

## 第72回総会特別講演

## 結核症の迅速診断

阿部 千代治

結核予防会結核研究所

The 72nd Annual Meeting Special Lecture

## RAPID DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

Chiyoji ABE\*

Two systems, the newly developed Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) and biphasic Septi-Chek AFB based on liquid media, proved to be significantly better than the egg-based solid media for the isolation of mycobacteria from clinical specimens. The difference in the rates of isolation of bacteria between the two groups of media was more remarkable with smear-negative specimens. The isolation of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by MGIT occurred 8 days previous to the isolation by the conventional Ogawa method. The mean time for detecting *M. tuberculosis* complex by Septi-Chek AFB was similar to those of the Ogawa method. A greater difference in isolation time was observed for mycobacteria other than *M. tuberculosis* (MOTT) isolates. These results indicate that the MGIT and Septi-Chek AFB systems based on liquid media are efficient for the recovery of mycobacteria.

PCR and other nucleic acid amplification methods are widely used for the detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens. Although the sensitivities of the Gen-Probe Amplified Mycobacteria Direct Test (MTD) and Amplicor Mycobacteria for the detection of the *M. tuberculosis* complex appear to be similar to the sensitivity of the culture method using the Septi-Chek AFB, the two methods should be quite useful for rapid detection of *M. tuberculosis* infections. On the other hand, two cooperative blind studies conducted between 6 to 9 laboratories to estimate the reliability and reproducibility of these two commercially available kits revealed the necessity of good laboratory practice and development of reference reagents to monitor the performance of the whole assay, including pretreatment of clinical specimens.

Considerable progress has been made in recent years toward understanding the molecular basis of the resistance to antituberculosis drugs, isoniazid (*katG*, *inhA*, *ahpC*), rifampin (*rpoB*), pyrazinamide (*pncA*), streptomycin (*rpsL*, *rrs*), ethambutol (*embB*), and fluoroquinolones (*gyrA*). Most cases of resistance are related usually to simple nucleotide substitutions rather than to acquisition of new genetic elements. Multidrug-resistant isolates of *M. tuberculosis* arise as a consequence of sequential accumulation of

別刷り請求先：  
阿部千代治  
結核予防会結核研究所  
〒204 東京都清瀬市松山3-1-24

\* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan  
Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24 Matsuyama,  
Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.  
(Received 10 Sep. 1997)

mutations conferring resistance to single therapeutic agents. The basis of resistance is not able to be explained yet in a substantial percentage of strains (>90%) for other antituberculosis drugs than rifampin. Further studies are required to fully understand the molecular mechanisms of resistance.

**Key words** : Rapid diagnosis, MGIT, Amplicor, MTD, Genes involved in drug resistance

キーワードズ : 迅速診断法, MGIT, アンプリコア, MTD, 薬剤耐性に関与する遺伝子

## I. はじめに

全世界で新たに発生する結核患者は年間約800万人で、約300万人が結核で死亡していると見積もられている<sup>1)</sup>。それらの約2/3はアジアの人で占められている。単独の感染症による死亡で見るとマラリアの約2倍で第一位である。わが国においても年間約3,000人が結核で死亡しており、平成7年度は43,078人が新患者として登録されている<sup>2)</sup>。結核罹患率減少速度の鈍化、非結核性抗酸菌症の増加、塗抹陽性者の増加、在日外国人の結核、高齢者の結核など結核の現状はこれまでとは大きく様変わりしてきた。

結核の罹患率が低いオランダやフランスなどヨーロッパ諸国や米国などではここ数年の間に結核患者が増加している。その原因として外国人の結核とエイズに伴う結核の増加があげられている。米国などではエイズ患者の間に多剤耐性結核菌による集団感染<sup>3)</sup>が多発している。これらは最も効果的な抗結核薬であるイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) の両者に耐性を獲得している菌による感染であり、死亡率は極端に高く、しかも病気の進行が速く、結核の診断から死亡までのメジアンも4~16週間と非常に短い。このことは迅速な診断法と迅速な感受性試験法の開発が急務であることを示している。

## II. 分離培養法

わが国で標準法として用いてきた水酸化ナトリウム液による前処理と3%小川培地による培養法は諸外国で用いられている方法に比べて、排菌量の多い場合には増殖支持力、雑菌の汚染からの防止、作業能率の点で勝っていた。しかし化学療法が広く行われていることもあり、塗抹陽性・培養陰性菌の出現が多くみられるようになり、もっと栄養豊富な培地の使用が要求されるようになってきた。

これまでにも液体培地の有効性を否定する研究者はいなかったが、同時に前処理後にも材料中に生残する抗酸

菌以外の微生物の増殖も高めることが予想され、わが国では使われなかった。欧米諸国においては選択培地の開発に力が注がれ、5種の薬剤からなる抗菌補助剤が確立された。これは新しい培養システムの開発を可能にした。抗酸菌の検出に新しい考えを取り入れた培養法を以下に述べる。

### 1. 新しい培養システム

#### 1) セプティチェック (Septi-Chek) AFB

液体培地と固形培地の二相からなる培養システムであり<sup>4)</sup>、ロシュ社により開発され、現在はベクトン・ディッキンソン社から発売されている。液体培地部分は20mlのミドルブルック7H9液体培地が分注してあるボトルに、使用前に凍結乾燥してある抗酸菌培養用抗生物質 (ポリミキシンB, アンフォテリシンB, ナリジクス酸, トリメトプリム, アズロシリン: PANTA) と発育促進物質を溶解して加えることにより調製する。スライドには3種類の固形培地がすでに固められている。それらは、ほとんどの抗酸菌の発育に適する改良ミドルブルック7H11寒天培地、卵培地、抗酸菌以外の雑菌の汚染を調べるためのチョコレート寒天培地からなっている。アルカリ処理材料を中和することなしに直接セプティチェックボトルへ接種することはできない。臨床材料からの抗酸菌の分離率を上げるために前処理法としてNALC-NaOH法を用いることを勧める。最初は週に2~3度観察し、汚染の状況と迅速発育抗酸菌の発育をチェックする。その後は週に1度観察し、コロニーがみられるまで観察時にシステムを転倒する。通常は8週までみて固形培地上のコロニーの有無と液体培地中の菌の発育を検査する。

