

多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関する研究

所 属 国立国際医療センター研究所
感染・熱帯病研究部
研究者 切替 照雄

分担研究者

- | | |
|------------------------|-------|
| (1) ニッポンテクノクラスタ (株) | 何 媛 |
| (2) 生化学工業(株)中央研究所 | 田中 重則 |
| (3) 三菱化学ビーシーエル・東海大学医学部 | 小林 寅喆 |

要 旨

最新のゲノム情報解析技術を用い感染症分野におけるポストゲノム創薬技術の応用開発を行なう。ゲノム情報解析技術を駆使して多剤耐性結核の診断法の開発を行なう。具体的には、1) 全国市中病院を対象にした抗酸菌分離及び薬剤耐性の実態調査、2)ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法を開発、3)リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験の開発、4)結核ゲノム情報に基づく新しい疫学手法の開発、及び5) DNA チップによる PE タンパクファミリー遺伝子発現解析の5項目に関する研究を推進した。

1. 研究目的

多剤耐性結核菌の出現は、21世紀の医療にとって最も深刻な問題の一つである。多剤耐性結核は患者の治療を遅延させるばかりでなく、院内感染の原因ともなり、迅速な診断法の開発と新たな作用機序を持つ抗結核薬の開発が急務となっている。本研究では、ゲノム情報解析技術を駆使して多剤耐性結核の診断法を開発を行なう。幸い結核菌は全ゲノム配列が明らかにされており、またその薬剤耐性機構は比較的限定した遺伝子の変異であることが知られている。従って、多剤耐性遺伝子の迅速診断法の開発は大変有望な方法であると期待される。当センター病院とも共同で臨床応用を進め、本診断法の有用性を実証する。DNA チップを用いて新規の患者分離株を用いた迅速診断を試み、診察後少なくとも数日で判定が可能となった症例を報告できるようにする。具体的には、1)全国市中病院を対象にした抗酸菌分離及び薬剤耐性の実態調査、2)ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法を開発、3)リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験の開発、4)結核ゲノム情報に基づく新しい疫学手法の開発、及び5) DNA チップによる PE タンパクファミリー遺伝子発現解析の5項目を中心に研究を推進した。

2. 研究方法

1) 全国市中病院を対象にした抗酸菌分離及び薬剤耐性の実態調査：

a)分離同定：日本全国の各医療施設の協力を得て、抗酸菌感染症が疑われる患者より500以上の喀痰試料(同一患者を除く)収集し、迅速法であるMGIT法および従来法の小川法による培養を行った。検出した抗酸菌の同定はイムノクロマトグラフィ法のキャピリア TB を用い同時に核酸同定法であるアキュプロープにて行った。両法にて同定不可能だった抗酸菌についてはDNA-DNA hybridization法のDDHマイコバクテリアを用い追加同定を行った。

(1) 検体の前処理と各培地への接種：1ml以上得られた喀痰を2等分し用いた。一方は0.5%のNALCを含有する等量の4%NaOHで可溶化後、室温で2-3分間放置し、3%小川培地へ0.1mlを接種した。MGIT960専用チューブ(MGITチューブ)の調製は凍結乾燥されたPANTAを15mlのOADCで復元し、その0.8mlをMGITチューブに添加した。もう一方の喀痰を滅菌済のプラスチックチューブにとり、2倍量のNALC-NaOH溶液(0.5%NALC、2%NaOH、1.45%クエン酸ナトリウム)を添加し、キャップをしっかりと閉めて約15秒間チューブミキサーで攪拌し、室温で15分間放置した。放置の間、2-3回チューブミキサーで攪拌した。10倍容量の10mM-リン酸緩衝液(pH 6.8)を添加し、ふたをして2-3回転倒混和してから4℃

にて 3000×g で 20 分間遠心した。その沈渣を 1ml の同緩衝液に浮遊し、0.5ml を MGIT チューブに接種した。残り 0.5ml は MGIT960 の再検査用に -70℃ 以下で保存した。

(2) 培養と判定：小川法は 35℃ で培養を行い毎週 1 度観察を行いながら 8 週まで培養を行った。MGIT チューブは 6 週まで MGIT960 による観察を行った。

(3) MGIT960 培養陽性時の染色と contamination 時の処理：MGIT960 陽性の時点でチールネルゼン法により染色し、抗酸菌または contamination の有無を確認した。MGIT チューブ内に抗酸菌と雑菌を認めた場合はその時点で MGIT960 陽性と判定し、MGIT チューブから沈殿を採取し再度 NALC-NaOH 溶液処理後、滅菌生理食塩水で 2 回洗浄して新たな MGIT チューブに接種した。MGIT チューブ内に雑菌のみが認められた場合は保存検体を NALC-NaOH 溶液処理後、滅菌生理食塩水で 2 回洗浄して新たな MGIT チューブに接種した。

b) 薬剤感受性：検出した結核菌に対する薬剤感受性は、迅速液体希釈法である MGIT SIRE を主として我が国の標準的な方法である小川培地をベースとしたビットスペクトル-SR 法、または NCCLS 標準法である proportion method にて測定を行った。試験薬剤は Streptomycin、Isoniazid、Rifampicin、Ethambutol の 4 薬剤で、各方法によって濃度を定めた。

(1) MGIT960 SIRE：菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し、McFarland No. 0.5 の菌液を調製後、同液にて 5 倍希釈したものを被検菌液とした。これをさらに 100 倍希釈し、MGIT SIRE 発育陽性対照チューブおよび各試験薬剤チューブに 0.5ml 添加した。これら 5 本のチューブを MGIT 960 にセットし、自動培養、判定を行った。

(2) ビットスペクトル-SR：前記同様に菌体を処理し、McFarland No. 1 に調製した菌液を納書に従い接種し、培養後判定を行った。判定は培養後 7, 10, 14 日目に行い、発育陽性対照ウエルに十分な菌の発育が認められた時点で最終判定とした。

(3) Proportion method：所定濃度となるよう抗結核菌薬を含有させた 10% OADC 添加 Middlebrook 7H10 を作製した。小川培地上の培養 4~5 週以内の新鮮は集落をかきとり、Middlebrook 7H9 に懸濁し、McFarland No. 1 の菌液を作製した。この菌液を同 broth で 10^2 , 10^4 倍希釈し、接種菌液とした。接種用菌液 100 μ l を薬剤不含および含有培地に滴下し、コンラージ棒にてまんべんなく塗り広げた。接種後の各培地は 10% CO₂、37℃、遮光条件下で最長 3 週間まで培養を行い観察した。

2) ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法を開発：

日本全国及びポーランドの医療施設から分離された結核菌または患者喀痰を J. BEIGE らの方法 (J. Clin. Microbiol., 33: 90-95, 1995) に従って前処理し DNA 抽出した。

