

# リファマイシン系抗生物質リファブチンの結核への使用について

(「結核医療の基準」の見直し—2008年への追補)

平成20年8月

日本結核病学会治療委員会

日本結核病学会治療委員会は、本年4月に「結核医療の基準」に関する見解を発表したところである。この中でリファンピシンについては、「多くの薬剤との薬物相互作用があるので注意が必要である。特に HIV 感染者において抗ウイルス剤投与を必要とする場合にはリファンピシンに代わりリファブチンの使用を検討する」と記載した。リファンピシンと同じリファマイシン系の抗生物質であるリファブチンは、その薬物相互作用がリファンピシンよりも弱く、上記の抗ウイルス剤との併用も可能である。この度、リファブチンが抗結核薬として2008年7月に承認され、今後薬価収載される見込みであるので、結核治療における本剤の使用について先の見解に追加する。

## 〔リファブチンの使用を検討すべき状況〕

結核治療においてリファンピシン感受性菌による感染であってリファンピシンの使用に支障がない場合にはリファンピシンを使用するが、以下の場合にはリファンピシンに代えてリファブチンの使用を検討する。

- ①薬剤相互作用のためリファンピシンの使用が制限される場合、特に、抗 HIV 薬であるプロテアーゼ阻害薬、非核酸系逆転写酵素阻害薬使用時
- ②副作用のためリファンピシンが使用できない場合

## 〔用法・用量〕

5 mg/体重 kg, 1日最大量300 mg, 1日1回。

用量は抗 HIV 薬、特にエファビレンツ等の使用によ

りリファブチンの血中濃度の低下が予想されるとき、その他必要なときには、1日最大量450 mgまで増量を検討する。

なお、HIV非感染者においては、週2回または3回の間欠療法に用いてよい。用量は毎日投与と同じとする。

## 〔使用上の留意点〕

- ①肝酵素誘導による薬物相互作用はリファンピシンよりは弱いですが、リファブチンにも存在するので考慮する必要がある。
- ②リファブチンとリファンピシンの副作用は肝障害、体液の着色等について同様である。その他の副作用も共通の部分が多いので、副作用のためリファンピシンに代えてリファブチンを使用する場合には、慎重な観察が必要である。
- ③リファンピシンに耐性の結核菌は一部を除きリファブチンにも耐性である。多剤耐性結核菌への本剤使用については、その薬剤感受性検査の方法等も含め今後も経験を蓄積してゆく必要がある。

## 〔文 献〕

- 1) 日本結核病学会治療委員会：「結核医療の基準」の見直し—2008年。結核。2008；83：529-535。
- 2) Davies G, Cerri S, Richeldi L: Rifabutin for treating pulmonary tuberculosis. Cochrane Database Syst Rev. 2007；17：(4)・CD005159。

日本結核病学会治療委員会

委員長	重藤  えり子				
副委員長	和田  雅子				
委員	高橋  弘毅	藤井  俊司	斎藤  武文	佐藤  和弘	
	田野  正夫	露口  一成	小橋  吉博	藤田  次郎	

## 第83回総会シンポジウム

## Ⅲ. 臨床抗酸菌学の最前線

座長<sup>1</sup>鎌田 有珠<sup>2</sup> 御手洗 聡

キーワード：Therapeutic drug monitoring, 遺伝子検査, 感受性検査, 細胞内寄生, BCG

シンポジスト：

1. 結核治療と TDM  
花田和彦 (明治薬科大学薬剤学教室)
2. 遺伝子検査による抗酸菌感染症の迅速診断  
大楠清文 (岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野)
3. 抗酸菌の感受性検査  
仲宗根勇 (琉球大学医学部附属病院検査部)
4. 結核菌の病原性機序—細胞内寄生戦略  
河村伊久雄 (京都大学大学院医学研究科微生物感染症学)
5. BCG ワクチンの分子特性と今後の課題  
関 昌明 (日本 BCG 研究所)

本邦における抗酸菌感染症学は、基本的に結核病学を中心に発展を遂げてきたが、特に社会構造の変化に伴うハイリスクグループ (高齢者や社会的弱者) の増加や、HIV/AIDS 患者、免疫抑制剤の使用、悪性疾患の合併等の宿主側の感染や発病に関与する要因も変化しており、病原体疫学的には非結核性抗酸菌症の相対的増加など、抗酸菌感染症の実情は日々変化している。また最近では耐性結核菌の問題もクローズアップされており、特に多剤耐性/超多剤耐性結核菌の拡大に関しては世界保健機関も重点的な対策を求めており、その診断・治療にはこれまでの「集団」的な結核予防治療対策に加えて、個々の症例を「個別」に解析・理解するためのオーダーメイドの医療が求められる。そこで今回「臨床抗酸菌学の最前線」と題したシンポジウムを企画した。これは臨床細菌学的観点を中心に抗酸菌 (結核) 感染症を見直すことを意図したものである。

抗酸菌の感染病理を理解することは、適切な予防・治療戦略の決定に不可欠である。抗酸菌の感染や発病のメカニズムを、感染症の本質である細菌側の因子と宿主側の免疫防御機構の相互関係から理解するため、結核菌が細胞内寄生して宿主免疫を回避するメカニズムが重要である。この点について、現在までに明らかとなっている事実を京都大学の河村伊久雄先生にお話いただいた。

次に、希少菌種を含めた非結核性抗酸菌の分離が増えている現在、適切な感染制御や治療のために起炎菌の迅速な同定が必要不可欠である。岐阜大学の関昌明先生には、近年特に発展の著しい遺伝子検査による抗酸菌感染症の迅速診断についてご発表いただいた。培養分離株だけではなく、ハウスキーピング遺伝子の核酸増幅法を用いて検体から直接菌種を同定することにより、逆に適切な培養法を決定するなど、迅速診断システムが重要となっている。

従来の結核菌の感受性検査である比率法は、ある一定濃度以上で発育する結核菌の被験菌集団中での割合を調べるものであり、基本的に「定性的」な検査法であって、菌株個々の細菌学的特性を意味しない。また、非結核性抗酸菌の標準的な感受性検査法も存在しないため、臨床的には大変不便な状態にある。琉球大学の仲宗根勇先生には、感染症治療にとって最も重要な薬剤の選択におけるキーポイントの一つである、非結核性抗酸菌を含めた抗酸菌の感受性検査の現状と問題点について発表いただいた。

オーダーメイド医療や治療効果の保証の観点から Therapeutic Drug Monitoring (TDM) の概念は重要であり、Pharmacokinetics/Pharmacodynamics (PK/PD) に基づく治療設計が必要である。また副作用の防止など、現在では

<sup>1</sup>独立行政法人国立病院機構札幌南病院呼吸器科, <sup>2</sup>財団法人結核予防会結核研究所細菌検査科

連絡先：御手洗聡, 結核予防会結核研究所細菌検査科, 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: mitarai@jata.or.jp)  
(Received 15 Jul. 2008)

臨床薬理学的介入の有用性が期待されている。明治薬科大学の花田和彦先生には、結核治療とTDMについてご発表いただいた。

ワクチンも臨床的対抗酸菌戦略の重要事であるが、最近では *M. bovis* BCGの遺伝的詳細やBCGの分子特性解明の必要性、BCG亜株間/内での遺伝的な違いが明らかになってきている。日本BCG研究所の関昌明先生には、

BCGワクチンの分子特性と今後の課題として、これまでに解明されていることを踏まえて、今後のBCGの課題についてご発表いただいた。

各々のテーマは基本的に独立しているものの、臨床細菌学的には相互に密接に関連しており、対感染症（患者）戦略を考えるうえでは重要な内容であったと考える。

## 1. 結核治療とTDM

明治薬科大学薬剤学教室 花田 和彦, 緒方 宏泰

結核治療を成功させるためには、感受性のある薬剤を適切に選択し、適切な用法・用量を使用して治療を開始し、中断なしに完了させる必要がある。治療の成功を担保するために、患者の adherence を向上させるDOTによる介入が行われはじめてきている。このように服薬率の向上を確立したうえで治療率や再発率の問題に対してその患者にあった薬剤の用法・用量設定を考えていく必要がある。

薬物による効果・副作用は、投与された薬物、特にタンパク等と結合していない遊離形薬物が作用部位に到達する pharmacokinetics (PK) と、作用部位に到達した薬物が作用を発現する pharmacodynamics (PD) 上の過程を経て発現される。これらPKとPDを区別して特性を明らかにし、その両者を統合することにより、合理的な薬物療法を行うための投与設計が可能であると考えられる。

結核治療においては、これら薬物治療の過程の中で特に服薬の確認、用法・用量の設定、副作用の回避などに対して、臨床薬理学的介入が期待される。本発表では適切な用法・用量の設定に関する臨床薬理学的考察、ならびに薬物治療モニタリング (TDM) の有用性と今後の課題について検討した。

### 1. 用法・用量の設定に関する1例

pyrazinamide (PZA) は、結核菌中の酵素により、活性

体であるピラジン酸に変換され作用すると考えられているが、作用機序は明確になっておらず、PK/PDに関する情報（主に血中薬物濃度と抗菌効果の関係）は得られていない。本邦の添付文書中には、PZAを1日1~3回に分けて投与することが記載されているが、欧米では1日1回投与になっている。この点に着目し、PZAの用法と効果・副作用の関係をレトロスペクティブに調査した。PZA 1日1回および2回投与の患者を対象として、用法と効果・副作用について比較調査した結果を紹介する (Nakazono et al., in preparation)。

治療開始前の患者背景において、胸部X線所見では1回投与群でより両側肺に病変が認められ、さらにisoniazid (INH) と ethambutol (EB) の投与量は2回投与群のほうが有意に高かった。喀痰塗抹および培養の陰性化を指標とした効果には、2カ月目に1回投与群のほうが効果の高いこと ( $p < 0.10$ )、一方、PZAに特徴的な肝障害および関節痛などの副作用は両群間で差は認められず、また副作用全体としても有意な差は認められなかった (Table)。今回の調査はレトロスペクティブ研究であるが、1回投与群を対象とした患者ではX線所見上、有意に両側肺が多かったことなどを考慮すると、PZAは分割投与よりも1回投与のほうが優れている可能性が示唆される。

この用法の差異はなぜ、効果に影響したのかをPK/

**Table** Comparison of once and twice a daily dose of pyrazinamide on the efficacy and adverse effects in patients with lung tuberculosis

	Once a daily	Twice a daily	p
Negative sputum smear and culture			
After 2 months	36/57 (63%)	25/48 (52%)	0.088
After 6 months	46/47 (98%)	38/39 (97%)	0.809
Recurrence	5/46 (11%)	3/38 (8%)	0.720
Adverse drug reactions			
Liver function abnormality	4 (6%)	6 (10%)	0.330
Arthritic pain	9 (15%)	4 (7%)	0.180
Total events	24 (39%)	19 (33%)	0.497