#### 2) BACTEC 法

ラジオメトリック法であり<sup>4)5)</sup>、ベクトン・ディッキンソン社により開発された。細菌の迅速検出のために、産生されるCO<sub>2</sub>を測定する方法が取られている。抗酸菌は脂肪酸を好んで利用することが知られており、なか

でもパルミチン酸の取り込みが特に高い。<sup>14</sup>Cで標識されたパルミチン酸が抗酸菌により代謝されたとき<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>が産生される。産生された<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>をBACTEC TB460で測定することで抗酸菌を迅速に検出する培養法である。このシステムでは代謝すなわち菌の増殖と考え検出する。

培地はミドルブルック 7H9 液体培地 (4ml) を基礎培地として、他に抗酸菌培養用抗生物質 (PANTA) と発育促進物質、<sup>14</sup>C 標識基質からなっている。NALC-NaOH 法で前処理した臨床材料を最大0.5ml までこの培地に接種できる。最初の2週間は週に2回、その後の4週間は週に1回ボトルの頭部に蓄積された<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>をTB460で測定する。Growth Index (GI) 値が10以上を示した時を陽性として、培養の一部を注射器で採取し、塗抹抗酸性染色により抗酸菌の有無を確認する。

この培養システムはラジオアイソトープを使うことから、その使用は結核菌とアイソトープの2つのハザードの使用が可能な施設に限られる。また使用後のボトルの廃棄の問題もあり、日本では日常検査に導入することはできない。

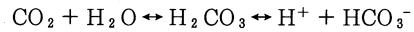
### 3) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

溶存酸素に鋭敏なセンサーを用いた非放射性抗酸菌迅速検出システムであり<sup>6)</sup>、ベクトン・ディッキンソン社により開発された。蛍光物質である Tris 4,7-diphenyl-1, 10-phenantroline ruthenium chloride は酸素のない状態で蛍光を発するが、酸素の存在下ではその蛍光が消される。菌が培地中で増殖して培地の溶存酸素を消費したとき、培地の酸化還元電位は負の方向に移動するため酸素による蛍光の発光阻害は低下する。その結果、蛍光が発せられる。蛍光は365nm 波長の UV トランスイルミネーターまたは長波長 UV 光 (ウーズランプ) で測定できる。

小試験管 (16×100mm) の底部にシリコンで蛍光物質を埋め込んでいる。水はシリコンを通過できないが、酸素分子は自由に通過できる。培地は、ミドルブルック 7H9 液体培地 (4ml) を基礎培地として、他に抗酸菌培養用抗生物質 (PANTA) と発育促進物質からなっている。NALC-NaOH 処理した臨床材料を最大0.5ml まで接種可能である。陽性のシグナル (オレンジ色) が見られた場合に、培養の一部を採取して塗抹染色法により抗酸菌を確認する。37℃のインキュベーターを内蔵し、蛍光の測定を自動で行うコンピューター制御の測定機が開発されている。この中に1,000本の試験管を収納でき、陽性のシグナルを示した時点でその試験管を取り出し、次の試験に移ることができる。

### 4) MB/BacT Microbial Detection System

抗酸菌の代謝時に産生される CO<sub>2</sub> に鋭敏なセンサーを用いた抗酸菌迅速検出システムであり<sup>7)</sup>、オルガノテクニカ社により開発された。ボトルの底部に CO<sub>2</sub> センサーが取り付けられており、半透性の膜で培地と仕切られている。水素イオンや培地成分を含むイオンは膜を通過できないが CO<sub>2</sub> は自由に通過できる。増殖に伴い産生される CO<sub>2</sub> は膜を通過しセンサーのある部分に入り、水に溶けた時に次のような反応が起こる。



産生された H<sup>+</sup> がセンサーと反応する。アルカリ性状態の時には青色ないし暗緑色であるが増殖にともない H<sup>+</sup> イオンの濃度が高まり、pH は下がってくる。その結果センサーは淡緑色に変わり、最終的に黄色になる。発せられた光をフォトダイオード (Photodiode) を用いた検出器で検出する。

培地は発育促進物質を含む変法ミドルブルック 7H9 液体培地 (10ml) であり、他に抗酸菌培養用抗生物質 (PANTA) を含んでいる。NALC-NaOH 前処理した材料の0.5ml を注射器でボトルに接種する。ボトルをインキュベーター、シェーカー、検出器を備えた MB/BacT にセットする。その後はコンピューターで管理される。陽性のシグナルを示したボトルから培養の一部を採取して、抗酸性の染色により抗酸菌を確認する。

### 5) MB REDOX

酸化還元インディケータを用いた抗酸菌培養システムであり<sup>8)</sup>、ピオテスト社により開発された。溶存酸素により有機物が酸化され、培地は正の酸化還元電位を示す。しかし微生物が増殖し酸素の消費がみられたとき、この電位はより負の方向に動く。

基礎培地としてキルヒナー培地を用いており、スクリュウキャップ付き中試験管 (16×130mm) に4ml 分注されている。MB-REDOX 培地は他に血清と抗酸菌培養のための抗生物質 (PACT) および酸化還元インディケータ (テトラゾリウム塩) を含んでいる。NALC-NaOH 前処理材料の0.1~0.5ml をキャップのゴム栓を通し注射器でまたはキャップをはずしピペットでこの試験管に接種できる。抗酸菌を含む試験管では増殖に伴い、インディケータは還元されピンク、赤または青紫色に変わる。陽性サンプルでは着色した粒子 (菌塊) が観察される。場合により培養全体が着色することもある。最初の観察は培養開始24時間後に行う。その後は週に2回行い、4週間からは週1回観察する。陽性のシグナルが見られた時点で塗抹染色により抗酸菌を確認する。

### 2. 新しい培養法による臨床材料からの抗酸菌の分離

新しく開発された MGIT システムについて、臨床材

Table 1 Isolation of Mycobacteria from 305 Sputum Specimens with Different Media

Species (No. of isolates)	No. (%) of isolates detected by the following method :			
	MGIT	Septi-Chek	Modified Ogawa	Ogawa
<i>M. tuberculosis</i> complex (39)	32 (82.1)	37 (94.9)	33 (84.6)	26 (66.7)
MOTT (44)	38 (86.4)	33 (75.0)	30 (68.2)	24 (54.5)
Total (83)	70 (84.3)	70 (84.3)	63 (75.9)	50 (60.2)