(1) PCR：8 本の PCR チューブを用いて、上記の方法にて抽出した DNA を鋳型とし、PCR による薬剤耐性遺伝子を増幅した。組成は以下の通りである。鋳型 DNA 1.0 μ l、Z-Taq ポリメラーゼ 1.25U (宝バイオ)、dNTP 200 μ l (宝バイオ)、耐性遺伝子に特異な 8 組のプライマーペアをそれぞれ 200nM ずつ、さらに 10×Z taq Buffer 5 μ l (宝バイオ) を加え、滅菌蒸留水にて全量を 50 μ l とした。これらを geneAmp PCR SYSTEM 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、全て同じコンディションで増幅した。用いたプライマーは、Rifampicin 耐性遺伝子 (*rpoB*: 1199CCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCA1226、1903CGTCGCCGGCGTCGATCGC CGCG 1880)、Isoniazide 耐性遺伝子 (*katG*: 1GTGCCCAGCAACACCCACCCATTACAGAAAC28、2223TCAGCGCAGCTCGAACCTGTCGAG2200; *mab-inhA*: -217ACATACCTGCTGCGCAATTC-198、1145GCATACG AATACGCCGAGAT1126)、Ethambutol 耐性遺伝子 (*embB*: 646 ACGCTGAAACTGCTGGCAAT665、3382GTGCATACCGAGC AGCATAG3363)、Pyrazinamide 耐性遺伝子 (*pncA*: -80GGCGTCATGGACCCTATATC-61、590CAACAGTTCATCCCGGTT C572)、Kanamycin 耐性遺伝子 (*rpsL*: 4CCAACCATCCAGCAGCTGGT23、575GTCGAGAGCCCGCTTGAGGG 556)、Streptomycin 耐性遺伝子 (*rrs*: 428AAACCTCTTTCACCATCGAC447、1756GTATCCATTGATGCTCGCAA1737)、Fluoroquinolones 耐性遺伝子 (*gyrA*: -1GATGACAGACACGACGTTGC19、397 GGGCTTCGGTGTACCTCAT 379) であった。コンディションは、変性 95℃ 1 秒、アニーリング及び伸長反応 68℃ 30 秒、これを 30 サイクル繰り返した。PCR 産物はそれぞれ MicroSpin™ Columns (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。

(2)塩基配列の決定：シーケンス反応は、BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Inc.,)を用いたダイターミネーター法にて行った。組成は以下の通りである。プレミックス[5× Sequencing Buffer 4μl、dNTP mix 1μl、DyeDeoxy Terminators 0.5μl、AmpliTaq,FS 4μl；合計 8 μl (Applied Biosystems, Inc.,)]、それぞれ 1μl の PCR 産物、別表 2 に示したそれらの耐性遺伝子の塩基配列決定に適したプライマー 3.2 pmol を加え、滅菌蒸留水にて全量を 20μl とした。

増幅反応後、未反応 Dye 及び過剰プライマーの除去には、Centri-sep spin columns (Applied Biosystems, Inc.,)を用いた。次いで、これらを遠心・乾燥させ、さらに loading buffer 15μl を加え、95℃ 2 分加熱後、急冷し、96 ウェルプレートに入れ、16 本キャピラリー式 ABI 3100 オートシーケンサーを用いて泳動した。

(3)塩基配列の解析：塩基配列の解析及び編集は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer software を用い、これらを既知の薬剤感受性 *M.tuberculosis* H37Rv 株の塩基配列と比較することにより、変異の有無を解析した。

3) リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験の開発：

(1)結核菌：*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) H37Rv (ATCC 27294) 株または臨床分離株をマイコプロス（極東製薬）にて 37℃ で培養した。簡易濁度計 Vi-spec（極東製薬）で測定した濁度が 0.45 になったときに、ここから 100 マイクロリットルをとって新しいチューブに加えることで継代培養した。

(2)菌液の調整：マイコプロスで発育させた *M. tuberculosis* H37Rv 株または臨床分離株を簡易濁度計 Vi-spec（極東製薬）で吸光度 0.11 になるようにマイコプロス培養液を用いて調整した。この菌液は、 $2-3 \times 10^7$ CFU/ml の濃度になる。これを 10 倍段階希釈したものから各 1 ミリリットルをチューブにとり、15000 回転で 15 分間遠心して、上清を吸引除去する。

(3)DNA の抽出：上清を除去したチューブに、1 チューブあたり Chelex Resin (Bio-Rad 社) 5% 水溶液を 100 マイクロリットル加える。ミキサーで攪拌後、45℃ で 45 分間、100℃ で 5 分間加熱し、15000 回転で 5 分間遠心する。上清を回収し、-20℃ で保存する。

(4)リアルタイム PCR：16S リボソーム RNA の結核菌特異的遺伝子を標的として設計されたプライマー (TB-16sF、TB-16sR) を使用した。プライマー配列は、5'-ctcagcgcttaactgtgagcg (TB-16sF) 及び 5'-cgcattccaccgctacacc (TB-16sR) である。

(5)PCR 反応液組成：1× SYBR green Master Mix (Qiagen)、フォワードプライマー (TB-16sF) 0.5μM、リバープライマー (TB-16sR) 0.5μM、AmpErase (Uracil-N-glycosylase (UNG)) (Applied Biosystems 社) 0.5μM、Genomic DNA。PCR 反応条件は、UNG：50℃、2 min；Initial PCR activation step：95℃、15 min；4-step cycling (45 cycles)、Denaturation：94℃、15 sec；Annealing：58℃、30 sec；Extension：72℃、30 sec；Data collecting：81℃、5 sec；Melting curve analysis：Hold (78℃、5 min)、Melt (78~92℃)。

(6)薬剤感受性試験：菌液は、マイコプロスで発育させた *M. tuberculosis* H37Rv 株を簡易濁度計 Vi-spec（極東製薬社）で吸光度 0.11 になるようにマイコプロス培養液を用いて調整した。この菌液は、 $2-3 \times 10^7$ CFU/ml の濃度になる。この菌液の 100 倍希釈液を 1 チューブあたり 100 μl 加え、 10^4 CFU/ml / チューブで培養した。リファンピシン 0.5、5 μg / ml、イソニアジド 1.0、4 μg / ml、エタンブトール 20、10 μg / ml の濃度に、OADC Enrichment (Becton Dickinson) 10% 添加 BBL™ ミドルブルック 7H9 broth (DIFCO) で調整し、500 μl を 1.5ml のチューブに分注する。400 μl の OADC 10% 加 7H9 プロスをさらに加えて、別に OADC 10% 加 7H9 プロス 900 μl のみのチューブも用意しておく。それぞれのチューブに菌液を 100 μl 加え、総量を 1ml とする。このチューブを 37℃ のインキュベーターで 2 日、3 日、5 日、7 日間培養する。培養後、培養チューブを 15000 回転で 15 分間遠心する。上清をピペットで吸引、除去し、チューブあたり 5% 水溶液 Chelex Resin (Bio-Rad) を 100 μl 加える。ミキサーで攪拌後、45℃ で 45 分間、100℃ で 5 分間加熱し、15000 回転で 5 分間遠心する。上清を回収し、-20℃ で保存する。それぞれのサンプルから DNA を抽出し、結核菌増殖をリアルタイム PCR で検出した。