PDの面から考えるため、1日1回投与と2回投与後の血中PZA濃度の時間推移をシミュレーションした (Fig. 1)。定常状態下では、いずれの用法でもほぼMICを維持していることがわかった。一方ピーク濃度は1回投与のほうが高く、このピーク濃度の差異が効果の差異に結びついているものと推察される。これらの結果から、PZAは濃度依存性の抗菌効果を示す薬剤であると考えられ、分割投与より1回投与を行う必要性が示された。このように、結核治療においても、一般細菌と同様にPK/PDの考え方に基づいた臨床薬理学的介入が有用であることを示した。

## 2. 抗結核薬の血中薬物濃度モニタリングの例

最近になって、Jayaramらはrifampicin (RFP) とINHともに、ピーク濃度あるいはAUCとMICの比が抗菌効果と相関していることを動物モデルにおいて示した (AAC. 2003 ; 47 : 2118. 2004 ; 48 : 2951.)。この関係から、RFPの抗菌効果を十分発揮するためにはピーク濃度あるいはAUCを維持する投与が必要とされると考えられる。

感受性が確認されており、標準的治療が開始された124名の患者を対象として、治療に対する反応性が不良な患者をみだし、血中濃度モニタリングを行い、必要であれば投与量の増量を行った Mehtaらの研究報告を紹介する (Chest. 2001 ; 120 : 1520.)。採血は空腹時投与後の1.5~2.5時間の間で行われている。124名中、6名が反応不良と判断され、それらの患者のモニタリング値は想定される濃度よりも低く、投与量を増量することでその濃度も想定したターゲット濃度内に到達させた (Fig. 2)。さらに治療のアウトカムも改善されたことが報告されている。このことから、標準治療を行っても反応性が不良の患者に対して、血中薬物濃度モニタリングを行うことは有用であると考えられる。その場合に注意すべきこととして、結核治療は多剤併用療法であるため、

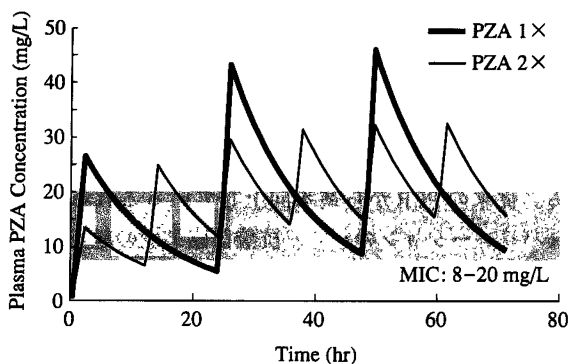


Fig. 1 Comparison of time-course of plasma pyrazinamide (PZA) concentration between once and twice a daily dose of pyrazinamide

rifampicinのみならず他の薬剤の変動の可能性も考慮する必要がある。さらにモニタリングを行う場合には採血する時間やポイント数も、得られる濃度を解釈するうえで重要となってくる。

RFPを食前服用した後の血中濃度の時間推移 (Fig. 3) をみると、患者間で血中濃度の立ち上がりの速度 (吸収速度) が異なる。例えば、ピークが速やかに表れている例では、投与後3時間では消失する相を測定していることになる。一方、非常に吸収速度が遅い例では、未だ吸収が継続していることになり、RFPの血中濃度をモニタリングするには1点のみの採血では判断できないことが示唆される。

また感受性結核菌に対する一次薬による通常の治療では菌の陰性化率が非常に高いという事実から、このようなモニタリングは、反応性の低い症例に限定されるものと思われる。

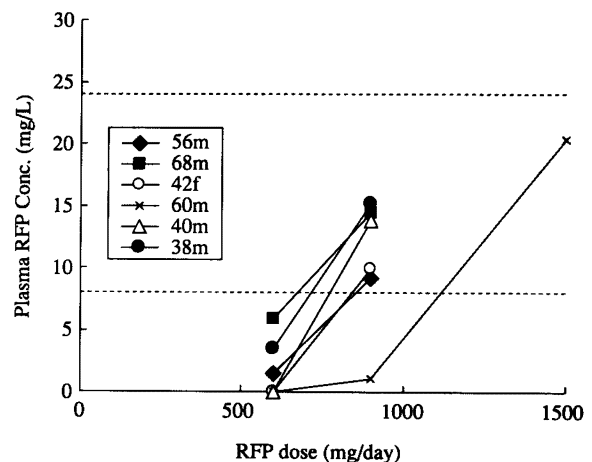


Fig. 2 Intervention of plasma rifampicin (RFP) monitoring and adjustment of dose in patients who were slow responder to usual RFP dose (Mehta JB et al., Chest. 2001 ; 120 : 1520-1524.)

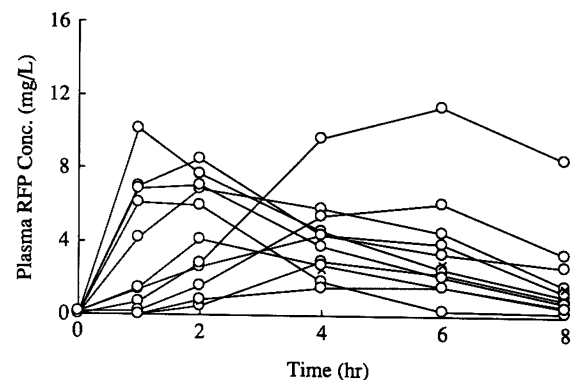


Fig. 3 Time-courses of rifampicin (RFP) concentration in plasma in patients after oral RFP administration (450-600 mg)

二次薬においては、特に安全性の観点から、TDMの有用性が示唆されている。作用メカニズムが不明確な薬物が多く、PK/PDの情報がほとんど得られておらず、また治療の選択肢が限られている。そのため、治療効果を担保しつつ副作用による中断を回避し、適切な用法用量で治療が行えるように今後前向きな臨床研究によりモニタリングの必要性を明らかにしていく必要がある。

### 3. 抗結核薬による肝障害に関する考察

副作用による服薬の中断も適切な治療を遂行するうえで障害となる。INHの代謝酵素であるNAT2の遺伝子多型が肝障害の予測因子の1つとして報告され、特に代謝活性の低いslow acetylator (SA)において肝障害の頻度が高いことが示されている (Int J Tuberc Lung Dis. 2000; 4: 256.)。他の報告ではacetylhydrazinをさらに代謝するCYP2E1の遺伝子多型が関与するという報告 (Eur J Clin Pharmacol. 2006; 62: 423.) もみられ、遺伝子多型

を投与前に判断し、個人における投与量の設定を行うところまでは到達していないのが現状である。遺伝子多型に関しては確かに大きな代謝能の分類はできるが、同じ群内においても大きな個体差がみられ、多型間の重なりも認められている (Eur J Clin Pharmacol. 2007; 63: 633.) ため、遺伝子多型の診断のみによる投与量の設定の意義は、臨床上是限られると想定され、血中濃度を確認することは有用と考える。

以上、一般細菌治療と同様、結核治療においても臨床薬理学的介入が必須であり、ある条件下では血中薬物濃度モニタリングは有用であると考えられる。ただし、その介入の有用性を総合的に評価する研究が必要であり、今後の課題と思われる。また治療率の向上のみならず、治療期間をより短縮する試み (Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 2994.) もなされ始めてきており、より積極的な治療方法の介入が望まれる。

## 2. 遺伝子検査による抗酸菌感染症の迅速診断

岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野 大楠 清文, 江崎 孝行

### はじめに

感染症の原因微生物検索における遺伝子学的診断法には、①臨床材料から直接、病原体に特徴的な遺伝子領域や病原因子に関わる遺伝子を検出する、②培養にて分離された菌株の菌種同定<sup>1)</sup>、もしくは病原因子や耐性遺伝子を検索する、の2つに大別される。本稿では狭義の感染症の遺伝子検査である前者、臨床検体から分離培養を経ることなく病原体を検出する系を中心として、現状の遺伝子解析技術を整理しながら、抗酸菌感染症の迅速診断におけるその適応について実際に経験した臨床検体の解析事例をもとに概説してみたい。

#### 1. 遺伝子解析技術の潮流

1990年代からPCRをはじめとする遺伝子増幅による感染症の迅速診断技術は急速な進歩を遂げてきた。PCR法は迅速性に優れ、検出感度および特異性も高いことから、その有用性に関する論文が数多く報告され、今日に至っている。しかし、PCR法は研究室や外注ラボでは頻用されているものの、病院検査室では専用の機器・試薬を用いる結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) などの検出を除き、遺伝子検査法が感染症診断に広く利用されていないのが実情である。すなわち、これまでのPCRによる遺伝子検査は病院検査室で簡便に行えるレ

ベルまで進化していなかったのである。

では、PCR法 (conventional PCR) が感染症診断に広く利用されなかった要因は何であろうか。技術的な側面から鑑みるに、①1反応で1病原体のみの検出、②増幅産物の検出・確認にゲル電気泳動が必要で手技が煩雑、③正確な定量解析を行うことができない、などの限界と問題点を抱えていたからであろう<sup>2)</sup>。近年、これらの課題を打開するべく、技術革新の恩恵を受けながらPCRに様々な改良が加えられ、感染症の診療に生かされる遺伝子検査の実用化がみえてきた。すなわち、どんな細菌のDNAであっても1対のプライマーで増幅することによって想定外の起炎菌をも検出・同定できる broad-range PCR、PCR増幅産物をリアルタイムに検出して、遺伝子の定量を簡便かつ迅速に行うことが可能な real-time PCR法、1回の反応で2~5種類の病原体検出を試みる multiplex PCR法が適宜活用されることに期待を寄せている。従来のPCRから進歩向上しているこれら3つのPCRバリエーションのうち、抗酸菌感染症の起炎菌検出と同定に有用な broad-range PCRの特徴を次に紹介する。

#### 2. ブロード・レンジ PCR

通常のPCR法が菌種あるいは病原因子の特異的な塩基配列領域を増幅するのに対して、broad-range PCRでは細菌に共通な16S rRNA領域を増幅する (Fig. 1)。1

