 128		—	—	—	—	susceptible
31		× 256		—	× 128	× 256	× 16	INH, RFP, EB
32		× 256		× 2	× 2	× 64	—	INH
		× 64		—	× 8	× 8	× 8	INH
33		× 128		× 4	× 8	× 128	× 8	INH, RFP, EB
		× 256		—	× 256	× 256	× 256	INH, RFP, EB

a) The control (drug-free) medium (4ml) was planted with 0.1ml each of (1), the original inoculum ; (2), 50-fold dilution of the original inoculum ; (3), 100-fold of the original inoculum.

b) Drug resistance profiles of test strains determined by the Microtiter method<sup>9)</sup> using Ogawa egg medium are indicated.

**Table 4** Comparison of days required for drug susceptibility test using  $\alpha$ -antigen method and Microtiter method

Assay method	Number of test strains	Number of strains determined for their drug susceptibility on days						
		7	10	14	17	21	24	28
$\alpha$ -Antigen method	46	43	2	1	—	—	—	—
Microtiter method	86	3	0	64	8	9	1	1

**Table 5** Critical drug concentrations determined in different media

Drugs	Critical drug concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) measured in			
	7H9 medium ( $\alpha$ -antigen) <sup>a)</sup>	7H12 medium (BACTEC) <sup>a)</sup>	1% Ogawa egg medium (Microtiter) <sup>a)</sup>	1% Ogawa egg medium (conventional) <sup>a)</sup>
SM	6.0	6.0	20	20
INH	0.2	0.2	1	0.1
RFP	2.0	2.0	50	50
EB	7.5	7.5	5	5

<sup>a)</sup> In parenthesis, the methods for drug susceptibility testing using individual media are indicated.

本法で100倍希釈対照と同等以上または50倍希釈対照より一段階下以上の抗体価を示したものを耐性とする、マイクロタイター法と本法が一致したのは46株中SM感受性41株、耐性1株、INH感受性31株、耐性4株、RFP感受性26株、耐性13株、EB感受性34株、耐性2株であった。不一致のものはマイクロタイター法耐性で本法では耐性とされなかったものが多く、薬剤別ではSM 1/2 (本法感受性株数/マイクロタイター法耐性株数)、INH 10/14、RFP 4/17、EB 8/10であった。マイクロタイター法で感受性菌とされた26株のうち、本法で耐性と判定されたものは3株、延べ7剤あった。

検査は培地に肉眼で混濁が認められるようになった時点で行うこととしたが、喀痰からの分離菌の場合実際には数検体をまとめて検査することになり、大半は菌液接種後7日目に検査を行った。すなわち、大半の菌は7日以内に判定可能であった。一部多剤耐性菌では14日前後を要した。日を追っての結果の判明状況を、同じ症例から得た菌についてのマイクロタイター法での結果判明状況と併せてTable 4に示す。

### 考 案

結核菌の薬剤感受性試験に際して、日本で多く利用されている卵培地を用いる方法では薬剤の失活という問題があるが、本法はBACTEC TB 460 systemに準じた方法で液体培地の7H9を使用するものであり、このよ

うな問題は小さい。検査所要日数もBACTEC法に準じておおよそ7日以内であって、14日程度を要するマイクロタイター法の1/2程度の所要時間短縮が可能であり、迅速性も期待できる。

今回の検討では小川培地法またはマイクロタイター法でEBについての耐性がある株について、本法で耐性と判定されるものの率が低かった。またSMについても、卵培地で耐性とされたもののうち半数しか本法で耐性と判定されなかった。小川培地法、マイクロタイター法との不一致は、方法も耐性検査濃度も異なることから一部にあっても当然であろう。マイクロタイター法を含め、卵培地を用いる方法は宿命的に薬剤の有効濃度の低下がおこるため、特にSMとRFPについては耐性濃度が著しく高く設定されている (Table 5)。液体培地である7H9培地を用いる本法ではこのような問題点はなく、マイクロタイター法との相違はこのためとも考えられる。また、マイクロタイター法は少量の培地に対しての大量菌接種法であり、接種菌量の適否や耐性菌検出の可能性などの問題が影響していたかもしれない。しかし、EB、SMについては本法とマイクロタイター法の差が大きいため、今後7H9培地や7H11培地などを用いた他の方法と本法との比較を行い、本法の感度や問題点を明らかにしていく必要がある。

本法の問題点としては、BACTEC法と異なる検出系である凝集反応に際しての不安定要因が考えられる。同

じ症例からの菌株で、結果が検査毎に異なるものがあることから、凝集反応に際して非特異的な要素の介入が考えられる。また、対照の抗体価から考えて、Table 3に示すものの一部では凝集反応実施のタイミングが遅すぎた可能性もあるが、今回は検討できなかった。