4) 結核ゲノム情報に基づく新しい疫学手法の開発：

(1)結核菌ゲノム DNA にみられるトリプレットリピート配列 (TRS) の検索：マイクロサテライトの一種

トリプレットリピート配列(TRS)は、ヒトでの神経変性疾患の原因である。本研究では、全ゲノム情報がわかっている *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CDC1551 及び *M. leprae* を始めとする 20 菌種 26 株に関して、ゲノム上の TRS の存在を調査した。TRS として可能性のある 10 配列(即ち CGG、GTC、GTG、CTG、AAG、GTT、CCT、GTA、GAT 及び TTA)で 5 回以上の繰返し配列を BLASTN アルゴリズムを用いて検索した。

(2)結核菌群、非結核性抗酸菌および臨床分離株：結核菌群 (*M. tuberculosis* H37Rv、*M. bovis* BCG など)、および非結核性抗酸菌 (*M. kansasii*、*M. avium* など)は国立国際医療センター研究所感染・熱帯病研究部で保存されている株を用いた。

臨床分離株は、当センター(IMCJ 株)および、ポーランド結核研究所(Poland 株)にて結核患者より分離されたもの 85 株を使用した。これらすべての菌株はそれぞれ小川培地にて 2-3 週間培養後、RFLP 分析に用いられた。

(3)DNA の抽出：菌を培地より掻き取り、TE バッファー 400 μ l に懸濁後、80 $^{\circ}$ C、20 分間加熱することで殺菌し、その後 10 mg/ml リゾチーム溶液 50 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C、一晩インキュベーションすることで溶菌した。以上の溶菌液に 10 mg/ml プロテイナーゼ K 溶液 5 μ l および 10% SDS 溶液 70 μ l を加え、65 $^{\circ}$ C にて 10 分間インキュベーションした。その後、あらかじめ 65 $^{\circ}$ C に温めておいた cetyltrimethyl ammonium bromide 溶液および 5 M 塩化ナトリウム液を 100 μ l ずつ加え、65 $^{\circ}$ C にて 10 分間インキュベーションした後 chloroform-isoamyl alcohol 24:1 液を 750 μ l 加え、12,000 rpm、5 分間遠心し、その上清を回収した。回収した DNA 浮遊液にイソプロパノール 450 μ l 加えることにより DNA を沈澱させ、-20 $^{\circ}$ C にて一晩保存した後、12,000 rpm、30 分間遠心し、ゲノム DNA を得た。さらに 80 %エタノール溶液にて DNA を洗浄した後、乾燥し、TE バッファーを 10 倍に希釈したもので DNA を溶解し、使用するまで -20 $^{\circ}$ C で保存した。抽出した DNA の濃度は吸光光度計にて測定した。

(4)IS6110 による RFLP 分析：抽出した DNA 5 μ g を制限酵素 PvuII 5 U、37 $^{\circ}$ C、一晩消化し、消化したサンプルを 1 %アガロースゲルにて 15 V、20 時間泳動した。分子量マーカーは 1kb DNA ラダーと HindIII マーカーを用いた。IS6110 は、*M. bovis* BCG DNA の PCR 産物を用いた。PCR の際に用いたプライマーは INS-N1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC)および INS-N2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGAC AAA)であり、増幅産物は 245 bp であった。

(5) (CGG)₅ による RFLP 分析：抽出した DNA 5 μ g を制限酵素 AluI 5 U、37 $^{\circ}$ C、一晩消化し、消化したサンプルを 1 %アガロースゲルにて 15 V、20 時間泳動した。分子量マーカーは上記と同様のものを用いた。(CGG)₅ は合成したオリゴヌクレオチドを使用した。

(6)サザンハイブリダイゼーション：それぞれの DNA 消化サンプルを泳動後、ゲルをナイロン膜に転写し、UV にて固定後、サザンハイブリダイゼーションに供した。プローブの西洋ワサビペルオキナーゼ標識は ECL キット(Amersham Biosciences)を用いた。ハイブリダイゼーションは 42 $^{\circ}$ C、一晩行い、プロットを洗浄後、前述の ECL キットを用いて X 線フィルム上でバンドを検出した。

(7)DNA タイピング：Molecular analysis software fingerprinting plus version 1.0, Bio-Rad 社を用いて解析した。

5) DNA チップによる PE タンパクファミリー遺伝子発現解析：

(1)発現解析用 DNA チップの作成：PE タンパクファミリー (PE family gene:38 個、PE-PGRS family gene: 61 個) および PPE タンパクファミリー (70 個) の発現解析用 DNA チップのデザインを行った。つまり、それぞれの ORF に特異的な配列の検出は、ダブル法を用いて行い、最終的に 30 mer のオリゴヌクレオチドでの DNA チップを作成するに至った。以上 169 個の特異的な 30 mer の配列は、GC 含有量が 66.7-76.7%となるように設計された。

このうち、予備実験として TRS の(CGG)₅ が含まれる ORF 20 個 (表 1) について、DNA チップを作成した。スライドガラス上の配置は図 1 に示した。陽性コントロールとして結核菌の 16s リボソーム RNA 遺伝子を用いた。

(2)結核菌 RNA 抽出：結核菌は 7H9 メディウムに OADC を 10 %加えた液体培地 200 ml で、一つは 1 週間、もう一方は 2 週間振とう培養された。3000 rpm にて 20 分遠心し、菌ペレットを得た。菌ペレットから BIO-101 Systems 社の FastRNA Kit, Blue を用いて RNA を抽出し、RNase free 水に溶解後、使用するまで -80 $^{\circ}$ C に保存した。

(3) Cy-dye 標識 cDNA の作成：抽出した RNA を、Amresham Bioscience の CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit を用いて Cy-3 および Cy5 標識した。1 週間培養した結核菌の cDNA は Cy-3 にて、2 週間培養した結核菌の cDNA は Cy5 にて標識した