組のプライマーで多種類の細菌をユニバーサルに検出できることが最大の利点である。増幅された rRNA には特定の細菌において特徴的な可変領域 DNA を含むため、ATCG の塩基配列を決定し (sequencing), その配列を GenBank, RIDOM<sup>3)</sup>, EzTaxon<sup>4)</sup>などのデータベースと比較して, 系統解析することによって菌種を特定することができる。高速な自動 DNA シークエンサーの普及とあわせて, DNA 塩基配列解析による微生物の同定が数時間で実施可能である。通常は無菌的な検体である髄液, 関節液, 胸水, リンパ節ほかの組織や膿汁からの微生物検出に broad-range PCR が活躍する余地は非常に大きい<sup>5)</sup>。とりわけ感染性心内膜炎, リンパ節炎のような起炎菌がバリエーションに富む感染症の診断において威力を発揮する。さらに, broad-range PCR は培養が困難あるいは培養できない病原体の検出, 新菌種の検出・同定, 未知の病原体発見においてもきわめて重要な役割を果たしている。

抗酸菌の同定においては, 16S rRNA 遺伝子の塩基配列だけでは, 属レベルまでの同定が困難な場合がある。たとえば, *Mycobacterium kansasii* と *M. gastri*, *M. mucogenicum* と *M. phocaicum* の各々は 16S rRNA 遺伝子塩基配列が完全に一致しており, どちらの種であるか識別できない<sup>6)</sup>。また, *M. marinum* と *M. ulcerans*, *M. intracellulare* と *M. chimaere*, *M. abscessus* と *M. bolletii*, *M. porcinum* と *M. neworleansense* では各々で 16S rRNA 遺伝子の塩基配

列の相同性がきわめて高く (99.9%), お互いを区別することは困難である。そこで, 近年, 16S rRNA 遺伝子以外のハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づく菌種の同定が検討・報告されている (Table)。筆者らは抗酸菌を検出・同定する際には, 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* 遺伝子を増幅後, 各塩基配列のシークエンス解析とデータベースによる相同性の検索を実施している。これら 3 遺伝子の系統的な位置から総合的に判断して菌種の同定を行っている。なお, *rpoB*, *hsp65* 遺伝子に関しては, 抗酸菌群すべての菌種を各々 1 組のプライマーセットを用いた PCR で増幅できるので, 狭義の broad-range PCR と解釈できる。

### 3. 感染症の診断における遺伝子検査の適応

著者らは, 全国の病院から培養法や免疫学的抗原検出法ほかの日常検査法で診断できなかった症例の検体解析を依頼されている。2007年6月末までに, 約80病院から280症例以上 (最近の1年間で約160症例) の臨床検体を前述の遺伝子解析法にて精査してきた。このうち, 22症例が抗酸菌感染症の診断に結びついた。解析結果の報告は大半の症例で検体到着日に, 遅くとも2~3日以内に行っている。ここでは抗酸菌感染症の遺伝子検査の適応を探るうえで, 実際にどのようなケースで診断に結びついたかについて提示しておきたい。

#### (1) 化膿性リンパ節炎<sup>7)</sup>

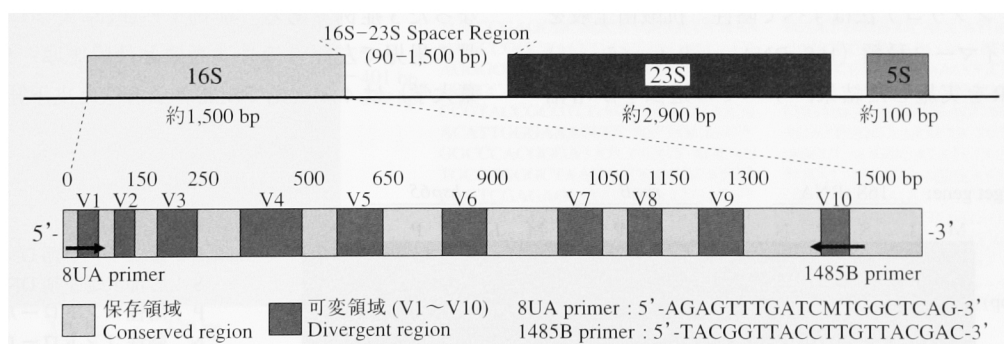


Fig. 1 Structural organization of the bacterial 16S rRNA gene, with conserved and divergent regions

Table Several housekeeping genes for phylogenetic classification and identification of *Mycobacterium* species

遺伝子名	正式名/機能・活性	塩基数 (bp)	系統解析用塩基数 (bp)
16S rDNA	16S ribosomal RNA	1,541	>1,300
<i>rpoB</i>	RNA polymerase $\beta$ subunit	4,029	395
<i>hsp65</i>	65-kDa heat shock protein	1,642	424
<i>dnaJ</i>	chaperone with DnaK	1,131	1,100
<i>sodA</i>	superoxide dismutase	621	400
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	2,415	1,000
<i>recA</i>	DNA repair protein RecA	1,062	500
<i>secA1</i>	Sec-dependent protein SecA1	1,947	700

皮膚組織および頸部リンパ節の病理組織学的検査にて抗酸菌が観察されたが、抗酸菌用液体培地で2週間培養するも検出できないとのことで凍結していた組織の精査を依頼された。遅速発育抗酸菌全般を検出可能なプライマー（16S rRNA 遺伝子）と抗酸菌の種同定に用いられる *rpoB* と *hsp65* 遺伝子を増幅するプライマーを用いてPCRを実施し、増幅産物を得ることができた（Fig. 2）。これらの増幅されたDNAの塩基配列を決定した結果、*Mycobacterium haemophilum*であることが判明。本菌種は至適発育温度が30℃前後で、さらにヘミン（鉄）要求性の抗酸菌であるため汎用されている抗酸菌用液体培地や小川培地には発育しない。血液寒天培地やX因子添加の抗酸菌培地を用いて培養した結果、本菌を分離培養することに成功した。

#### (2) 皮膚潰瘍<sup>8)</sup>

右耳介部の結節から採取された膿汁の抗酸染色で菌体が観察され、7H11培地、小川培地、血液寒天培地を用いて培養を開始。2週間経過後も集落形成を認めなかったため、膿汁の遺伝子解析依頼があった。膿汁から直接抗酸菌DNAの検出と同定を試みたところ“*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*”であることが判明。培養の温度を27℃に変更してもらい再度培養を開始。9週目に数コロニーが得られた。分離菌の遺伝子解析でも本菌種と同定された。

#### (3) 新種による肺非結核性抗酸菌症

HIV感染の米国人男性。喀痰の塗抹でガフキー2号であったが、アンプリコア法はすべて陰性。抗酸菌全般を増幅するプライマー3種類（16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* gene）を用いてPCRを実施した結果、すべての遺伝子が増幅

された。増幅産物の塩基配列を決定後、系統解析を行ったところ、既存の *Mycobacterium* 属菌とは異なる新種であった。後に培養で分離された菌株も同じ塩基配列をもつことが証明された。

以上の3症例は検体の遺伝子解析結果が分離培養条件の変更をも示唆する有益な情報を提供し、さらには新菌種の登録や生化学性状検査と薬剤感受性実施のための生菌そのものを得ることに結びついた貴重な事例といえる。

#### (4) 尋常性狼瘡<sup>9)</sup>

皮膚組織の病理組織学的検査にて抗酸菌が観察されたが外注検査所に依頼した抗酸菌検出のPCRが陰性であったとのことで、皮膚組織の精査依頼。前述の3症例と同様な解析手法にて *M. tuberculosis* の遺伝子を検出できた。真性皮膚結核の診断となる。

#### (5) 腸結核

剖検の回盲部組織の病理組織学的検査にて抗酸菌が観察されたが、数年前の症例で組織自体は保存されていなかった。よって、培養で生えてこなかったのではなく培養を実施できなかった症例といえる。パラフィン切片を入手してキシレンで溶解した後、DNAを回収した。PCR法にて抗酸菌の検出を試みた結果、16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* 遺伝子がすべて増幅された（Fig. 3）。*M. tuberculosis* の塩基配列であることが判明した。

#### (6) BCG 骨髄炎の3症例

近医の小児科で抗菌薬による治療が行われるも症状の改善をみなかったため、大学病院小児科に紹介入院となった3症例である。症例1<sup>10)</sup>（岐阜大学）は1歳5カ月の男児で左脛骨の骨透亮像と骨膜肥厚、症例2<sup>11)</sup>（千葉大学）は4歳女児で左肋骨融解像と皮下腫瘍、そして