MOTT: Mycobacteria other than *M. tuberculosis*

For detection of *M. tuberculosis* complex; Septi-Chek vs Ogawa:  $p < 0.01$

For detection of MOTT; MGIT vs Ogawa:  $p < 0.01$ , MGIT vs Modified Ogawa:  $p < 0.05$

Septi-Chek vs Ogawa:  $p < 0.05$

For detection of total mycobacteria; MGIT or Septi-Chek vs Ogawa:  $p < 0.001$

Table 2 Recovery of Mycobacteria from 305 Smear-positive and Smear-negative Specimens with Different Media

Isolates (n)	No. (%) of isolates detected by the following methods :			
	MGIT	Septi-Chek	Modified Ogawa	Ogawa
Smear-positive				
<i>M. tuberculosis</i> (27)	22 (81.5)	26 (96.3)	24 (88.9)	20 (74.1)
Smear-negative				
<i>M. tuberculosis</i> (12)	10 (83.3)	11 (91.7)	9 (75.0)	6 (50.0)
Smear-positive				
MOTT (19)	19 (100)	18 (94.7)	17 (89.5)	15 (78.9)
Smear-negative				
MOTT (25)	19 (76.0)	15 (60.0)	13 (52.0)	9 (36.0)

For detection of *M. tuberculosis*

from smear-positive specimens; Septi-Chek vs Ogawa:  $p < 0.05$

from smear-negative specimens; Septi-Chek vs Ogawa:  $p < 0.05$

For detection of MOTT

from smear-positive specimens; MGIT vs Ogawa:  $p < 0.05$

from smear-negative specimens; MGIT vs Ogawa:  $p < 0.01$

Table 3 Mean Time to Detection of Patients Who Were Positive for All Methods

Isolates (n)	Days to positive culture			
	MGIT	Septi-Chek	Modified Ogawa	Ogawa
<i>M. tuberculosis</i> (25)	12.9	21.2	21.2	21.6
MOTT (19)	7.4	11.0	18.3	20.4

料からの抗酸菌の検出率と検出までに要する日数を同じ液体培地を基礎としたセプティチェック、従来からの小川法および液体培地への接種の場合と同じ方法で処理した材料を接種した小川変法の成績を比較した<sup>9)</sup>。4培養システムで305例の喀痰材料を培養した成績をTable 1に示した。液体培地を基礎としたMGITまたはセプティチェックの検出率は84.3%であったのに対し小川法の検出率は60.2%と低かった。この検出率の差は有意であっ

た。塗抹陽性材料はもとより塗抹陰性材料からもMGITとセプティチェックで高率に菌を検出できたが、小川培地を用いた時に塗抹陰性材料からの検出率は極端に低かった。この傾向は結核菌のみならず非結核性抗酸菌でも同様であった (Table 2)。

結核菌群の検出までに要する日数を4培養システムすべてで検出できた例について比較した (Table 3)。MGITによる結核菌の検出までに要する平均日数は

12.9日, 非結核性抗酸菌では7.4日であった。これに対し, セプティチェック, 小川法の結核菌の検出までに要する日数は21日であり, MGITより1週間多い日数を必要とした。

雑菌による培地の汚染は新しい培養法を臨床試験に応用する上で重要である。小川法の培地の汚染率は4.9%, アルカリ処理後, 希釈濃縮材料を接種した小川変法の汚染率は4.6%であった。これに対し, 液体培地を基礎とした2システムでは3%以下であった。

このMGITは小試験管を使用していることから培養に場所を取らないこと, 試験管ラックごとトランスイルミネーターにのせ短時間のうちに観察できること, 検出感度は小川法と比べ有意に高いこと, しかも迅速に結果が得られることなどから将来広く利用されるものと期待される。すでに開発されている全自動培養・測定機を使うことにより観察のための作業は短縮される。

MB/BacTシステムは検査システムとして確立されたものであり, 評価中の成績はBACTECやMGITシステムと検出感度および検出までに要する日数の点では同等であることを示している。またMB-REDOXについては臨床試験への応用について現在評価中である。

### 3. MGITシステムによる薬剤感受性試験

MGIT培地中での薬剤の最終濃度はINH 0.1 $\mu$ g/ml, RFP 1 $\mu$ g/ml, SM 0.8 $\mu$ g/ml, EM B3.5 $\mu$ g/mlである。これらは7H11寒天培地やBACTECによる試験で用いている濃度に相当するものである。

臨床分離結核菌を用いて, MGITシステムと小川法を比較した。INHに対する感受性試験についてみると, 日本でこれまで臨界濃度として用いてきた小川培地の1 $\mu$ g/mlとMGITを比較したとき低い一致率であったが, 0.1 $\mu$ g/mlで比べたとき高い一致率を示した(Table 4)。またRFPについて, 小川法の50 $\mu$ g/mlとMGITの間に高い相関がみられた。小川法のINH 0.1 $\mu$ g/ml, RFP 50 $\mu$ g/ml, SM 20 $\mu$ g/ml, EMB 2.5 $\mu$ g/mlで得られた感受性試験の成績とMGITの成績の比較のまとめをTable 5に示した。結核病学会の薬剤耐性検査検討委員会から新しい試験濃度が提案された。それらはINH 0.2 $\mu$ g/ml, RFP 40 $\mu$ g/ml, SM 10 $\mu$ g/ml, EMB 2.5 $\mu$ g/mlであり, 諸外国で用いられている濃度とほぼ同等の濃度である。これらの濃度で比較した時はINH, RFP, SMについては2方法の間に高い相関がみられる。しかし小川法でEMB耐性と判定された株の38%はMGITで感受性と判定されることから, EMBについては今後検討する必要がある。