(4) ハイブリダイゼーション：Cy-3 および Cy5 標識 cDNA を乾燥後、それぞれ 8.5 μ l のホルムアミドにて溶解し、65°C で 5 分間インキュベーションした。その後プレハイブリダイゼーション液（10XSSC、0.02% SDS、1 ng/ml PolyA-DNA）12.5 μ l および DDW 4 μ l を加え、65°C で 15 分間インキュベーションした後、Cy-3 および Cy5 標識 cDNA を混和した。上記に示した発現解析用 DNA チップにカバーガラスを置き、その空隙に cDNA 混和液を注入し、チャンバーに設置した後に 55°C で一晩ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、1XSSC 液（室温、1 分間）、0.2XSSC 液（55°C、15 分間）、0.1XSSC 液（室温、5 分間）、DDW の順にて DNA チップを洗浄後、乾燥し、GeneTAC, LSIV (Genomic Solutions) にて観察した。

3. 研究成果

1) 全国市中病院を対象にした抗酸菌分離及び薬剤耐性の実態調査：

(1) 臨床分離抗酸菌の検出と同定：全国から収集した合計 517 喀痰試料から分離された抗酸菌は 103 株でこれらは各種同定法によって *Mycobacterium tuberculosis* complex 52 株、*Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) 46 株に同定され、その他 5 株は同定不能な *Mycobacteria* であった。

ただし、この 5 株についてはナイアシンテストおよび DDH により *M. tuberculosis* complex ではない事を確認した。MGIT 法ならびに小川法による検出は MGIT 法が若干優れるものの大きな差はなかった。

(2) 抗結核薬感受性：臨床分離 *M. tuberculosis* complex 52 株の各種抗結核薬感受性を Table 2 に示した。MGIT 960 SIRE による各薬剤に対する感受性は SM に対して 47 株 (90.4%)、INH 45 株 (86.5%)、RFP 49 株 (94.2%)、EB 50 株 (96.2%) と EB に対し最も感受性であった。

一方耐性株は SM に対し 5 株 (9.6%)、INH 7 株 (13.5%)、RFP 3 株 (5.8%)、EB 2 株 (3.8%) で INH 耐性株が最も多く 10% を超えていた。他 2 法の感受性成績は Table 2 に示す通りで、MGIT 960 SIRE に比べ耐性株が若干検出しにくい傾向にあるものの MGIT 960 SIRE とビットスペクトル SR の一致率は 92.3% ~ 96.2%、Proportion method とは 94.2% ~ 100% と大差は認めなかった。これら耐性株のうち CDC が定める INH および RFP に対して同時に耐性を示す multi drug resistance (MDR) は 3 株 (5.8%) 存在した。

2) ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法を開発：

調べた臨床分離株 33 株中 19 株はすべての薬剤に感受性であったが、これらの株すべてで耐性遺伝子の変異は認められなかった。INH 耐性株 13 株中 10 株 (77%)、RFP 耐性株 9 株中 7 株 (78%)、PZA 耐性株 3 株中すべて (100%)、EMB 耐性株 3 株中すべて (100%) に耐性遺伝子の変異が認められた (表 3)。この解析に要する時間は、結核菌 DNA 抽出後から 6.5 時間であり、従来の薬剤感受性試験が 2 週間以上要したのに対して大幅に解析時間を短縮できた。また、本方法は遺伝子内の塩基置換 (変異) を特定できるので疫学情報としても使用できることがわかった。なお、RFP 耐性株で 1 株、INH 耐性株で 4 株、PZA 耐性株で 2 株、これまで報告のない新規の変異を同定した。

3) リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験の開発：

(1) 特異性の検討：結核菌群特異的検出用プライマー (TB-16sF/R) を用いた PCR 反応の特異性を検討する目的で、種々の抗酸菌の DNA を用いて PCR 反応を実施した。結核菌 (*M. tuberculosis* H37Rv)、及び抗酸菌 15 種 (*M. goodii*, *M. marinum*, *M. avium*, *M. szulgai*, *M. kansasii*, *M. nonchromogenicum*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. sacrofulaceum*, *M. terrae*, *M. gastri*, *M. preglum*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*) でプライマー (TB-16sF、TB-16sR) を用いた PCR で特定の大きさの PCR 産物が増幅された。しかし、*M. simiae* では増幅されなかった。を除く以下のまた、検討した 11 種の非抗酸菌 (*Haemophilis influenzae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* O157:H7) 全て、プライマー (TB-16sF、TB-16sR) では検出されなかった。また、公表されている塩基配列から、結核菌群全

5種(*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti*)について、検出することが可能であること、Primer 設計部位に *M.simiae* と同一配列を持つ *M.lentiflavum*, *M.genavense*, *M.heidelbergense*, *M.triplex* については PCR で非検出であることが推測された。

(2)感度の検討：リアルタイム PCR では、結核菌 H37Rv から抽出した DNA は 0.1ng~100µg/ml までの濃度範囲で定量できることがわかった(図2)。次に薬剤の存在、非存在下で結核菌を数日間培養し、リアルタイム PCR を用いてモニターした。10⁶ 個の結核菌をリファンピシン (8µg/ml) 添加または非添加し、2日、3日、4日、5日、7日及び14日間培養後、それぞれのサンプルから DNA を抽出し新たに設計されたプライマーを用いてリファンピシンの結核菌増殖抑制効果をリアルタイム PCR で検討した。10⁶ 個の結核菌をリファンピシン (8µg/ml) 添加または非添加し2日、3日、4日、5日、7日、14日間培養後、それぞれのサンプルから DNA を抽出し、リファンピシンの結核菌増殖抑制効果をリアルタイム PCR で検討した。その結果、3日目以降のサンプルについて薬剤添加の効果を検出可能であった(図3)。

4) 結核ゲノム情報に基づく新しい疫学手法の開発：

(1) 結核菌ゲノム DNA にみられるトリプレットリピート配列(TRS)の検索：マイクロサテライトの一種トリプレットリピート配列(TRS)は、ヒトでの神経変性疾患の原因である。結核を含む細菌に関する TRS に関する情報はわかっていない。本研究では、全ゲノム情報がわかっている *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CDC1551 及び *M. leprae* を始めとする 20 菌種 26 株に関して、ゲノム上の TRS の存在を調査した。TRS として可能性のある 10 配列(即ち CGG, GTC, GTG, CTG, AAG, GTT, CCT, GTA, GAT 及び TTA)で5回以上の繰返し配列を BLASTN アルゴリズムを用いて検索した。その結果の一部を表4に示す。*M. tuberculosis* H37Rv と *M. tuberculosis* CDC1551 の TRS は、ほぼ同じ頻度であったが、*M. leprae* では頻度や種類が *M. tuberculosis* とは大きく異なっていた。*M. tuberculosis* H37Rv では 34 個、*M. tuberculosis* CDC1551 では 37 個の TRS が存在した。一方、*M. leprae* は、わずかに 9 個の TRS があつた。*M. tuberculosis* の TRS は、その 80% が (CGG) のリピートであったが、*M. leprae* では、(CGG) リピート配列はなく (AAG) リピートがあつた。他の菌種と比較しても *M. tuberculosis* 以外 TRS が高頻度で出現している細菌はなかった。特に、*M. tuberculosis* で観察されるような 5 回以上の TRS (CGG) は DNA 中の GC 量から計算で予想される配列の確率の約 20 倍であり、結核菌に特異的な配列であると考えられる。また、これら TRS を含む遺伝子のほとんどは ORF 領域内に存在し、PE 及び PE_PGRS ファミリー