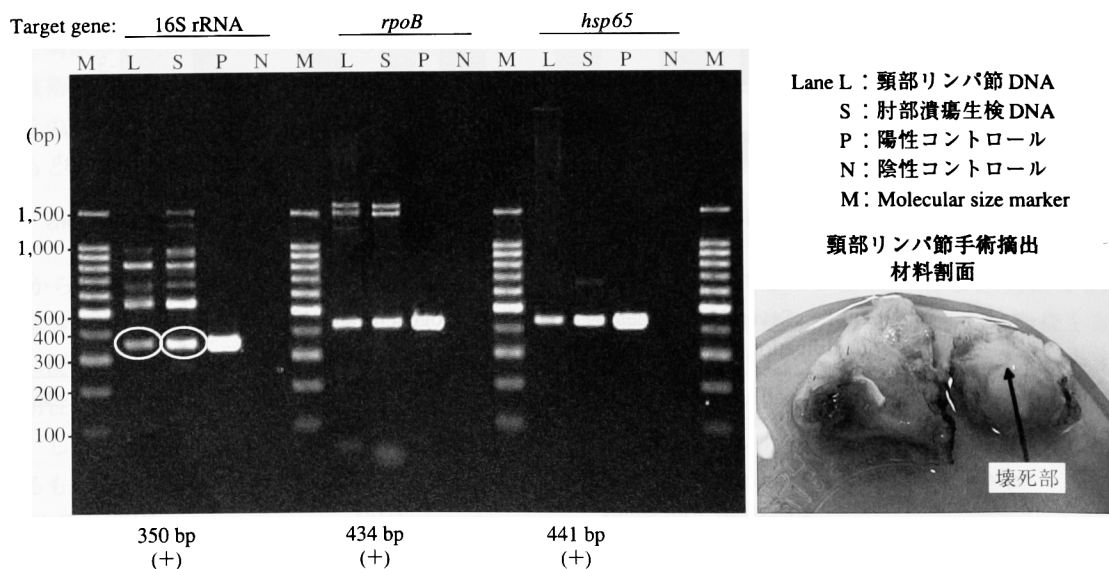


Fig. 2 PCR assay for detection of mycobacteria in the clinical specimens

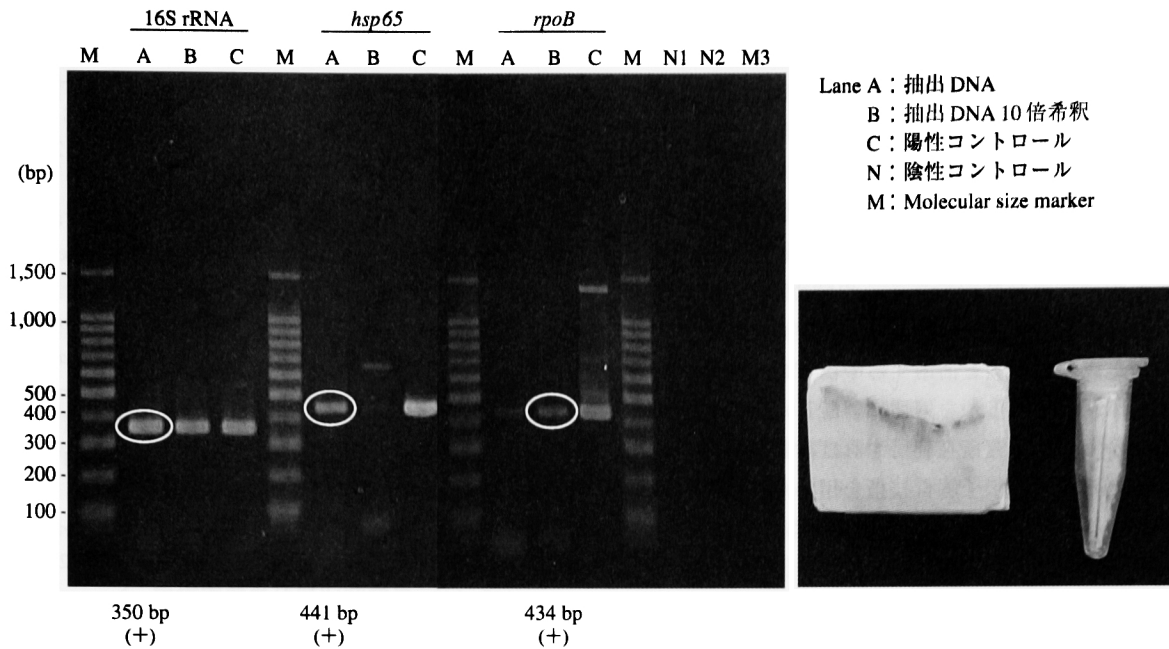


Fig. 3 Detection of mycobacterial DNA in the paraffin-embedded tissue by PCR

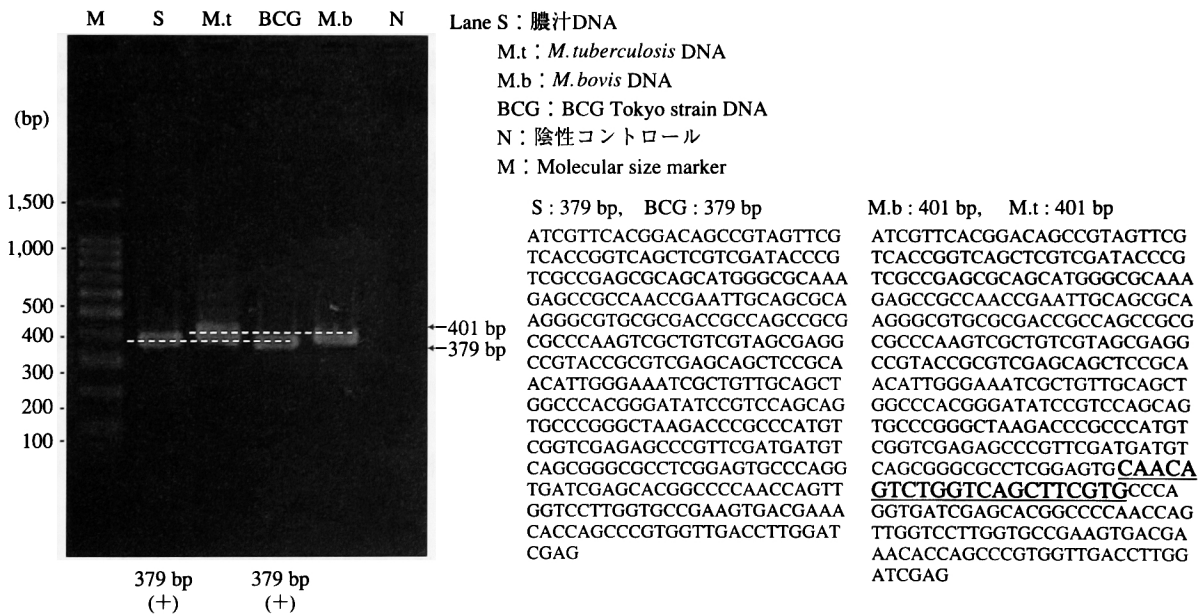


Fig. 4 Detection and identification of *M. bovis* BCG Tokyo strain in the pus specimen by PCR with the specific RD16 primers; the vaccine strain had an RD16 region which was 22 base pairs shorter than all other *M. tuberculosis* complex strains

症例 3<sup>12)</sup> (鹿児島大学) は左前胸部の皮下腫瘍と左第 6 肋骨の溶骨性変化を認めた。症例 2 と 3 は検査室で実施の結核菌群 PCR 法が陽性となったが *M. tuberculosis* と BCG 株を含む *M. bovis* との鑑別はできないことから精査依頼された。このようなケースにおいては、BCG 株では欠損している遺伝子領域 RD1 の両端に特異的なプライマーを使用して PCR を実施する。増幅産物が得られ

れば BCG 株であることが確認できる。さらに、BCG 東京株は他国で使用されている BCG 株や *M. tuberculosis*, *M. bovis* に存在する RD16 領域に 22 塩基分が欠損しているという特徴がある。よって、この RD16 領域の遺伝子を PCR で増幅した後、産物 DNA の長さ (379 bp) あるいは産物をシーケンス解析して BCG 東京株であることを確認している (Fig. 4)。



## おわりに

以上、診断に難渋して臨床検体の解析を依頼された症例を紹介しながら、抗酸菌感染症診断における遺伝子解析技術の適応について取り上げた。遺伝子検査がかなり身近な存在になったものの、検出・同定試薬が市販されている結核菌やMAC以外の抗酸菌による感染症を迅速診断するのは困難な状況である。現時点では塗抹鏡検、培養法を主体とした日常検査の結果を中心として診断を行いながら、遺伝検査を活用するのはどのような症例もしくは臨床経過であるかを適切に判断したうえで、外注ラボやしかるべき研究室を利用すれば診断率の向上につながるであろう。遺伝子解析技術を用いた感染症の診断においても、臨床医と検査する側との緊密なコミュニケーションがきわめて重要である。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、たいへん貴重な症例の検体を解析する機会を与えていただいた諸先生方に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 大楠清文, 河村好章, 江崎孝行: ゲノムベースの細菌検査の基礎. 化学療法の領域. 2005; 21: 323-332.
- 2) 大楠清文: PCR法を使った臨床微生物検査の導入時の障害と改善策. 「感染症診療のコツと落とし穴」, 斎藤厚編, 中山書店, 東京, 2004, 28-29.
- 3) Harmasen D, Rothganger J, Frosch M, et al.: RIDOM:

- Ribosomal differentiation of medical micro-organisms database. Nucleic Acids Res. 2002; 30: 416-417.
- 4) Chun J, Lee J, Jung Y, et al.: EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int J Sys Evol Microbiol. 2007; 57: 2259-2261.
  - 5) Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava L, et al.: Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. J Clin Microbiol. 2000; 38: 32-39.
  - 6) Yamada-Noda M, Ohkusu K, Ezaki T: *Mycobacterium* species identification—A new approach via *dnaJ* gene sequencing. Syst Appl Microbiol. 2007; 30: 453-462.
  - 7) 阿部教行, 大楠清文, 小松 方, 他: 皮膚潰瘍性病変より *Mycobacterium haemophilum* を検出した1例. 日本臨床微生物学雑誌. 2006; 16: 抄録集 P. 130.
  - 8) 鈴木智子, 浅野裕子, 大楠清文, 他: “*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*” による皮膚潰瘍. 皮膚病診療. 2008; 30: 145-148.
  - 9) 長澤智佳子, 清島真理子, 大楠清文, 他: 高齢者に生じた尋常性狼瘡の2例. 臨床皮膚科. 2007; 61: 235-238.
  - 10) Funato M, Ohkusu K, Kondo N, et al.: Refractory osteomyelitis caused by bacille Calmette-Guérin vaccination: a case report. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 59: 89-91.
  - 11) 石和田稔彦, 菱木はるか, 大楠清文, 他: BCG菌とヒト型結核菌の鑑別にPCR法が有用であった胸部皮下膿瘍・肋骨骨髓炎の1小児例. 感染症学雑誌. 2008; 82: 30-33.
  - 12) 上野健太郎, 西順一郎, 大楠清文, 他: BCG骨髓炎が疑われた2幼児例. 日本小児科学会雑誌. 2007; 111: 1629.

## 3. 抗酸菌の感受性検査

琉球大学医学部附属病院検査部 仲宗根 勇

### はじめに

臨床検査で実施される細菌薬剤感受性試験は大きく、一般細菌薬剤感受性試験と抗酸菌薬剤感受性試験の2つがある。わが国では一般細菌についてはClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の推奨する試験法および判定ブレイクポイントを採用する施設が大部分である。それに比べ抗酸菌薬剤感受性試験は自施設で実施する施設も少なく、一般細菌に比べ統一された方法やその試験法についてはあまり議論されていない。本シンポジウムでは抗酸菌薬剤感受性試験について一般細菌薬剤感受性試験方法の違いと問題点について述べる。

### 1. 薬剤感受性試験方法の違い

抗酸菌の薬剤感受性試験と一般細菌の薬剤感受性試験方法との大きな違いは、測定培地の組成を除けば、用いる接種菌液の作成方法と判定方法にある。通常、一般細菌は増殖スピードが速いため培地面に発育した菌集落を肉眼的に観察し、同一とみなされる菌集落の3~5集落を釣菌して接種菌液を作成する。または集落を純培養、増殖させて菌液を作成する方法が採用されている。

それに対し、抗酸菌特に結核菌に対しては迅速な結果報告を目的に分離培地から発育菌体をかきとり、あるいは濃縮操作で接種菌液が作成されているのが現状である。このことは抗酸菌の薬剤感受性試験に接種されている菌は集落単位ではなく、発育菌集団として接種菌液を

作成する proportion 法である。このことが一般細菌と異なる点である。

抗酸菌薬剤感受性試験で proportion 法が採用される理由は結核菌感染症の感染部位は多様な菌集団から構成されると考えられること。多様な菌集団のうち1%以上が測定薬剤に耐性を示す菌集団が存在した場合には耐性と判定され、臨床的な治療効果が期待できない。