97%の株では10日以内に判定が可能であり, 2週以内に100%の株の感受性試験が終了する。このようにMGITシステムにより小川培地を用いた方法と関連する成績が迅速に得られることから, 薬剤感受性試験にも応用されることが期待される。残るは培地の価格であるが, この問題は別のところで議論すべきであろう。

### Ⅲ. 核酸増幅法による結核の迅速診断

数時間のうちに試験管内で多量のDNAやRNAを

Table 4 Comparison of MGIT and Ogawa Methods

Isolates (n)	Ogawa method			Sensitive to INH 0.1 $\mu$ g/ml
	Resistant (%) to INH ( $\mu$ g/ml)			
	0.1	1.0	5.0	
MGIT				
Resistant to INH (84)	97.6	75.0	42.9	2.4
Sensitive to INH (28)	3.6	0	0	96.4

Table 5 Comparison of MGIT System with Ogawa Method on Drug Susceptibility Testing of *M. tuberculosis*

Variables	Susceptibility test to			
	INH	RFP	SM	EMB
Sensitivity	98.8	92.7	98.6	61.8
Specificity	93.1	96.5	67.4	100
Accuracy	97.3	94.6	86.6	88.4
Positive predictive value	97.6	96.2	82.9	100
Negative predictive value	96.4	93.2	96.7	85.7

増幅する技術が開発された。数コピーの核酸を検出することは困難であるが、増幅後(10<sup>6</sup>個以上)では容易に検出できる。これらの手法は多くの分野で用いられており、培養困難な微生物の検出や迅速な診断が要求される例で特に有効であることが報告されている。結核菌の検出のためのキットもすでに2社から発売されている。

### 1. 核酸増幅法

結核菌のDNAまたはRNAの増幅のための方法として、次の6方法が報告されている；① Polymerase chain reaction (PCR)<sup>10)</sup>, ② Transcription-mediated amplification (TMA, MTD)<sup>11)</sup>, ③ Strand displacement amplification (SDA)<sup>12)</sup>, ④ Oligonucleotide ligation amplification (OLA, LCR)<sup>13)</sup>, ⑤ Reporter phage system<sup>14)</sup>, ⑥ Q-beta replicase amplification<sup>15)</sup>。これらの増幅法のうちPCR(アンプリコア・マイコバクテリア, ロシュ社)とTMA(DNA-プローブ-MTD, 中外製薬)はすでにキットとして開発され、市販されている。この2キットについては後で詳しく述べる。またSDA(ベクトン・ディッキンソン社)とLCR(Ligase chain reaction, アボット社)はキットとして開発され、現在臨床材料を用いて評価中である。これら評価中の2キットの感度および特異性は市販中の2キットのそれらとほぼ同等であることが報告されている。Reporter phage systemとQ-beta replicase amplificationはキットに向けて研究中である。

### 2. 市販のキット

#### 1) アンプリコア・マイコバクテリア

PCRを用いた増幅法であり、結核菌群, *M. avium* と *M. intracellulare* の検出同定のためのキットである。16S RNAをコードする584bp DNAが標的であり、このDNA内に存在する結核菌群, *M. avium* または *M. intracellulare* に特異的配列をプローブとした捕捉プローブ法で増幅産物の検出をする。dTTPの代わりにdUTPとウラシルDNAグリコシラーゼを用いることにより、DNAコンタミネーションの中で一番問題となる「以前に増幅した産物からくるコンタミネーション(carry over)」を完全に防ぐシステムを採用している。増幅のためには3段階の温度変化をプログラムできるサーマル・サイクラー、増幅産物の検出のためにマイクロプレート・リーダーが必要である。

培養菌を用いて調べたこのキットの検出感度は10個以下である。また他の抗酸菌種を含む39種の微生物を標的としたときに陽性反応は認められない。

#### 2) DNAプローブ「中外」-MTD

結核菌のrRNAの増幅に基づいた増幅法である。1個の菌に存在するrRNAのコピー数は染色体DNAにある遺伝子のコピー数の100倍以上である。それゆえ標的としてrRNAを用いることは感度を上げるうえで有効である。Gen-Probe社で開発したMTD法は逆転写酵素とRNAポリメラーゼを用いる増幅法であり、約2時間で10<sup>6</sup>個のRNAを増幅できる。増幅産物はアクリジニウムエステル標識DNAプローブを用い、HPA法で検出する。増幅には高価なサーマル・サイクラーは必要とせず、42℃に2時間保つことでRNAの増幅が行

Table 6 Comparison of Two Systems Based on Nucleic Acid Amplification with Conventional Smear and Culture Examinations in Sensitivity of Detection of *M. tuberculosis* in Clinical Specimens

Specimens	PCR		MTD	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Smear positive-culture positive for <i>M. tuberculosis</i> complex	21*	1	22	0
Smear negative-culture positive for <i>M. tuberculosis</i> complex	5	5	7	3
MOTT positive in culture	0	18	0	18
Smear positive-culture negative	1	2	1	2
Smear negative-culture negative	5	77	4	78
Total	32	103	34	101

\*: Number of specimens

Table 7 Numbers of MTD Positive Results

Laboratory	No. of BCG in water (No. sample)	
	0 (15)	10 <sup>2</sup> (15)
1	0	15
2	3	15
3	1	15
4	1	15
5	0	15
6	0	15

Table 8 Numbers of Amplicor Mycobacteria-False Positive Results for Samples Distributed to 9 Different Laboratories

Laboratory	No. of bacteria in sputum (No. of sample)		
	0 (15)	10 <sup>2</sup> (45)	10 <sup>4</sup> (45)
1	0	1* <sup>b</sup>	0
2	0	2* <sup>c</sup>	0
3	0	0	0
4	0	1* <sup>d</sup>	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	6* <sup>e</sup>	0
9	1* <sup>a</sup>	0	0

\*a: No bacteria → TB

\*b: *M. intracellulare* → *M. intracellulare* + TB\*c: BCG → *M. avium*, *M. avium* → TB\*d: BCG → TB + *M. avium*\*e: 3 BCG → TB + *M. intracellulare*3 *M. avium* → *M. avium* + *M. intracellulare*