一とよばれるタンパク質をコードしていることがわかつた。

(2)結核菌群および非結核性抗酸菌ゲノムにおける(CGG)₅の分布：結核菌および非結核性抗酸菌(表)のゲノム上における(CGG)₅の分布を RFLP にて検索した。制限酵素は AluI を用いた。その結果、結核菌群である *M. tuberculosis* H37Rv とその弱毒株である *M. tuberculosis* H37Ra において、それぞれ 13 本づつその存在が認められた。しかしこの 2 株について、バンドパターンに違いは観察されなかつた。*M. bovis* BCG には 15 本確認された。非結核性抗酸菌である *M. marinum* では 15 本、*M. kansasii* では 14 本、*M. szulgai* では 13 本と(CGG)₅ が数多く存在していた。*M. gastri* では 6 本観察され、*M. nonchrogenicum* では 9 本、*M. peregrinum* には 4 本認められた。*M. simiae*, *M. intracellulare* には若干認められた。しかし、*M. avium*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* には認められなかつた(図1)。

(3)臨床分離株における RFLP：解析を行った臨床分離株 85 株は、IMCJ 株薬剤感受性菌 52 株、IMCJ 株薬剤耐性菌 12 株、Poland 株薬剤感受性菌 12 株、Poland 株薬剤耐性菌 9 株であつた。

IS6110 による結果を図2に示した。臨床分離菌のゲノム上には IS6110 は 0 から 15 コピー存在しており、ユニークな 83 パターンを示した。IMCJ 株薬剤感受性菌では IS6110 が 10 および 13 コピー存在する株がそれぞれ 19% (10 株/52 株)ずつ見られた。IMCJ 株薬剤耐性菌ではコピー数 9 本に 25% (3 株/12 株)、Poland 株薬剤感受性菌ではコピー数 9 本に 25% (3 株/12 株)、Poland 株薬剤耐性菌ではコピー数 7 本のものに 33% (3 株/9 株)集中していた。70%以上を相同とみなすと、IS6110 では 44 のクラスターに分類されたが、国別、薬剤に対する感受性など、詳細な分類はできなかつた。また、IMCJ 株薬剤耐性菌のある菌には、IS6110 が存在しなかつたため、この菌株についてはクラスターに分けることができなかった。

次に(CGCG)5における結果を図3に示した。(CGCG)5は臨床分離株のゲノム上に10から17個分布しており、82のユニークなパターンを示した。とくに(CGCG)5配列を14個含むものが最も多く、IMCJ株薬剤感受性菌のうち42%(22株/52株)、Poland株薬剤感受性菌では50%(6株/12株)、さらにPoland株薬剤耐性菌の67%(6株/9株)が保有していた。またIS6110が存在しなかったIMCJ株薬剤耐性菌1株についても、(CGCG)5が15個認められ、クラスター分析が可能となった。70%以上を相同とみなすと、(CGCG)5パターンでは10個のクラスターに分類された。IS6110コピー数が1本ということで同じクラスターを形成した3株についても、(CGCG)5による分析では異なるクラスターに分類された。またポーランド株の薬剤感受性菌および薬剤耐性菌については、それぞれがクラスターを形成する傾向が認められた。

5) DNAチップによるPEタンパクファミリー遺伝子発現解析:

ハイブリダイゼーションの結果、陽性コントロールである16sリボソームRNAおよびRv0872cに同程度のシグナルが観察された(図2)。しかしその他のスポットにはシグナルは観察されず、培養1週間目と2週間目の両方で発現していると考えられる遺伝子はRv0872cのみであると思われた。

4. 考 察

1) 全国市中病院を対象にした抗酸菌分離及び薬剤耐性の実態調査:

本研究で実施した、臨床分離抗酸菌の検出は、517喀痰試料から比較的多数の抗酸菌が得られた。全103株の抗酸菌のうち、*M. tuberculosis* complex 52株で約50%が結核菌である事が判明した。過去に我々が実施した同様な調査においては、*M. tuberculosis* complexの割合が70%と、今回の成績より若干高かった。一概には推測できないが、この理由として社会的環境の変化が挙げられる。すなわち、HIVやImmunocompromised hostの増加により、結核以外の非結核性抗酸菌症の増加が懸念される。また、平成13年の厚生労働省の結核発生动向調査では結核症は極めて緩やかな減少傾向にある事から非結核性抗酸菌症ともに実態としては増加していると考えられる。また、これら日本全体の罹患率は依然として人口10万人に対して27.9%で、欧米の約5倍もの高い値である。結核を含めた抗酸菌症の増加について、診断および治療のdelayが指摘されている。今回用いたMGITによる培養およびキャピリアTBまたはアキュプローブによる同定を行う事によって、平均12.5日で臨床試料から検出、同定を確定させる事ができ、従来から実施してきた小川法に比べ著しく診断期日が短縮され、有用である事が確認できた。

MGIT 960 SIRE すなわち液体培養法によって得られた*M. tuberculosis* complexの感受性においてINHを除く3薬剤に対して90%以上の感受性率を示した。特にEBに対する耐性株は2株3.8%と極めて少なかった。しかしINH耐性株は7株13.5%と比較的高率に存在した。全体的に耐性率はさほど高くはないが、今回収集した結核菌株は市中の診療所や病院における患者からの検体で、いわゆる社会的弱者と呼ばれている患者検体は多く含まれていない。樋口らの報告によれば特定の地域における耐性株の割合は高く、これらのコミュニティにおける伝播も指摘されている。従って、これらの耐性菌の分布には地域差があり、ある程度広い範囲でより多くの菌株に対して調査されなければ実態はつかめないと考える。

今回実施した結核菌の中で、INH、RFP両薬に耐性を示す多剤耐性結核(MDR)が3株(5.8%)に存在した。率こそ低いものの今後これらの動向には細心の注意が必要である。特に注目したい点として、今回RFPに耐性を示した株は3株で、これらは全てINHにも耐性であった事である。また、結果には示さなかったがRFP耐性の3株についてMICを測定した結果、RFPのMIC値は64 μ g/mL以上と高度耐性株であった。また、これらの耐性株は*rpo*遺伝子を保有していると推測され、これに加えINHに耐性を生じる何らかの機構を同時に獲得しているものと考えられる。これらRFP高度耐性株について注意していきたい点である。

2) ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法を開発:

本研究では、薬剤耐性遺伝子を網羅的にシーケンスする方法を開発した。この方法では解析に要する時間は、結核菌DNA抽出後から6.5時間であり、従来の薬剤感受性試験が2週間以上要したのに対して大幅に解析時間を短縮できた。また、本方法は遺伝子内の塩基置換(変異)を特定できるので

疫学情報としても使用できることがわかった。なお、RFP 耐性株で 1 株、INH 耐性株で 4 株、PZA 耐性株で 2 株、これまで報告のない新規の変異を同定した。現在、これら新規の変異を有する遺伝子の内、最も臨床上、重宝されている抗結核剤であるイソニアジド耐性に関連する遺伝子 *katG* をクローニングし、薬剤耐性との詳細な関連を調べている。既に、我々は、この遺伝子の大量発現系の構築に成功し、KatG 蛋白を調製した。そこで、この遺伝子内変異に基づくアミノ酸変異を有する KatG 蛋白を用いて、蛋白の生化学的特徴から、この特徴が薬剤耐性に関連するか否かの証明の為、In vitro によるアッセイ系を構築中であり、新規の遺伝子内変異（塩基置換）と薬剤耐性との関連が詳細になりつつある

3) リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験の開発：

本研究では、結核菌の迅速薬剤感受性試験法としてリアルタイム PCR を用いた方法を開発した。開発のポイントは、プライマーの設計にあった。従来の方法では、結核菌の分離から薬剤感受性の診断まで速くて 6 週間場合によって 2 ヶ月以上を要していた。それと比較すると、数日で薬剤感受性が判定できるようになる可能性が見えてきた。特異性の克服、DNA 抽出方法の改善など技術的などころも解決し感度・特異性ともに高い方法が開発できた。今後は、臨床応用を実施し、本方法の有効性を明らかにしてゆきたい。

4) 結核ゲノム情報に基づく新しい疫学手法の開発：

結核菌ゲノム DNA にみられるトリプレットリピート配列(TRS)の検索：マイクロサテライトの一種トリプレットリピート配列(TRS)は、ヒトでの神経変性疾患の原因である。結核を含む細菌に関する TRS に関する情報はわかっていなかった。本研究では、結核菌に特異的な配列である TRS (CGG) が多数存在することが明らかとなった。これら TRS を含む遺伝子のほとんどは ORF 領域内に存在し、PE 及び PE_PGRS ファミリーとよばれるタンパク質をコードしていることがわかった。PE 及び PE_PGRS ファミリーは結核のゲノム解析でその存在が明らかになってきた結核菌抗原で、最近では結核免疫及び結核による肉芽腫形成に関与している病原因子であろうとの報告もされている。また、細菌由来の CpG は TRL9 を介して宿主細胞を活性化することがわかってきた。今後は、PE 及び PE_PGRS ファミリーの産物もしくは遺伝子本体がどのように病原性に関与しているのか明らかしたい。

これまで結核菌の分子疫学にはトランスポゾンなどの挿入配列(Insert sequence; IS)が DNA マーカーとして使用されてきた。これには IS6110 のほかに IS1081 や IS myco などがあるが、IS6110 による分類が国際基準となっている。この IS6110 は、文献的に結核菌の染色体上にランダムに存在し、PvuII 制限酵素断片で 0-26 コピー検出される。標準株である *M. tuberculosis* H37Rv 株では 14 本のバンドが検出される。しかし臨床分離株の中には IS6110 コピーを持たないものや、数コピーしか持たない株も多く存在する。以前の報告によると、日本の結核菌臨床分離株では IS6110 コピー数の分布は 1-19 本の間であり、コピー数が 1 本と 11 本にピークが認められたとある。このほど我々が行った調査でも、IMCJ 株は 10 本と 13 本に集中していた。しかしコピー数が全く無いかまたは数本しか無い株も多数認められた。IS6110 におけるタイピングは、コピー数が 6 本以下である場合には信憑性にかけるとされてきた。従ってこのように IS6110 コピーの少ない株では、他に有効な疫学マーカーを開発することが必須である。以前の研究で、我々は細菌ゲノムの TRS を解析し、その結果、結核菌には(CGG)₅ のマイクロサテライトが特異的に存在することを見出した。遺伝子座に複数存在するマイクロサテライトを用いた RFLP 分析は、ヒトでは親子鑑定、血液鑑定などに用いられている。本研究は、結核菌に高頻度に存在する TRS、(CGG)₅ を用いた新しい結核菌分子疫学法の開発を目的として行った。

はじめに、結核菌群および非結核性抗酸菌について、そのゲノム上に(CGG)₅ が存在するかどうかも RFLP 分析によって解析した。その結果、*M. tuberculosis* H37Rv、*M. tuberculosis* H37Ra、*M. bovis* BCG、*M. marinum*、*M. kansasii* といったヒトに対して起病性を示す菌には(CGG)₅ が 10 本以上と多数確認された。しかしながら、同じくヒトに対する起病性のある、*M. avium*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus* にはその存在が確認されなかった。このことは、(CGG)₅ の存在がヒトに対する病原性には関与していない可能性を示唆している。また *M. intracellulare*、*M. szulgai*、*M. gastri*、*M. nonchromogenicum*、*M. peregrinum* において、若干ではあるが(CGG)₅ の存在が確認されたことから、これまで有効な疫学マーカーがなかったこれらの菌の疫学に対し、この配列が応用できることが示された。さらに上述したように、(CGG)₅ 配列を有する遺伝子は、そのほとんどが PE-PGRS および PPE タンパク質をコードする遺伝子であった。これらのタンパクファミリーは結核菌の多型の原因と考えられており、免疫学的に

重要で、抗原バリエーションを作っているとされているが、まだその機能などについてよくわかっていない。従ってこの配列を持つ菌種には、これらのタンパク群を持ち合わせている可能性も考えられる。

次に当センターで分離された菌(IMCJ 株)とポーランドにて分離された菌(Poland 株)における RFLP 分析を行った。IS6110 では菌株間の相同性は 10~100%でありその差は大きかったが、(CGG)5 による分類では 60%以上であり、日本とポーランドとはいえ、すべての菌株が非常に近縁関係にあることが推測された。また、IS6110 のコピー数が 6 本以下の菌は 11 株あったが、これらの株においても(CGG)5 は 12~15 個存在し、より詳細に解析することができた。また IS6110 では国別、あるいは薬剤感受性の有無によってクラスターに分けることができなかったが、(CGG)5 では、特にポーランド株において薬剤感受性菌および薬剤耐性菌はそれぞれクラスターを作る傾向にあった(図 4)。このことは、ポーランドにおける薬剤感受性菌と耐性菌は、それぞれ異なる祖先から発生してきたことを意味している。つまり(CGG)5 による RFLP 分析によって、結核菌の薬剤に対する感受性についても分類できる可能性が示唆され、このことについては今後さらに検討を行う予定である。