また感性とは測定薬剤に耐性を示す集団は1%以下で95%が臨床的に反応する、とされている。それに対し、一般細菌での耐性の意味は個々の菌株が測定薬剤に耐性を示す意味であり、集団ではなく1個の菌株を意味する。proportion 法による抗酸菌薬剤感受性試験での耐性とは分離菌株の薬剤耐性を意味するのではなく臨床的耐性を意味し、一般細菌でいう耐性とは異なる解釈である。

## 2. 接種菌濃度作成の問題点

抗酸菌の分離には液体培地や小川培地が汎用されている。いずれの培地も抗酸菌の検出に主眼がおかれている分離培地である。液体培地は発育性には優れるものの混在する抗酸菌は区別できない、小川培地も培地形状や面積から多数発育した場合には同様に個々の抗酸菌集落が区別できない欠点がある。迅速な報告を目的に多くの検査室では、これらの培地から直接、発育菌体をかきとりまたは濃縮して薬剤感受性試験に用いられている。この接種菌液作成方法では初代分離培地に耐性菌と感性菌が混在した場合には耐性菌と判定され、また個々の薬剤に対し単剤耐性菌の組み合わせで混在した場合には多剤耐性として判定される危険がある。例えば、isoniazid (INH) 単剤耐性株と rifampicin (RFP) 単剤耐性株が混在して存在した場合に、発育集落または菌濃縮による接種菌での薬剤感受性成績は多剤耐性株と判定される。われわれは新規結核患者を含む10人の結核患者の臨床検体に含まれる結核菌を、直接寒天培地上で集落を形成させ、単離した個々の集落についてプロシミック MTB-1 (極東製薬) による薬剤感受性と染色体 DNA 挿入配列を解析し、臨床材料にいかなる結核菌集団が含まれるかを検討した。その結果10症例中7症例では同一の材料から分離されたすべての集落での各薬剤に対する MIC 値は ±2 管差以内であったが、3症例では分離された個々の集落間で MIC 値に有意の差が観察された。薬剤感受性試験による表現型 streptomycin (SM), ethambutol (EB), INH 耐性に関与する遺伝子変異の有無および RFLP 解析結果から、3つのグループに大別された。薬剤感受性試験結果と類似度の高い RFLP パターンからモノクローナルな細胞集団、薬剤感受性試験は近以するものの RFLP パターンの類似度から複数の結核細胞から構成される集団、薬剤感受性も RFLP パターンも明確に異なる結核菌

細胞集団で構成される集団を含む検体であった。

また、薬剤感受性が同一でも遺伝子型は多様な細胞集団であり、表現型と遺伝子型の間には必ずしも普遍性をもった相関が認めない結果も確認された。

このように臨床検体から検出される結核菌は多様な細胞集団から構成されることから、日常検査での薬剤感受性試験での偽耐性の報告を避ける必要がある。抗酸菌を集団として接種する日常検査では確実に接種菌液は単一であるという確認 Purity Check の実施が必要である。近年増加している液体培地分離法による検出方法、特に治療中患者検体からは定常発育株と遅発育株が混在する危険を検査室は常に念頭に検査を進める必要がある。

## 3. 測定薬剤の問題点

結核菌薬剤感受性試験のもう一つの問題は検査室測定で測定される薬剤は単独薬剤なのに対し、治療に使用される薬剤は常に複数薬剤併用であることである。このことは検査室で測定される単独薬剤の測定では耐性を示す菌株でも複数薬剤併用時の相乗または拮抗の判定ができない測定法である認識が必要である。また抗酸菌のヒト感染部位は細胞内、低酸素環境であるのに対し、測定試験環境は通常大気または炭酸ガス環境で培養・測定され、細胞内、細胞外 (血清中) とは薬剤濃度も異なる環境である。このようなことから検査室測定の抗酸菌薬剤感受性成績は抗菌薬治療を直接的に反映しない場合があり、日常検査で実施される抗酸菌薬剤感受性試験結果は測定薬剤に耐性を示す抗酸菌検出試験法と位置づけられる。

## 4. non-tuberculosis 薬剤感受性試験

わが国には結核菌以外の抗酸菌を対象とした薬剤感受性試験方法の標準方法はない。「結核菌検査指針2007」では、*Mycobacterium kansasii* 以外の非結核性抗酸菌では薬剤感受性試験結果と治療効果には関連を認めないため小川培地を用いた薬剤感受性試験は行わないとしている。National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 現 CLSI) では結核菌以外の抗酸菌に対し、その発育速度から大きく3つに区別して薬剤感受性試験の測定方法と測定薬剤を提示している。第1のグループは迅速発育菌群 *Mycobacterium fortuitum* group (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* third biovariant complex), *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium smegmatis* group (*M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*) と、その他の臨床的に重要な迅速発育発色菌を含む。これらの菌群を対象とした薬剤感受性試験法は Mueller-Hinton broth を用いた微量液体希釈法である。測定薬剤は Amikacin, Cefoxitin, Ciprofloxacin, Clarithromycin,

Doxycycline, Imipenem, Sulfamethoxazole, Tobramycinにブレイクポイントが設定されている。第2のグループは *Mycobacterium avium* complexを中心とした菌群で *M. kansasii* と *Mycobacterium marinum* が含まれる。*M. avium* complexの測定法は Middlebrook 7H9 brothでの microtiter dilution, *M. kansasii* では proportion method または microdilution法での Clarithromycin, Azithromycinのブレイクポイントが設定されている。*M. marinum* を対象とした日常検査での薬剤感受性測定は推奨されていない。第3のグループはその他の遅発育菌群で *Mycobacterium terrae/non-chromogenicum*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium malmoeense*, *Mycobacterium simiae* などを含むグループである。薬剤感受性試験法は proportion method または microdilution法での測定法が推奨されている。このように CLSIはグループごとに薬剤感受性試験方法を提示しているが、その測定方法と測定培地は多岐にわたる。これらの方法をわが国の検査室ですべて準備するのは困難であり、さらに測定された薬剤報告にも例外が設定されている。IPMについては *M. chelonae* と *M. abscessus* には報告しない、Tobramycinは *M. chelonae* にのみ報告するなど、わが国の臨床検査とは異なる制約が設定されている。このように CLSIの推奨する測定方法をすぐに受け入れるのは困難な状況である。

近年 non-tuberculosisの検出は増加傾向である。しかしわが国では測定方法が統一されていない事実から薬剤感受性データの互換性に欠け、治療および疫学集計等にも支障をきたしているのが現状である。現在、non-tuberculosisを対象とした薬剤感受性測定方法は microdilution法によるプロスミック NTM (極東製薬)のみ市販されているが、他の迅速発育株についてもその標準的測定方法と測定薬剤の確立が必要である。

#### 4. 結核菌の病原性機序—細胞内寄生戦略

京都大学大学院医学研究科微生物感染症学准教授 河村伊久雄

##### 結核菌の殺菌抵抗性

###### (1) ファゴリソーム融合阻害

結核菌は宿主体内に侵入後、肺胞マクロファージ、樹状細胞 (dendritic cell, DC) あるいは単球に積極的に侵入する。この細胞内侵入にはマクロファージ表面の補体レセプターやマンノースレセプターなど様々なレセプターが関与することが知られている。また、結核菌は菌

#### 5. 薬剤感受性試験の精度管理

臨床検査で最も重要な項目に測定法の精度管理があげられる。「結核菌検査指針2007」および CLSIとも結核菌の薬剤感受性試験精度管理用菌株として *M. tuberculosis* ATCC27294 (H37Rv) が指定されている。しかし指定株は現在設定される抗結核薬の薬剤濃度に対しすべて非発育を示す感性株のため、発育を認めた場合のみ検査の異常が判断できる。このことは現在の小川培地、CLSI推奨法での測定薬剤濃度では感性を示し、すべて発育なしと判定される。その結果、検査室では使用培地の発育支持能力、接種菌濃度のチェック等が正しく判定できないこととなる。通常、薬剤感受性の精度管理菌株の設定には測定濃度域を含むように設定されるが1濃度法の場合には、この設定ができないこと、さらに抗酸菌の場合には2剤以上に耐性を示す株は危険なため使用することは推奨されないことが測定方法の精度管理を困難にしている。

さらに最も大きな抗酸菌の検査室精度管理実施の障害は、精度管理菌株の入手が困難なことである。多くの検査室は三種病原体 (結核菌)、四種病原体 (INH, RFP 耐性) を取り扱う設備がないのがわが国の検査室の現状であろう。このため精度管理菌株の入手・保存を最も困難な状況にしている。このような背景が一般細菌に比べ、抗酸菌の試験精度管理を困難にしている。

##### おわりに

結核菌を中心に抗酸菌の薬剤感受性試験方法の問題点を述べた。抗酸菌の薬剤感受性試験方法は測定方法のみならず、一般細菌に比べ検査環境も変化した施設で測定を実施する施設も激減しているのが現状である。このような状況はわが国の抗酸菌検査の衰退が懸念されることから、早々に問題点の解決をはかる必要がある。

体表面の mycobacterial mammalian cell entry protein 1A や mycobacterial DNA-binding protein 1 を介して非貪食細胞である肺胞上皮細胞に侵入する<sup>1)2)</sup>。これら結核菌侵入因子がマクロファージへの感染にどの程度関与するのかは明らかではないが、病原体を排除する能力が弱い上皮細胞への侵入は、結核菌の宿主体内での長期生存をより容易にするものと考えられる。