われる。増幅ステップ終了後に cDNA を分解する操作と増幅から検出まで1本のチューブで試験することでコンタミネーションを極力抑えるように工夫されている。

臨床分離結核菌4株を用いて調べた MTD システムの検出感度は10個以下である<sup>16)</sup>。また23種の抗酸菌と10種の肺の疾患に関連する微生物を用いて調べたとき、結核菌群に属する菌を鋳型として用いたときのみ陽性反応がみられ、他の微生物では陽性反応がみられなかった。

### 3. 核酸増幅法による臨床材料からの結核菌の検出

結核菌の IS 6110 の 541bp DNA を増幅するための PCR と MTD の検出感度を従来からの塗抹法と液体培地と固形培地の二相からなる Septi-Chek を用いた培養法と比べた<sup>16)</sup>。Table 6 に示したように塗抹と培養の両者とも陽性例では両システムともほぼ全例陽性の反応を示したが、材料中に菌の少ない塗抹陰性・培養陽性10例中 PCR で5例、MTD で3例陰性であった。同様の

成績がアンプリコア・マイコバクテリアでも得られた。すなわち核酸の増幅に基づいたこれらキットの検出感度は従来の塗抹法や卵培地を用いた培養法よりは高いが、液体培地を用いた培養法とは同等である。

### 4. 核酸増幅法の評価

核酸増幅法の検出感度は液体培地を用いた培養法を越えるものではない。欧米で報告されている成績も同様である。今後さらに感度を上げるためには、材料の前処理、核酸の抽出法、酵素活性阻害物質の除去の検討が必要である。また材料が少ない場合には2~3日分をまとめて検査することも重要である。

臨床検査に応用するうえで大きな問題は、反応中に起こるコンタミネーションをいかに防止するかである。PCR 反応においては dUTP と UNG の使用により一部解除されたが、根本的には反応液の調製室、臨床材料の処理・核酸抽出室、増幅・検出室を独立した部屋にす

ることが必須である。使用する水や容器なども核酸フリーのものを選ぶ必要がある。また感度が高い検査であることから材料の採取（内視鏡の使用）にも十分な注意が払われねばならない。

われわれが他施設（検査センター）と行ったMTDキットの精度管理に関する共同研究<sup>17)</sup>で、延べ90の陰性サンプル（超純水）中5サンプル（5.6%）が陽性と報告された（Table 7）。偽陽性例に加えて偽陰性例も報告された。同じ偽陽性と偽陰性結果がアンプリコア・マイコバクテリアを用いた共同研究<sup>18)</sup>でも得られた（Table 8）。偽陽性の結果を報告した施設から偽陰性の結果も報告された。このことは施設（独立した部屋）と設備（安全キャビネット、3,000xgを確保できる遠心機）の完備はもとより検査技師の熟練および注意深い操作が必要であり、定期的な精度管理が必須であることを示している。検査センターでは独自の再検査システムを作りこれらの問題に対処しているのが現状である。これまでに精度管理のための共同研究を計3回行った。施設間で意見の交換も十分に行った結果、研究を繰り返す度に検査精度に大きな改善がみられた。

結核の対策のうえで塗抹検査は重要である。また正しい治療をするうえで菌種の同定と感受性試験も重要であり、そのため培養検査は欠かせない試験である。それゆえ、従来からの検査を一切省き、それらを核酸増幅法で代行することはできない。米国のCDCも同様のコメントを発表している。しかし増幅酵素阻害物質の問題は残るが、結核菌の検出がまれな喀痰以外の材料や結核の病気の進行が速いエイズ患者の診断への核酸増幅法の導入は有効と思われる。

#### IV. 結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子

##### 1. 薬剤耐性の基礎

抗結核薬に対する耐性は結核の治療中あるいは治療後に発現すると考えられていた。しかし薬剤に曝される前にも耐性が存在するとする証拠も示され、その後の研究の積み重ねから抗酸菌の薬剤耐性は自然に生ずる突然変異によるものと結論されている。これら耐性菌は薬剤と接触前の結核菌集団に含まれている。変異は染色体性と考えられており、これまで結核菌からの耐性プラスミドの分離の報告はない。

##### 2. 薬剤耐性の分子機構

分子遺伝学的手法の導入により結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子の研究が進み、少しずつ明らかになってきた。

##### 1) INH 耐性

多くのINH耐性菌にカタラーゼ活性の減弱がみられ

ること、高度耐性分離株では完全に消失していることが知られている。カタラーゼとパーオキシダーゼの両者をコードしている遺伝子、*katG* 遺伝子の欠失はある結核菌のINH高度耐性と関連があり、INH耐性 *Mycobacterium smegmatis* と結核菌に *katG* を導入することによりINH感受性を授与できる<sup>19)</sup>。INH耐性菌で *katG* 遺伝子内に変異の存在する株もみつかった<sup>20)</sup>。変異は点突然変異、1塩基の欠失、1～3塩基挿入で遺伝子のいたるところで起こっている。INH耐性分離株の10～25%のみがカタラーゼ陰性であること、INH耐性株を調べ *katG* の欠失は約20%、*katG* 内の変異は約30%であることも報告されている<sup>20)～22)</sup>。これらのことはINH耐性には *katG* 以外の他の因子も関与していることを示している。

低レベルのINH耐性とカタラーゼ活性の消失とは関連がみられない。カタラーゼ活性を持つ菌で低レベルのINH耐性とエチオナミド耐性の両者を獲得している株がみつかった。INH耐性の表現型を付与するのに十分な遺伝子が分離され、*inhA* と名付けられた<sup>23)</sup>。耐性の発現には *InhA* タンパクのアミノ酸置換または *inhA* 遺伝子のオペロンの変異が関係している。

INH耐性臨床分離株の約30%は *katG* にも *inhA* にも変異がみられない。*M. smegmatis* に低度のINH耐性 (MIC: 2～4 μg/ml) を付与する遺伝子をINH耐性 *M. bovis* のゲノムライブラリーから分離した。この遺伝子は *alkyl hydroperoxide reductase* をコードしている遺伝子 *ahpC* と高い相同性を持っていた<sup>24)</sup>。変異はINH耐性菌にのみみられ、感受性菌にはみられない。