5) DNA チップによる PE タンパクファミリー遺伝子発現解析：

ハイブリダイゼーションの結果、陽性コントロールである 16s リボソーム RNA および Rv 0872c に同程度のシグナルが観察された。しかしその他のスポットにはシグナルは観察されず、培養 1 週間目と 2 週間目の両方で発現していると考えられる遺伝子は Rv 0872c のみであると思われた。

5. まとめ

本研究では、ゲノム情報解析技術を駆使し、感染症分野におけるポストゲノム創薬技術の応用開発を行なうことである。具体的には、DNA マイクロアレー法やリアルタイム PCR 等の方法を導入し、さらにゲノム情報などを活用した研究を展開してきた。その結果、1) 全国市中病院を対象にした抗酸菌分離及び薬剤耐性の実態調査、2) ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法を開発、3) リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験の開発、4) 結核ゲノム情報に基づく新しい疫学手法の開発、5) DNA チップによる PE タンパクファミリー遺伝子発現解析の各分野で進展が見られた。今後はこれらの結果を発展させ、応用研究を目指していく。

6. 研究発表

Watando, A., Toyota, E., Mori, N., Kaneko, A., Kuratsuji, T., Kirikae, T. & Kudo, K. Pulmonary *Mycobacterium avium* infection in an immunocompetent young adult related to use of home bath with a circulating water system. Jpn. J. Infect. Dis. 54, 151-152 (2001).

Takahara, M., Kano, T., Aiyoshi, M., Fujino, T., Otsuka, Y., Saruta, K., Kuratsuji, T. & Kirikae, T. Pulmonary *Mycobacterium avium* infection in an immunocompetent aged woman related to use of home bath with a circulating water system. Jpn. J. Infect. Dis. 55, 213-214 (2002).

長谷川美幸、小山悦子、内野卯津樹、佐藤弓枝、小林寅詰、西園寺克、渡辺彰. 免疫クロマトグラフィによる結核菌群迅速同定に関する検討. 感染症学雑誌 77, 110-115 (2003).

7. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

切替照雄、豊岡公德、内記良一、田村弘志：抗菌性ペプチドに対する抗体及びその利用、特願 2002-213040、特許出願中

切替照雄、大槻隆司、大塚弥生、根本清一、牧野 徹：特異的繰り返し配列が多数含まれる結核菌特異的遺伝子群を用いたタイピング用 DNA チップおよびその利用、特願 2002-284507、特許出願中

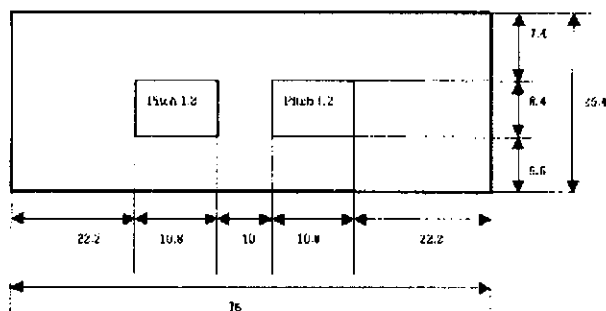
切替照雄、関口純一朗、大槻隆司：結核菌に含まれる薬剤耐性遺伝子を検出する方法、PCR 用プライマーペアセット、塩基配列用プライマーセット、及び薬剤耐性結核菌の診断用試薬キット、特願 2003-005370、特許出願中

2) 実用新案登録 なし

3) その他 なし

表1 (CGG)₅配列を含むPE-PGRSおよびPPEタンパクファミリーにおける
発現解析用DNAチップに使用した特異的配列

Family	I-Seq	ORF	Probe(30mer)
PE-PGRS gene	5	Rv0297	CGCGGCCACGACCACCGAGTCATGTCGGC
	7	Rv0578c	AGCGCTGTCGCCAACGGGCAACAACGGCAG
	15	Rv0872c	GTTACGCAAGGCGTTCGGGGGCGATGGCG
	16	Rv0977	CCGGTGCAGTGGGCGTCTTGGGAATCGGGC
	19	Rv1067c	AAAGGGCGGCGACACCCCAACGGTCTGGC
	20	Rv1068c	TGCGGTGCCAGACATGCTCAGCTCGGCGGC
	21	Rv1087	GCGCCGGCCTCGGTGCTCAGAGCGTCACCT
	27	Rv1450c	AAGGCGCTTGCAGCCACCACCAGGACGGC
	37	Rv2098c	GAGGCGATGGCGGTTTGGGTGGACGGGCGG
	38	Rv2126c	CAGGACCGTGGGGCCGGCAACAGTGCGGGA
	42	Rv2490c	GCGCCTGGTTCAGATGCCCTCGCCCTCGGC
	43	Rv2591	AACAGCGGCCAGCCCCAACGGCGGTGATGG
	51	Rv3388	CGGCCCGGAGAGCCACACCGTCGAGCAGA
PPE gene	4	Rv0280	GGCTATCCCTACGCCATCGCTCCGCCCGGC
	42	Rv2356c	GGCTTGTGGGCTTGTAGGCGGTGCGGCT
	55	Rv3159c	ACGCGGGCAACGAAGACATGGGCGTCGGGA
	57	Rv3347c	CCGCCCCGCCCCCTTCAGACTTCCGTTGC
	58	Rv3350c	ACCGTCAGGACCCCGCCCGTGTCTCGTCAGT
	63	Rv3532	CTATCGGACGGAGCACTACGCGGCCCGGGC
	64	Rv3533c	AGCGGCAACGGGAGGGCGGGACTTCCAGGC
16srRNA			cgatcatgaaagtcggtaacaccgaagccagtggcctaaccctcg