マクロファージに侵入した菌はファゴソーム内で生存

増殖する。通常、ファゴソームの成熟が進むと、ファゴソームはリソソームと融合してファゴリソソームが形成される。このファゴリソソーム内の環境は結核菌にとっても殺菌的である。しかし、結核菌はファゴリソソーム融合を阻害することで、細胞内寄生性を発揮しており、これは結核菌がマクロファージ内で生存するための最も重要な機序である。最近、この抑制機序に、結核菌細胞壁に豊富に存在するリポ多糖体成分である lipoarabinomannan (LAM) が重要な役割を果たしていることが報告されている。Kangらは、病原性の強い株に存在する Mannose-capped LAMと細胞表面のマノースレセプターとの結合が、ファゴリソソーム融合阻害に関与することを示した<sup>3)</sup>。また、その機序として Vergneらは、ファゴソームとリソソームの融合には phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) により合成されるファゴソーム膜上の phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) が重要であるが、LAMのシグナルはPI3Kのファゴソームへの動員を抑制するため、ファゴソーム上のPI3Pの合成が抑えられることで発揮されることを示した<sup>4)</sup>。さらにVergneらは、結核菌が産生する lipid phosphatase である SapMがPI3Pの脱リン酸化を引き起こすことで、ファゴリソソーム融合を抑制することも明らかにした<sup>5)</sup>。これらに加えて、Scherrらは、結核菌が真核細胞のプロテインキナーゼ類似のタンパク質であるプロテインキナーゼ G (PknG) を産生することを示した。さらに彼らは、このPknG欠損変異株の感染では、ファゴリソソームが形成され、菌が殺菌処理されやすいことを示し、PknGが結核菌によるファゴリソソーム融合阻害に関与することを明らかにした<sup>6)</sup>。さらに、Jayachandranらは、マクロファージに存在する coronin 1が結核菌を含むファゴソームに集積し、Ca<sup>2+</sup>依存性フォスファターゼである calcineurin を活性化することで、ファゴリソソーム融合が阻害されることを示した<sup>7)</sup>。今のところ、coronin 1をファゴソーム上に維持するための菌側因子については明らかにされていないが、それが菌の病原性において重要な役割を果たすことは間違いない。またMacGurnらは、結核菌の分泌装置である ESX-1 変異株の感染では、感染後のファゴリソソーム融合が阻害されないことを明らかにした<sup>8)</sup>。ESX-1を構成する遺伝子群は、菌の病原性に重要な RD1 領域に存在する。この領域には ESX-1 より分泌される重要な T細胞抗原である early secreted antigenic target-6 (ESAT-6) と culture filtrate antigen 10 kD (CFP-10) が存在するが<sup>9)</sup>、しかし、これらの欠損変異株を感染させてもファゴソームリソソーム融合が生じるため、これら因子のファゴリソソーム融合阻害への関与は否定的である。しかし、ESX-1を介して分泌される因子は ESAT-6/CFP-10以外にも報告されており、それらの中にファゴリソ

ソーム融合阻害に関与する因子が存在することが示唆される。このように、結核菌はマクロファージのファゴソーム内で生存増殖を行う細胞内寄生戦略をとるが、ファゴソームの成熟過程を阻害するためには、エフェクター分子を細胞質内に放出する必要がある。このため、結核菌の分泌装置は、グラム陰性菌が有する分泌装置と同様に、菌が感染を成立させるための重要な役割を果たしているものと考えられている。

## (2) アポトーシスの抑制

マクロファージに結核菌弱毒株 (H37Ra) を感染させると、アポトーシスが誘導されるが、カスパーゼ阻害剤を添加してアポトーシスの誘導を抑制すると、菌の細胞内増殖が改善される。一方、結核菌強毒株 (H37Rv) の感染では H37Ra 感染と比較して、アポトーシスが抑制され、菌は細胞内で増殖することが示されている。この結果は、アポトーシスが菌の細胞内生存に影響することを示すものである。また、結核菌由来 19 kDa リポタンパク質の Toll-like receptor 2 (TLR2) を介した認識が細胞のアポトーシスを誘導することから、感染後に誘導されるアポトーシスは結核菌に対するひとつの宿主初期防御反応と捉えることができる。しかし、病原性の強い菌は、抗アポトーシス因子である Mcl1 の発現を誘導することでアポトーシスを抑制することが示されている<sup>10)</sup>。結核菌の有するアポトーシス抑制活性は、菌にとって増殖の場を確保するという意味で重要な機序であり、細胞内寄生を可能にするために必須であると考えられる。

最近、結核菌を感染させたマクロファージにオートファジーを誘導すると、細胞内菌数が減少することが示された。また、マクロファージを interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) で刺激した場合には、LRG 47 (p47 GTPase) の誘導を介してオートファジー機構が活性化される。その結果、菌を含むファゴソームはオートファゴソームと融合し、さらにリソソームと融合してオートリソソームが形成され、菌が殺菌処理されることが示されている<sup>11)</sup>。オートファジーは、細胞の恒常性維持に必要と考えられてきた機構であるが、この結果は、オートファジーが結核菌の細胞内殺菌にも関与することを示すものである。しかし、結核菌は感染後にオートファジーの誘導に必要な PI3K 活性を抑制することで、オートファジーの誘導を抑制するものと考えられ、この抑制機序を解除するために IFN- $\gamma$  による刺激が必要となる。

## マクロファージや DC の機能制御

マクロファージや DC の感染局所への動員、あるいは結核菌貪食後のマクロファージの活性化は結核菌に対する初期防御反応だけでなく、特異的免疫応答の誘導においても重要である。マクロファージや DC は細胞表面の

TLRを介して結核菌を認識する。TLR2はLAM, フォスファチジルイノシトールマンノシド (phosphatidylinositolmannoside, PIM), あるいは19 kDaリポタンパク質を認識する。また, 易熱性結核菌体抗原はTLR4により識別され, 炎症性サイトカインが産生される。一方, 結核菌はこれらTLRからのシグナル伝達を修飾する能力があることが最近明らかとなってきた。結核菌の主要なT細胞抗原であるESAT-6は, これまでその病原性における機能は明らかにされていなかったが, Pathakらは, ESAT-6がTLR2に結合するとAktキナーゼが活性化され, その結果TLRのアダプター分子であるMyD 88とIRAK4の会合が阻害されるため, TLRを介したシグナルが抑制されることを示した<sup>12)</sup>。また, 結核菌由来熱ショックタンパク質hsp 70が, DCの分化を阻害するとともに, DCからの抗炎症性サイトカインであるIL-10産生を亢進させることが示された<sup>13)</sup>。さらに, 病原性の強い結核菌やBCGのLAMはその先端にマンノース残基が付加しており (Man-LAM), 非定型抗酸菌のLAMとは構造的に異なる。このMan-LAMはDC上に存在するDC-SIGN (DC-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin) を介してセリン/スレオニンキナーゼであるRaf-1の活性化を誘導する。活性化されたRaf-1はNF- $\kappa$ B p65サブユニットのアセチル化を誘導し, その結果, TLR4を介した刺激によりIL-10産生が亢進することが示されている<sup>14)</sup>。また, このMan-LAMはDCの分化を阻害することも明らかにされている<sup>15)</sup>。このように, 結核菌の菌体成分はマクロファージやDCの機能を修飾することができる。さらに, これら糖脂質やタンパク成分は菌体より遊離してexosomeの形で細胞外に放出され, 近接した細胞に取り込まれることが報告されている<sup>16) 17)</sup>。同様の過程は, アポトーシスにおいて観察され, アポトーシス小胞によって運ばれた菌体成分は効率よく抗原提示される (cross priming) ことが示されている。しかし, exosomeを介して細胞外に放出された成分が同様に抗原提示されるのか, あるいは取り込んだ細胞の機能に影響を及ぼすのかについては不明であり, 今後明らかにしていかなければならない。

#### 防御免疫成立後の結核菌の抵抗性

感染の進行に伴い, 感染病巣部には肉芽腫が形成される。肉芽腫内部は酸素分圧が低く, 偏性好気生菌である結核菌には非常に苛酷な環境と考えられる。しかし, 結核菌はその代謝系を環境に適応したものに切り替えて, 感染を成立させるものと考えられている。McKlenneyらは, 結核菌が持続感染を成立させるためにはイソクエン酸リアーゼ (isocitrate lyase, ICL) が重要な役割を果たすことを示した<sup>18)</sup>。ICLは脂質を材料とした糖の生合成経

路, グリオキシル酸サイクルの酵素の一つである。肉芽腫内に存在する結核菌のICL活性が菌の生存に重要であるということは, 菌が酸素分圧の低い環境では脂質を炭素源として利用することを示すものである。その他, 熱ショックタンパクの一種である $\alpha$ -crystallinやnitrate reductase, またはEis (Enhanced intracellular survival) やKatGなど多くの因子が細胞内増殖や持続感染に関与することが報告されており, 菌が宿主体内で長期間生存するためには, 複雑なメカニズムが働いていると思われる。

一方, 結核菌の活発な増殖が認められる組織では, ネクロシスに陥った細胞が多数認められる。これまでの解析から, 細胞内で増殖した菌が感染を拡大するため, 菌は感染細胞のネクロシスを誘導することが示されている。このネクロシス誘導には結核菌ゲノム上のRD1領域が重要な役割を果たしており, この領域に存在する遺伝子産物が, ミトコンドリア膜障害に関与し, その結果として細胞内ATP濃度が減少するため, 細胞がネクロシスに陥ることが示されている<sup>19)</sup>。また, 結核菌感染初期には, 増殖に必要な細胞内環境を維持するため, 菌はカスパーゼ9の活性化を誘導してネクロシスを抑制することが示唆されている<sup>20)</sup>。このような結核菌による感染マクロファージの細胞死の制御が, 生体内での生存増殖に寄与するところは大きいと考えられる。

#### おわりに

結核菌はヒトを宿主として共生することに最も成功した微生物の一つであり, ヒトへの感染の歴史は紀元前にも遡ることができる。一方, 結核菌の有する宿主防御免疫の回避機構については, 今のところ断片的にしか明らかにできていない。しかし, 1998年に結核菌のゲノム配列が明らかにされ, 遺伝子発現の網羅的な解析が可能になって以来, この研究分野において多くの成果が発表されている。今後さらなる研究成果の蓄積が, 結核菌の病原性の解明だけでなく, 新たな予防ワクチンの基礎となり, 結核の撲滅に結びつくものと期待される。

#### 文 献

- 1) Kohwiattaganun J, Kawamura I, Fujimura T, et al.: Mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce1A)-mediated adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. *Microbiol Immunol.* 2007; 51: 253-261.
- 2) Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, et al.: Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem.* 2004; 279: 39798-39806.
- 3) Kang PB, Azad AZ, Torrelles JB, et al.: The human macro-

- phage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med.* 2005 ; 202 : 987-999.
- 4) Vergne I, Chua J, Deretic V: Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *J Exp Med.* 2003 ; 198 : 653-659.
  - 5) Vergne I, Chua J, Lee HH, et al.: Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 ; 102 : 4033-4038.
  - 6) Walburger A, Koul A, Ferrari G, et al.: Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science.* 2004 ; 304 : 1800-1804.
  - 7) Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, et al.: Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell.* 2007 ; 130 : 37-50.
  - 8) MacGurn JA, Cox JS: A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. *Infect Immun.* 2007 ; 75 : 2668-2678.
  - 9) Ize B, Palmer T: Mycobacteria's export strategy. *Science.* 2006 ; 313 : 1583-1584.
  - 10) Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, et al.: Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 430-437.
  - 11) Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al.: Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* 2004 ; 119 : 753-766.
  - 12) Pathak SK, Basu S, Basu KK, et al.: Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nature Immunol.* 2007 ; 8 : 610-618.
  - 13) Motta A, Schmitz C, Rodrigues L, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. *Immunol.* 2007 ; 121 : 462-472.
  - 14) Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, et al.: C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Immunity.* 2001 ; 26 : 605-616.
  - 15) Dulphy N, Herrmann JL, Nigou J, et al.: Intermediate maturation of *Mycobacterium tuberculosis* LAM-activated human dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2007 ; 9 : 1412-1425.
  - 16) Beatty WL, Ullrich HJ, Russell DG: Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event. *Eur J Cell Biol.* 2001 ; 80 : 31-40.
  - 17) Beatty WL, Russell DG: Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages. *Infect Immun.* 2000 ; 68 : 6997-7002.
  - 18) McKinney JD, zu Bentrup KH, Munoz-Elias EJ, et al.: Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature.* 2000 ; 406 : 735-738.
  - 19) Kaku T, Kawamura I, Uchiyama R, et al.: RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 ; 274 : 189-195.
  - 20) Uchiyama R, Kawamura I, Fujimura T, et al.: Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2007 ; 75 : 2894-2902.