##### 2) RFP 耐性

RFPの作用機構は、RNAポリメラーゼのβサブユニットに薬剤が結合することによりRNAの伸長と転写に影響を与えるものと考えられている。鍵となるアミノ酸が置換されると三次元構造が変化し、薬剤の結合が不可能になる。Telentiら<sup>25)</sup>は主にヨーロッパとアフリカで分離された66株のRFP耐性結核菌のRNAポリメラーゼのβサブユニットをコードしている遺伝子 *rpoB* を調べ、97%の株に変異を認めている。変異は23個のアミノ酸 (69bp) からなるホットスポット領域に集中してみられる。一方、RFP感受性株ではホットスポット領域に変異はみられない。4グループにより報告された変異の分布をTable 9に示した。Telentiら<sup>25)</sup>は主にヨーロッパとアフリカで分離された株、Williamsら<sup>26)</sup>は主にアメリカで分離された株、Suzukiら<sup>27)</sup>は日本で分離された株、Abeら<sup>28)</sup>はアジア諸国で分離された株を調べている。3～7%のRFP



Table 9 Frequency of Mutations in Rifampin-resistant Isolates Reported by Four Groups

Mutation position	Frequency of codon substitution [Number (%)]			
	Telenti <sup>25)</sup> (n=65)	Williams <sup>26)</sup> (n=110)	Suzuki <sup>27)</sup> (n=46)	Abe <sup>28)</sup> (n=80)
Leu 511	2 (3.1)			1 (1.3)
Gln 513	2 (3.1)	1 (0.9)		4 (5.0)
514 v 515 ins. *1		1 (0.9)		2 (2.5)
Met 515			1 (2.2)	
Asp 516	6 (9.2)	8 (7.3)	4 (8.7)	12 (15.0)
Asn 518 delet. *2	1 (1.5)	1 (0.9)		
Leu 521		1 (0.9)		
Ser 522	1 (1.5)	2 (1.8)	1 (2.2)	2 (2.5)
His 526	18 (27.7)	37 (33.6)	13 (28.3)	12 (15.0)
Ser 531	33 (50.8)	46 (41.8)	23 (50.0)	41 (51.3)
Leu 533	1 (1.5)	3 (2.7)		
Ser 509, His 526 *3		1 (0.9)		
His 526, Lys 527 *3		1 (0.9)	1 (2.2)	
None	2 (3.1)	8 (7.3)	3 (6.5)	6 (7.5)

\*1: Insertion, \*2: Deletion, \*3: Double mutation

Table 10 Mutations in the *pncA* Gene of the *M. tuberculosis* Complex

Strain	Number of strain	Mutation
<i>M. tuberculosis</i>		
PZase-positive	135	0
PZase-negative	33	32 (97%)
<i>In vitro</i> PZA-resistant	3	0
<i>M. bovis</i> deer	1	1 (100%)
<i>M. bovis</i> BCG substrain	6	6 (100%)

耐性株はホットスポット領域に変異がみられないことから、これらの株では *rpoB* の別の領域あるいは  $\beta$  サブユニット以外に変異が存在するものと考えられる。

### 3) PZA 耐性

PZA は1950年代の初めに結核の治療に導入された。治療後に出現した耐性結核菌はピラジナミダーゼ (PZase) 活性を欠くことが明らかにされた<sup>29)</sup>。通常 PZase 活性の消失と PZA 耐性発現の間に相関がみられる。不思議なことに結核菌と近縁の *M. bovis* は PZA に自然耐性であり、PZase 活性を欠いている。PZA 耐性結核菌は、PZase と nicotinamidase 活性を失うことから PZase は nicotinamidase と同じものと考えられている。PZase の役割は細菌細胞内で PZA を殺菌活性を持つ pyrazinoic acid に変換することであり、PZA 耐性結核菌や PZA 自然耐性 *M. bovis* は PZase 活性を欠くため PZA に耐性を示すと考えられている。

PZA に対する結核菌の MIC 値は pH により大きく左右されることもあり、感受性試験法はまだ確立されていない。PZase 陰性結核菌では、pH 6.0 の条件下で PZA に対する MIC を測定したとき 800  $\mu\text{g/ml}$  以上の値を示す。しかし PZase 陽性菌では 200  $\mu\text{g/ml}$  以下である。PZase 陰性結核菌では PZase をコードしている *pncA* 遺伝子に変異がみられる<sup>30)~32)</sup>。変異は *pncA* 遺伝子全般に分布してみられる。PZase 陽性株では *pncA* 遺伝子内に変異がみられないことから変異は PZase 活性に関与していると考えられる (Table 10)。PZA 耐性菌のなかに *pncA* 遺伝子内に変異がみられない株の存在および試験管内で作製した PZA 耐性菌は PZase 活性陽性で *pncA* 遺伝子に変異がみられない<sup>32)</sup> ことから PZA 耐性の発現に *pncA* の変異以外の機構が関与していることが考えられる。

### 4) SM 耐性

SMはアミノグリコシド抗生物質であり、30Sリボソームのサブユニットと作用し、タンパク合成に影響を与える。結核菌のリボソームタンパクS12をコードしている遺伝子 (*rpsL*) を調べてみると、耐性菌では42番目または88番目のLysがArgまたはThrに置換されている。感受性株には変異が認められないことからこの変異がSM耐性に関与するものと考えられている。

リボソームS12タンパクと16S rRNAの530領域が結合するとする証拠もある。S12が結合することにより530ステム (stem) とループ (loop) 内の特異的塩基が保護される。SM耐性菌の中にS12タンパクには変異がみられず、16S rRNA (*rrs*) の530ループ内に変異が認められる株もみつけた<sup>34)</sup>。さらにSM耐性結核菌で16S rRNAの866番目に変異を認めている<sup>35)</sup>。

SM耐性菌では *rpsL* と *rrs* の変異が明らかになっているが、SM耐性を含む多剤耐性菌ではこれらの領域に変異がみつからない株が約30%あることから他の耐性機構も考えられる (Table 11)。