なお、H37Rv株の薬剤感受性検査結果でcontrol 1 (×1)を接種した場合に、INH, EB含有培地の菌液で軽度ながら凝集がみられたが、これは両剤が細胞壁合成阻害剤であるため接種菌液中の菌体から $\alpha$ 抗原も流出するためではないかと思われる。しかし、これは接種菌量を50倍または100倍に希釈することで解決された。

抗酸菌の迅速検出法には既に広く使用されているアクリジニウムエステル標識DNAプローブを用いたhybridization protection assay, また BACTEC 9000 TB System や Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 等が開発されており、薬剤感受性試験への応用も試みられている<sup>10-12)</sup>。しかし、これらの方法は従来法と比較するとかなりの費用がかかり、広く使用されるには問題があると考えられる。今回検討した、 $\alpha$ -抗原を菌の増殖の指標とする方法は培養設備と試薬を含めたキットがあれば特別に新たな機器を必要とせず、簡便で経済的である。また、マイコバクテリウムに特異的な $\alpha$ -抗原という物質を指標とする点は、非特異的な菌の代謝の結果である酸素消費を検出しようとするMGIT等より有利であると考えられる。

本法は種々の検討課題はあるが、INH, RFPについての耐性は従来の方とよく相関しており、実用性にも期待がもてる。器具の工夫等による手技の単純化、また、不安定要因の特定、排除ができればBACTEC法の代替として迅速で経済的な検査法となる可能性を持っていると考えられる。

## ま と め

BACTEC TB 460 system の検出系として、<sup>14</sup>Cのかわりにマイコバクテリウムが産生する $\alpha$ 抗原を使用することで、薬剤感受性検査が可能であった。凝集反応に際しての多少の不安定要因の検討と、より多くの臨床分離株についての経験が必要であろうが、今後非放射性で迅速な経済的薬剤感受性検査法として期待できる。

なお本論文の主旨は第68回日本結核病学会総会、および第69回日本結核病学会総会において発表した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、多くの菌の培養と検査に多大の労力をさいて下さった国立療養所広島病院細菌検査室の桂 秀昭技師に深く感謝致します。

また、薬剤を御提供いただいた第一製薬株式会社、日本レダリー株式会社に感謝致します。

## 文 献

- 1) 高橋 宏：抗酸菌の薬剤感受性検査。臨床検査。1990；34：405-411。
- 2) Siddiqi SH, et al. : Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric and two conventional methods. J Clin Microbiol, 1985；22：919-923。
- 3) Bercovier H, Resnick M, Kornitzer D, et al. : Rapid method for testing drug-susceptibility of *Mycobacteria* spp. and gram-positive bacteria using rhodamine 123 and fluorescein diacetate. J Microbiol. Methods. 1987；7：139-142。
- 4) Nilsson LE, Hoffner SE, Ansehn S : Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of Mycobacterial ATP. Antimicrob. Agents Chemother. 1988；32：1208-1212。
- 5) Jacobs WR Jr, Barletta RG, Udani R, et al. : Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. Science. 1993；260：819-822。
- 6) Tasaka H, Kiyotani K, Matsuo Y : Purification and antigenic specificity of alpha protein (Yoneda and Fukui) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*, Hiroshima J Med Sci, 1983；32：1-8。
- 7) 杉山純一：逆受身ラテックス凝集反応によるエンテロトキシン検出法の研究 第1報 コレラ毒素および毒素性大腸菌易熱性毒素についての研究。山口医学。1983；32：259-267。
- 8) Lee C, Heifets LB : Determination of minimal inhibitory concentration of antituberculous drugs by radiometric and conventional methods. Am Rev Respir Dis. 1987；136：349-352。
- 9) 川村 達：「結核菌耐性スペクトル検査法」, 近代医学社, 東京, 1971。
- 10) 宮本潤子, 古賀宏延, 河野 茂, 他 : Hybridization protection assay (HPA 法)を用いた結核菌の迅速薬剤感受性検査。結核。1995；70：377-

- 383.
- 11) Kodsi SE, Walters SE, Stitt DT, et al. : Rapid detection of MDRTB from culture using a Nobel Susceptibility System. In Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology, Las Vegas, Nevada, 1994.
- 12) Walters SB, Hanna BA, Kodsi SE et al. : Rapid detection of multidrug-resistance tuberculosis (MDRTB) directly from specimens with the Mycobacteria Growth Indicator Tube. In Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology, Las Vegas, Nevada, 1994.