## 5. BCG ワクチンの分子特性と今後の課題

日本 BCG 研究所 関 昌明, 本田 育郎, 藤田 勲  
矢野 郁也, 山本 三郎, 小山 明

*Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) は結核予防のための唯一の弱毒化生菌ワクチンである。パスツール研究所の Calmette と Guérin によって牛から分離された毒力の強い結核菌 *Nocard* 株を 1908 年から 1921 年にかけて 230 代継代することにより得られた。1924 年からは世界各国に分与されて独自の亜株となり今日に至っている。現在ワクチンの製造に用いられている主な BCG 亜株は、Danish 株, Glaxo 株, Pasteur 株, Moreau 株, Japan 株および Russia 株である<sup>1)</sup>。

BCG ワクチンは BCG 亜株間で異なったコロニー形態

を示し、さらには同一の亜株内にも異なるものが複数存在することは以前から知られていたが<sup>2)~4)</sup>、コロニー形態以外にも生菌数<sup>1)</sup>、抗原タンパク質 (MPB 64, MPB 70 等) の産生 (量)<sup>5)</sup> およびメトキシニコル酸の合成に関与する遺伝子 (*mma3*) の点突然変異<sup>6)</sup> の有無等に違いがある。

結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv の全ゲノム塩基配列が解読されると<sup>7)</sup>、BCG と *M. tuberculosis* H37Rv のゲノムの違いを調べるための研究が開始された。その結果、*M. tuberculosis* と比較して BCG には全部で 16 カ所の RD (も

ともとは欠損領域：deletion regionの略，現在では異なった領域：region of differenceの略として用いられることが多い）が存在することが明らかになったが<sup>9)</sup>，この数はその後増加している<sup>10)</sup>。また，タンDEM複製に関する違いがあることも分ってきた<sup>11)</sup>。

### BCGの初期分与株と後期分与株

Fig.にBCG各亜株の由来について示す<sup>9)10)</sup>。1908年から1921年にかけて230代継代培養されたが，BCGが結核ワクチンとして確立される過程で，RD1の欠損が起こり，このことがBCGの弱毒化に一部関与していると考えられている<sup>12)</sup>。1924年から1925年にかけて，現在のRussia, Japan, Brazil (Moreau)の元株が分与された。これらの株にはそれぞれ欠損した領域がある。Japan株にはRD16に含まれる6個の遺伝子のうちRv4305cの一部(22bp)が欠損しているもの(I型)と欠損していないもの(II型)の2種類が存在し，前者が多数を占めている<sup>13)</sup>。Russia株にも2個の遺伝子に関連する特徴的な欠損領域がある<sup>10)</sup>。これらの株はIS6110のコピーを2個もっている<sup>14)</sup>が，1926年と1927年の分与に由来する，Birkhaug株とSweden株にはIS6110が1個しかない<sup>9)</sup>。従って，1925年から1926年の間にIS6110が1個欠損したと考えられる。また，1931年以降に分与されたすべての株からはRD2が欠損しており<sup>9)</sup>，この欠損は1927

年から1931年の間に生じたと考えられる。これらの遺伝的な欠損のパターンは1931年を境に大きく2種に分類されることから，それ以前の分与に由来する株は初期分与株(early strains)，その後のものは後期分与株(late strains)と呼ばれている<sup>9)</sup>(Fig.)。

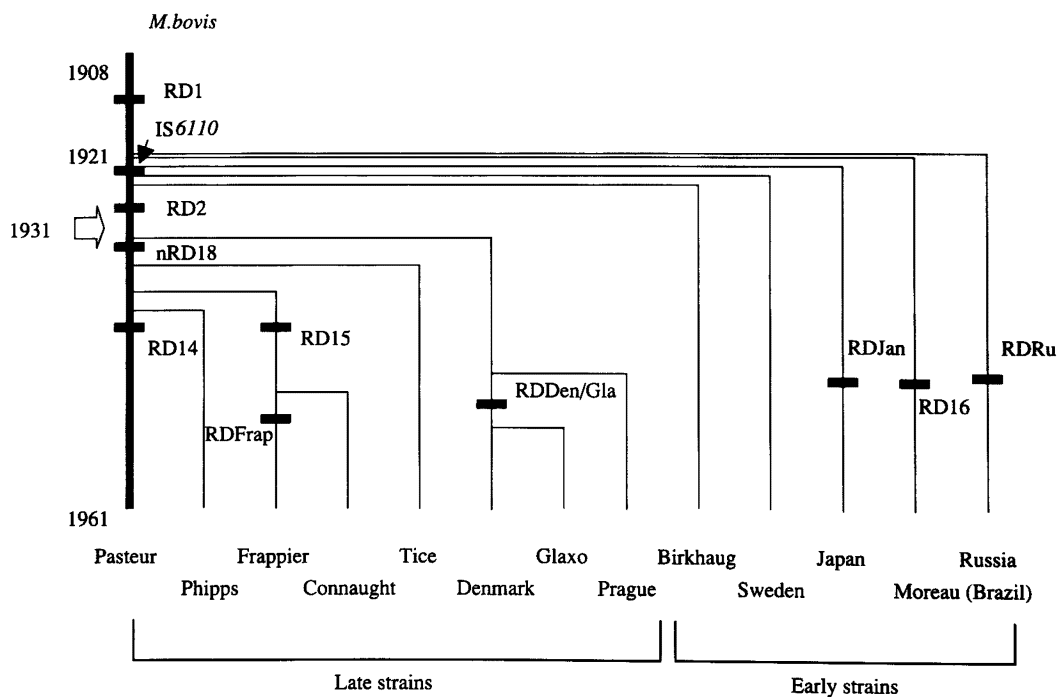
### サブポピュレーション

BCG亜株にはこれらの欠損による変異に加えてタンDEM複製DU2の変異があり，Japan株でのI型およびII型と同様に同一亜株内でサブポピュレーションを形成している<sup>13)15)</sup>。

#### (1) タンDEM複製DU2

タンDEM複製DU2はすべてのBCG亜株に存在するが，複製の生じた位置の違いにより，4種(I~IV)に分けられる<sup>15)</sup>(Table)。この領域には，グリセロールの代謝に必要なglpD2遺伝子が含まれているが，BCGは炭素源としてグリセロールをよく利用し，これを含む培地で継代されてきたので，この遺伝子が複製されたことで増殖に有利になった可能性が考えられている<sup>15)</sup>。

Pasteur株とDanish株にはタンDEM複製DU2のコピー数が2と3の2種類が認められ，コピー数が増加する傾向があることが示唆された<sup>15)</sup>。このコピー数の変動がワクチンの効果にどのような影響を及ぼすかは，今のところ不明である。



(Behr et al., 1999 ; Mostowy et al., Vaccine. 2003)

Fig. Historical phylogeny and deletion regions among BCG substrains

Vertical axis indicates distribution time.

**Table** Copy number and length of duplicated regions in four DU2 groups in BCG substrains

Group	BCG substrains	Copy number	Length (about)	Year obtained
DU2-I	Russia	3	40-kbp	1924
	Japan	3	40-kbp	1924
	Moreau	2	20-kbp	1925
DU2-II	Sweden	2 or 3	75 or 150-kbp	1926
	Birkhaug	2 or 3	75 or 150-kbp	1927
DU2-III	Danish 1331	2 or 3	80 or 160-kbp	1931
	Danish 1513	3	160-kbp	1931
DU2-IV	Pasteur	2 or 3	36-kbp or 72-kbp	1961

## (2) Japan株に存在するI型, II型

Japan株にコロニー形態が異なったものが存在することは以前から知られていたが、これまで、コロニー形態と遺伝子の関連性については知られていなかった。最近、このコロニー形態と、遺伝子型(I型, II型)との間に、強い関連性があることが明らかになった<sup>13)</sup>。

Japan株を用いた日本のワクチンは、他の国のワクチンと比較して、重量当りの生菌数が多く、熱に安定である等の性質を有しているが、日本のワクチンの性質をより理解するためには、I型BCGとII型BCGの違いについてさらに詳細な検討をする必要がある。

### BCG Pasteur株の全ゲノム解読によるBCG亜株間の詳細な遺伝的違いの解明

2007年にはBCG Pasteur株の全塩基配列が解読された<sup>15)</sup>。その結果初期に分与された株は、後期に分与された株よりも遺伝的な変異が少ないことがさらに明らかとなった。

*Crp*はRv3676によってコードされる転写制御遺伝子であるが、初期分与株と比較して後期分与株でSNPが2個になっており、後期分与株において機能を喪失していると考えられている<sup>16)</sup>。転写開始因子である*sigK*遺伝子は、抗原タンパク質MPB70とMPB83の発現に関与している<sup>17)</sup>が、この遺伝子のスタートコドンが後期分与株ではSNPによってメチオニンからイソロイシンに置換している。このため、これらの抗原の発現量が低くなっていると考えられる。

後期分与株ではRD2が欠損しているが、この領域には制御因子をコードするRv1985c遺伝子、抗原タンパク質であるMPB64をコードする遺伝子等が含まれているため、これらの機能は失われている。

Pasteur株で欠損しているRD14には11個の遺伝子が含まれているが、この中には転写を制御するRv1773遺伝子が存在する。

後期分与株では初期株と比べてIS6110が1個欠損しているが、この遺伝子の上流には結核菌で毒力に関連し

ている2遺伝子*phoP-phoR*がある<sup>18)</sup>。このIS6110の欠損が*phoP*遺伝子の発現に影響しており、Japan株と比較してPasteur株ではこの遺伝子の発現量が低下している<sup>15)</sup>。また、Danish株とGlaxo株では*phoR*遺伝子に10bpの欠損があり、この遺伝子の機能に影響があると考えられている<sup>15)</sup>。