#### 5) EMB耐性

抗酸菌はユニークな細胞壁構造を取っており、表層のミコール酸は arabinogalactan (AG) を介してペプチドグリカンと結合している。EMBは細胞壁AGの重合を阻害し、結果としてリポドキャリアーである decaprenol phosphoarabinose の蓄積を導く。このことは、EMBが細胞壁アクセプターへのアラビノースの輸送を妨害することを示唆している。AGの重合を仲介する arabinosyl transferases をコードしている *embAB* が同定された<sup>36)</sup>。EmbBタンパクは12の膜通過ドメインとC末に400個のアミノ酸からなる球状領域を持つ必須の膜構造タンパクである<sup>37)</sup>。EMB耐性菌ではEmbBの306番目のMetがLeuまたはValに置換されているがEMB感受性株ではアミノ酸置換はみら

れない<sup>38)</sup>。このことは、EmbBのアミノ酸置換がEMBとタンパクの相互作用を変えることによりEMB耐性を引き起こすことを示している。しかしEMB耐性菌の約30%はEmbBに置換がみられないことから他の耐性機構も考えられる。

#### 6) キノロン耐性

キノロン剤は結核菌に活性を持つことから、現在では多剤耐性結核の治療に用いられている。抗酸菌以外の細菌では、キノロン剤耐性はキノロンの細胞内標的であるDNA gyraseのAサブユニットの構造遺伝子である *gyrA* の変異と関連している。二次抗結核薬に加えOFLXによる併用療法を受けた患者から分離されたOFLX耐性結核菌 (MIC: 32 µg/ml) の *gyrA* に点突然変異が認められている<sup>39)</sup>。またCFLXに低度耐性 (MIC: 8 µg/ml) を示した結核菌はGyrAタンパクにアミノ酸置換がみられることが報告されている<sup>40)</sup>。キノロン剤耐性結核菌の *gyrB* に変異がみられないことから、結核菌のキノロン耐性に *gyrB* の関与はないものと考えられる。

#### 7) 多剤耐性

多剤耐性は、複数の薬剤に耐性を付与する遺伝子座における変異あるいは薬剤の標的をコードしている遺伝子の個々に変異が起こることにより発現すると考えられる。これまで多剤耐性を付与する遺伝子の報告はないことから、耐性の発現は個々の薬剤で独立して起こり、多剤耐性の場合にはそれらの集積と考えられる<sup>20)</sup>。

#### 3. 耐性菌の検出

薬剤感受性試験は精度管理の難しい試験の1つである。多くの国では proportion 法を採用しているが、日本ではこれまで小川卵培地を用いる absolute concentra-

Table 11 S12 (*rpsL*) and 16S rRNA (*rrs*) Mutations in Streptomycin-resistant *M. tuberculosis* Isolates in Different Countries

Gene	Mutation position	Number (%) of isolates
<i>rpsL</i>	Lys 43	36 (49)
	Lys 88	5 (7)
<i>rrs</i>	474	3 (4)
	477	2 (3)
	838	1 (1)
	866	1 (1)
	868	3 (4)
<i>rpsL</i> + <i>rrs</i>	Lys 43, 477	1 (1)
<i>rpsL</i> , <i>rrs</i>	None	22 (30)

Table 12 Antituberculosis Drug Concentrations ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for Susceptibility Testing

Drug	Canetti (L-J) <sup>42)</sup>	Japan (Ogawa) <sup>43)</sup>
INH	0.2	0.2, 1.0
RFP	40	40
PZA	200	
SM	4	10
EMB	2	2.5
KM	20	20
EVM	20	20
CPM	20	20
TH	20	20
CS	30	30
PAS	0.5	0.5
LVFX		1.0

The critical proportion is 1%.

tion法が用いられてきた。日本で用いている試験の方法、薬剤の濃度、判定法について結核専門医の間から疑問が投げられていた。結核病学会では薬剤感受性試験検討委員会を設置しこの問題について検討した。Table 12に示した試験濃度と1%小川培地を用いる proportion法が委員会より平成9年6月の結核病学会総会で提案された。耐性菌の割合が1%を超えた場合は臨床的に効果が期待できないと考えられていることから、耐性/感受性の判定の臨界点は耐性菌の割合を1%としている。

遺伝子を用いた耐性菌の検出についての研究も進んでいる。耐性に関与する遺伝子をPCRで増幅後に single-strand conformation polymorphism 分析<sup>41)</sup> または hetero-duplex formation 分析<sup>26)</sup> により検出できる。RFP耐性については93%以上は *rpoB* 遺伝子のホットスポット領域に変異がみられることより、遺伝子を用いる検出は臨床の場で非常に役立つと思われる。しかしINHを含む他の薬剤に対する耐性は複数の遺伝子と関連していることより、臨床試験に応用できるまでには今後多くのハードルを越えねばならないだろう。

## V. おわりに

小川法は前処理が簡便であり、諸外国で用いているレーベンシュタイン・イエンセン培地を用いた方法と比べ検出率に差がなく、その上汚染率も低いとされ日本では今日まで用いられてきた。しかし卵培地には限界があることは以前から認識されており、外国ではより効果的な培地の開発を進めてきた。ここに記述したシステムを導入することにより、これまで問題にされてきた検出率の低さと報告までの時間が大きく改善されると考える。米国

では、結核菌の初代分離から同定、感受性試験まで含めたすべての検査を3週間以内、遅くとも4週間以内に終えることを目標としている。液体を基礎とした培地と核酸による同定を組み合わせることにより、4週間以内に終了することが可能である。現在臨床に役立つ検査が求められている。上記の培養法を日常検査に導入したとき検査室の仕事量は増えることが予想される。しかしそれ以上の臨床的メリットも期待できるであろう。

遺伝子技術の進歩には目を見張るものがある。ここでは核酸増幅法による結核菌の検出と抗結核剤に対する耐性に関与する遺伝子について述べた。遺伝子の特異性と遺伝子を用いた検査の特異性とは異なるものである。特に核酸の増幅に基づいた診断は、高感度ゆえに偽陽性の心配も必要である。核酸増幅法は塗抹や培養試験と同等の補助手段の1つと考え用いるべきであり、診断は臨床症状なども含め総合的に下されるものであろう。

## 謝 辞

発表の機会をお与え下さいました第72回日本結核病学会総会会長 東 市郎先生と座長の労をとって下さいました斎藤 肇先生に深謝致します。

ここで発表した仕事は、斎藤 肇、富岡治明(島根医大)、青柳昭雄、豊田丈夫、大角光彦(国療東埼玉病院)、片山 透、倉島篤行(国療東京病院)、藤野忠彦(国療南横浜病院)、エスアールエル、大塚東京アッセイ研究所、ビー・エム・エル、保健科学研究所、三菱化学ピーシーエル、シオノギバイオメディカル東京ラボラトリー、住友金属バイオサイエンス、中外製薬、日本ロシュ(核酸増幅法精度管理研究会)、J Castellino, AHJ Kolk, S-N Cho, P Sudarmono, P Seth, S Tumwasorn,

AJ Perera, S-F Yap, GV Kadival (IAEA Workshop group), DL Williams (JWL Hansen's Disease Centre), 平野和重, 高橋光良, 和田雅子, 鹿住祐子, 深澤豊, 森亨(結核研究所)の諸先生方との共同で行われたものであります。

またこれらの研究は日米医学研究協力計画に大きく支えられました。歴代の部会長, 徳永徹, 東市郎, 露口泉夫, 山田毅先生に感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Kochi A: The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*. 1991; 72: 1-6.
- 2) 厚生省: 結核の統計. 結核予防会, 東京, 1996.
- 3) Snider DE, Roper WL: The new tuberculosis. *N Engl J Med*. 1992; 326: 703-705.
- 4) Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al.: Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 878-881.
- 5) Middlebrook G, Reggiardo Z, Tiger WD: Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am Rev Respir Dis*. 1977; 115: 1066-1069.
- 6) Palaci M, Ueki SYM, Sato DN, et al.: Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 762-764.
- 7) Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al.: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol*. 1990; 28: 1608-1612.
- 8) Horn J: Redox systems as bacterial growth indicators. *Biotest Bulletin*. 1995; 5: 181-186.
- 9) 阿部千代治: 酸素反応性蛍光センサーを用いた新しい抗酸菌迅速培養システムの検討. *感染症誌*. 1996; 70: 360-365.
- 10) Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol*. 1987; 155: 335-350.
- 11) Jonas V, Alden MJ, Curry JI, et al.: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from induced sputum specimens using amplification of rRNA. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 2410-2416.
- 12) Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, et al.: Strand displacement amplification—an isothermal *in vitro* DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20: 1691-1696.
- 13) Iovannisci DM, Winn-Deen ES: Ligation amplification and fluorescent detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Mol Cell Probes*. 1993; 7: 35-43.
- 14) Jacobs WR, 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.
- 15) Shah JS, Liu J, Buxton D, et al.: Q-beta replicase-amplified assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 1435-1441.
- 16) Abe C, Hirano K, Wada M, et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gene-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 3270-3274.
- 17) 阿部千代治, 森亨, 藤井英治, 他: 結核菌の迅速検出のための MTD の評価に関する共同研究. *結核*. 1993; 70: 467-472.
- 18) 阿部千代治, 斎藤由美子, 本山禎二, 他: アンブリコア・マイコバクテリウムキットの評価に関する共同研究. *結核*. 1997; 72: 181-186.
- 19) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992; 358: 591-593.
- 20) Morris S, Bai GH, Suffys P, et al.: Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1995; 171: 954-960.
- 21) Altamirano M, Marostenmeki J, Wong A, et al.: Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis*. 1994; 169: 1162-1165.
- 22) Goto M, Oka S, Tachikawa N, et al.: *katG*

- sequence deletion is not the major cause of isoniazid resistance in Japanese and Yemeni *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Mol Cell Probes*. 1995; 9: 433-439.
- 23) Banerjee A, Dubnau E, Quemad A, et al.: *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1994; 263: 227-230.
  - 24) Wilson TM, Collins DM: *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Microbiol*. 1996; 19: 1025-1034.
  - 25) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993; 342: 647-650.
  - 26) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 2380-2386.
  - 27) Suzuki Y, Katsukawa C, Inoue K, et al.: Mutations in *rpoB* gene of rifampicin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Jap Assoc Infect Dis*. 1995; 69: 413-419.
  - 28) Abe C, Hirano K, Takahashi M, et al.: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in mostly foreign Asian countries. 31st Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, U.S.-Japan Cooperative Science Program, Nagasaki, 1996.
  - 29) Konno K, Nagayama H, Oka S: Nicotinamidase: A method for distinguishing bovine type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Nature*. 1959; 184: 1743-1744.
  - 30) Scorpio A, Zhang Y: Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Med*. 1996; 2: 662-667.
  - 31) Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, et al.: Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 636-640.
  - 32) Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, et al.: Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle Lung Dis* (in press)
  - 33) Finken M, Kirschner P, Meier A, et al.: Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*; Alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol*. 1993; 9: 1239-1246.
  - 34) Nair J, Rouse DA, Bai GH, et al.: The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 1993; 10: 521-527.
  - 35) Douglass J, Steyn LM: A ribosomal gene mutation in streptomycin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis*. 1993; 167: 1505-1506.
  - 36) Belanger AE, Besra GS, Ford ME, et al.: The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 11919-11924.
  - 37) Telenti A, Phillip W, Sreevatsan S, et al.: The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Med*. 1997; 3: 567-570.
  - 38) Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, et al.: Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 1677-1681.
  - 39) Cambau E, Sougakoff W, Besson M, et al.: Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *J Infect Dis*. 1994; 170: 479-483.
  - 40) Takiff H, Guerrero C, Phillip W, et al.: Mutations in the gyrase A gene (*gyrA*) of *Mycobacterium tuberculosis* confer resistance to fluoroquinolones. In Program and Abstracts of the 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (New Orleans). Washington, D.C., ASM,

- 1993.
- 41) Ilayashi K : PCR-SSCP ; A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic PCR. PCR Methods Applications. 1991 ; 1 : 34-38.
- 42) Canetti G, Froman S, Grosset J, et al. : Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull WHO. 1963 ; 29 : 565-578.
- 43) 結核病学会薬剤耐性検査検討委員会 : 結核菌の薬剤感受性試験, 特に試験濃度改変と比率法導入への提案. 結核. 1997 ; 72 : 597-598.