このように、初期に分与されたBCG亜株に比べて後期に分与されたBCG亜株では、発現や制御に関する遺伝子に多くの変異が生じており、また、DU2領域のコピー数にも変動がみられる。

これらの遺伝的性質の違いと南アフリカで行われた臨床試験の結果<sup>19)</sup>等から、初期に分与された株のほうが後期に分与された株よりもワクチンとしての効果が高いのではないかと推測されている<sup>15)</sup>。

### 今後の課題

Japan株に存在するI型とII型の微生物学的な違い、Japan株と他のBCG亜株との遺伝的違いに基づいた詳細な検討を行う必要がある。

初期分与株のほうが後期分与株よりも遺伝的な変異が少ないために、ワクチンとしての効果が高いという仮説を証明するためには、初期分与株のゲノムの全塩基配列を決定し、後期分与株であるPasteur株の配列との比較によるより詳細な解析を行うことが必要である。現在われわれはこのための作業をJapan株について行っている。この結果に基づいた、より詳細なBCG亜株間のワクチン効果の違い等を比較検討する必要がある。

また、BCGワクチンの品質に対する信頼性をより高めるためには、製造中の遺伝的安定性を調べる検査方法の開発と確立が必要である。

### 文 献

- 1) Fine PM, Carneiro IM, Milstein JB, et al.: Issues relating to the use of BCG in immunization programmes — a discussion document. WHO/V&B/99.23 (WHO, Geneva), 1999.
- 2) Petroff SA, Branch A, Steenken W Jr: A study of Bacillus



- Calmette-Guérin (BCG). *Am Rev Tuberc.* 1929 ; 19 : 9-46.
- 3) Behner DM: The stability of the colony morphology and pathogenicity of BCG. *Am Rev Tuberc.* 1935 ; 31 : 174-202.
  - 4) Osborn TW: Changes in BCG strains. *Tuberc.* 1983 ; 64 : 1-13.
  - 5) Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, et al.: Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1986 ; 52 : 293-302.
  - 6) Behr MA, Schroeder BG, Brinkman JN, et al.: A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J Bacteriol.* 2000 ; 182 : 3394-3399.
  - 7) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998 ; 393 : 537-544.
  - 8) Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al.: Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science.* 1999 ; 284 : 1520-1523.
  - 9) Behr MA, Small PM: A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine.* 1999 ; 17 : 915-922.
  - 10) Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, et al.: The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine.* 2003 ; 21 : 4270-4274.
  - 11) Brosch R, Gordon SV, Buchrieser C, et al.: Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Yeast.* 2000 ; 17 : 111-123.
  - 12) Pym AS, Brodin P, Brosch R, et al.: Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol.* 2002 ; 46 : 709-717.
  - 13) Honda I, Seki M, Ikeda N, et al.: Identification of two subpopulations of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) Tokyo 172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine.* 2006 ; 24 : 4969-4974.
  - 14) Fomukong NG, Dale JW, Osborn TW, et al.: Use of gene probes based on the insertion sequence IS986 to differentiate between BCG vaccine strains. *J Appl Microbiol.* 1992 ; 72 : 126-133.
  - 15) Brosch R, Gordon SV, Garnier T, et al.: Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *PNAS.* 2007 ; 104 : 5596-5601.
  - 16) Spredbury CL, Pallen MJ, Overton T, et al.: Point mutations in DNA- and cNMP-binding domains of the homologue of the cAMP receptor protein (CRP) in *Mycobacterium bovis* BCG: implications for the inactivation of a global regulator and strain attenuation. *Microbiol.* 2005 ; 151 : 547-556.
  - 17) Charlet D, Mostowy S, Alexander D, et al.: Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in *sigK*. *Mol Microbiol.* 2005 ; 56 : 1302-1313.
  - 18) Pérez E, Samper S, Bordas Y, et al.: An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol.* 2001 ; 41 : 179-187.
  - 19) Davids V, Hanekom WA, Mansoor N, et al.: The effect of Bacille Calmette-Guérin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. *J Infect Dis.* 2006 ; 193 : 531-536.

## The 83rd Annual Meeting Symposium

## THE FRONTLINE OF CLINICAL MYCOBACTERIOLOGY

Chairpersons: <sup>1</sup>Arisu KAMADA and <sup>2</sup>Satoshi MITARAI

**Abstract** The symposium was designed to review the mycobacterial infections from the viewpoint of clinical practices, and was composed of five presentations covering both basic and clinical aspects.

Firstly, Dr. Kawamura explained the topic of pathological interrelation of *M. tuberculosis* and host cell, for the pathogen to survive in the host. The bacterium inhibits the fusion of phagosomes with lysosomes through secretion of some bacterial components and modulation of host cell intracellular signaling pathways. Dr. Okusu showed the usefulness of rapid mycobacterium identification system by the detection of some house-keeping gene by nucleic amplification method. Dr. Nakasone explained the current methodologies of drug susceptibility testing for *M. tuberculosis* and clarified the different meaning of proportion method and ordinary susceptibility testing for general bacteria. He also emphasized the importance of clonality of tested mycobacteria for the correct interpretation of test result. Therapeutic drug monitoring will be clinically important considering the appropriate and individual treatment of *M. tuberculosis* infection. In Dr. Hanada's presentation, the effect of dosage regimen of pyrazinamide on the efficacy and adverse events, and clinical significance of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics were discussed. Intervention of clinical pharmacology concept should be applied to pharmacotherapy of tuberculosis in order to confirm drug compliance, adjust dosage regimen in each individuals, and avoid adverse drug reactions. Finally, Dr. Seki described the detail of genetic differences among BCG sub-strains and emphasized the importance of their differentiation and confirmation of genetic stability as vaccine. He also suggested that early BCG vaccines might even be superior to the later ones.

The contents of five presentations are basically independent, but they are related to each other in the clinical practices. The symposium may provide comprehensive idea to understand the current and future clinical strategy against tuberculosis.

1. Pharmacotherapy of tuberculosis and therapeutic drug monitoring: Kazuhiko HANADA, Hiroyasu OGATA (Department of Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics, Meiji Pharmaceutical University)

Selection of appropriate drugs, adjustment of dose and dosage regimen, and completion of their regimen without discontinuation are very important for a successful tuberculosis pharmacotherapy. In general, efficacy and adverse reactions of drugs were determined by both pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) factors. It is possible to determine rational individual dosing regimen by characterizing the inter-

and intra-patient variation of PK/PD relationship. Intervention of clinical pharmacology concept should be applied to pharmacotherapy of tuberculosis in order to confirm drug compliance, adjust dosage regimen in each individuals, and avoid adverse drug reactions. In this presentation, effect of dosage regimen of pyrazinamide on the efficacy and adverse events, and clinical significance of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics were discussed.

2. Molecular diagnostics in mycobacterial infections: Kiyofumi OHKUSU, Takayuki EZAKI (Department of Microbiology, Gifu University Graduate School of Medicine)

In recent years, molecular microbiology techniques have been proven to be useful supplement to conventional assays not only to characterize organisms from culture, but also to directly detect pathogens from clinical samples. PCR-based sequencing has become the gold standard for identification of mycobacterial species. The target most commonly used is the gene coding for the 16S rRNA. Although 16S rRNA gene sequences may be employed successfully to identify many mycobacterial species, they lack sufficient discrimination to differentiate certain isolates from some species (e.g., *M. kansasii* and *M. gastri*, *M. marinum* and *M. ulcerans*). In these circumstances, sequence analysis of housekeeping genes such as *rpoB*, *hsp65*, and *dnaJ*, in addition to the 16S rRNA gene increases the robustness and power of discrimination to provide a more accurate identification. When culture results remain negative despite high clinical suspicion for infection, broad-range PCR and DNA sequencing can be extremely useful. In addition, some pathogens may not be difficult to cultivate but may require special media, growth conditions, or lengthy incubation. Therefore molecular detection and identification should be considered to isolate these organisms, notably in settings where bacteria were microscopically visible in clinical samples but had not been cultured. This review is intended to explore the application of molecular diagnostic techniques for mycobacterial infections in certain clinical contexts. Finally, we should put emphasis on the point that close collaboration between physician and clinical microbiologist is required in all cases where molecular diagnostics is contemplated because assays need to be individualized according to the clinical setting.

3. Problem of the Mycobacteria sensitivity test: Isamu NAKASONE (Clinical Laboratories, University Hospital of the Ryukyus)

The laboratory test method of growth bacteria or concentrated directly inoculum, antimicrobial sensitivity test of the

rapid result report. In this method it is inoculated, when a sensitivity and resistance bacteria was mixed, a sensitivity record becomes a resistance. It is a resistance proportion in the growth group, and it doesn't mean the resistance of the bacteria strain as of the resistance the *Mycobacteria*. The standard methods of non-tuberculosis can't get the interchangeability of the data because how to examine it isn't presented. With the recommended quality control strain, there is a limit in control of quality of the one concentration method. Then, the obtainment of the quality control strains is in the difficult conditions.

4. Advances in understanding of the virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*: Ikuo KAWAMURA (Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine)

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is an intracellular pathogen that has evolved strategies to enable growth in macrophages. The bacterium is able to inhibit fusion of phagosomes with lysosomes through secretion of some bacterial components and modulation of host cell intracellular signaling pathways. Furthermore, it has been shown that phagositosed MTB is killed within macrophages after treatment with IFN- $\gamma$  *in vitro*. However, virulent MTB is capable of surviving in macrophages *in vivo* and persists in host even after acquired immunity has developed. These data suggest that MTB has developed a sophisticated immune evasion mechanism. In this issue, the strategies of MTB for intracellular survival and immune evasion, which have been unraveled so far are shown and the mechanisms are discussed.

5. Molecular characterization of BCG strains for vaccine

production and future considerations: Masaaki SEKI, Ikuro HONDA, Isao FUJITA, Ikuya YANO, Saburo YAMAMOTO, Akira KOYAMA (Japan BCG Laboratory)

In addition to the difference of colony morphology among BCG substrains, the difference of copy number of IS6110 and production of antigenic proteins were also known. Furthermore, many genetic differences among BCG substrains have become clearer by comparative genomic studies. Also, it has been known that BCG substrains consist of subpopulations with different genotypes. Therefore, it is necessary to develop methods for differentiation of BCG substrains and confirmation of genetic stability during vaccine production.

The complete genome sequence of BCG Pasteur was determined, and the authors suggested that early BCG vaccines may even be superior to the later ones.

**Key words:** Therapeutic drug monitoring, Genetic examination, Drug susceptibility testing, Intracellular infection, BCG

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Sapporo Minami National Hospital, <sup>2</sup>Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Satoshi Mitarai, Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.  
(E-mail: mitarai@jata.or.jp)