配置図

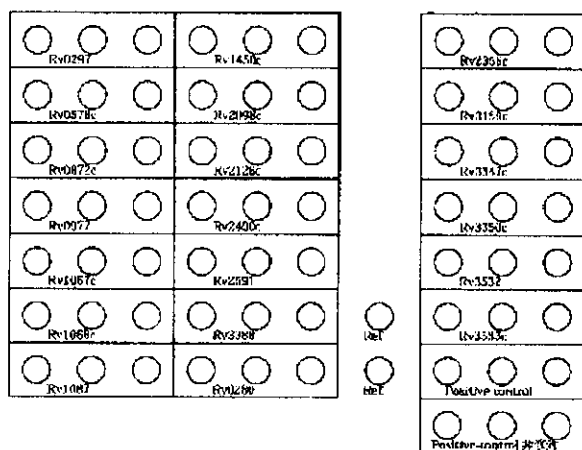


図1 DNAチップの配置図

Table 2

臨床分離 *Mycobacterium tuberculosis* complex 52 株の薬剤感受性成績

Method	Criterio n	SM		INH		RFP		EB	
		株数	%	株数	%	株数	%	株数	%
MGIT960 SIRE	S	47	90.4	45	86.5	49	94.2	50	96.2
	R	5	9.6	7		3	5.8	2	3.8
ビットスペクトル -SR	S	49	94.2	49	94.2	51	98.1	48	92.3
	R	3	5.8	3	5.8	1	1.9	4	7.7
Proportion Method	S	47	90.4	48	92.3	49	94.2	50	96.2
	R	5	9.6	4	7.7	3	5.8	2	3.8

Table 3 薬剤感受性試験と遺伝子変異の相関

Direct sequencing result	Conventional drug susceptibility test			
	No. of resistant	No. of susceptible	Total	
<u>katG</u>				
Mutation	7	0	7	Isoniazide (77%)
Wild type	6	20	26	
Total	13	20	33	
<u>mab-inhA</u>				
Mutation	4	0	4	Rifampicin (78%)
Wild type	9	20	29	
Total	13	20	33	
<u>rpoB</u>				
Mutation	7	0	7	Ethambutol (100%)
Wild type	6	20	26	
Total	13	20	33	
<u>embB</u>				
Mutation	3	0	3	pyrazinamide (100%)
Wild type	0	30	30	
Total	3	30	33	
<u>pncA</u>				
Mutation	3	0	3	
Wild type	0	30	30	
Total	3	30	33	

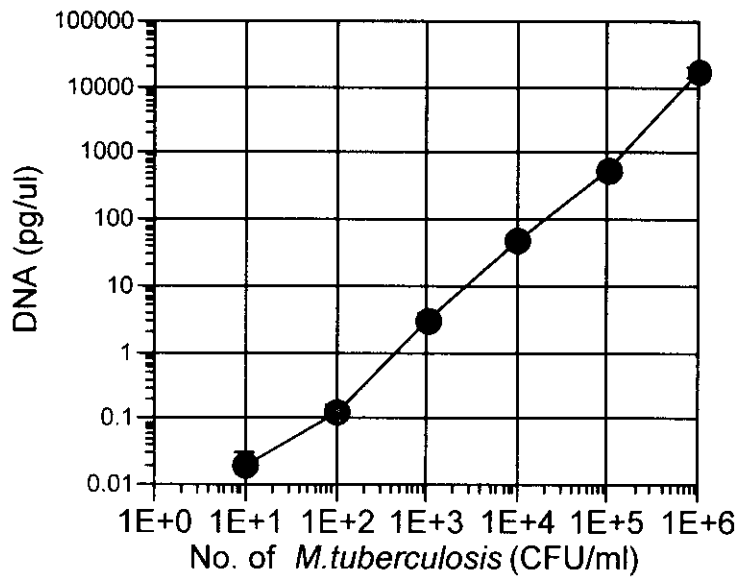


図 2 : リアルタイム PCR で定量化された *M. tb* H37Rv の DNA 量

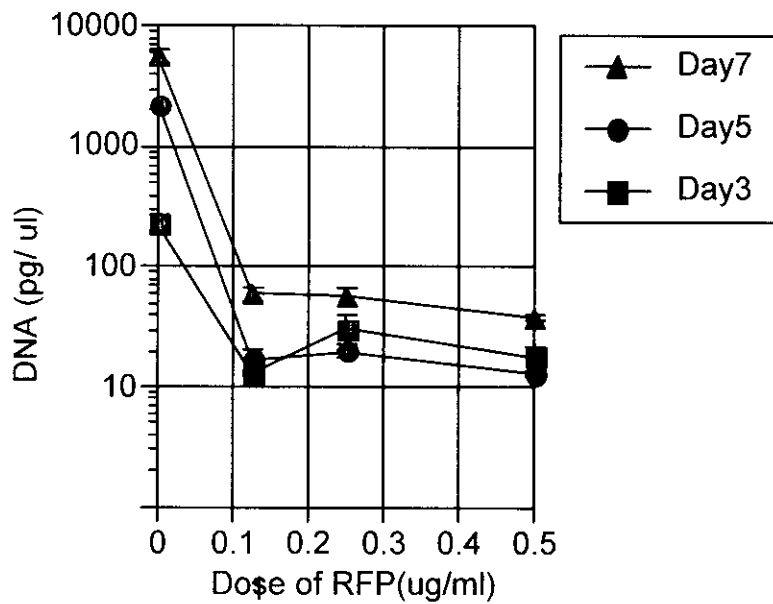


図 3 : リアルタイム PCR で定量化された種々の濃度のリファンピシンの *M. tb* H37Rv 増殖に対する影響

Table 3. Distribution of trinucleotide repeats among bacterial genomes

Table 3. Distribution of trinucleotide repeats among bacterial genomes

Microorganism	Type of repeat									
	CGG	CTG	GTC	CCT	GTG	GAA	GAT	GTA	GTT	TAT
	No of repeats in a single tract/occurrence per genome									
<i>Clostridium acetobutylicum</i> 3940880 bp	--	5/1	--	--	--	5/1	--	--	5/1	5/2
<i>Clostridium perfringens</i> 3031430 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	--	5/3 6/1
<i>E. coli</i> K12 4639221 bp	5/2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>E. coli</i> O1575498450 bp	5/1	--	--	--	--	--	--	--	5/1	--
<i>E. coli</i> O157: EDL933 5528445 bp	5/1	--	--	--	--	--	--	--	5/1	--
<i>H. pylori</i> 26695 1667867 bp	--	--	--	--	--	--	--	8/1	5/1	--
<i>H. pylori</i> J99 1643831 bp	--	--	--	--	5/1	5/1	--	8/1	5/1	--
<i>Listeria innocua</i> 3011208 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Listeria monocytogenes</i> 2944528 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Mycoplasma genitalium</i> 580074 bp	--	--	--	--	--	5/1 6/1 16/1	--	5/1 7/1 8/1 9/1 10/1 11/1 16/1	11/1	--
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> 816394 bp	--	--	--	--	--	--	--	5/1 7/1	--	--
<i>Mycoplasma pulmonis</i> 963879 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	5/2	6/1
<i>Mycobacterium leprae</i> 3268203 bp	--	--	--	--	5/1 6/1	21/1	5/2	5/3 9/1	--	--
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv 4411529 bp	5/27 6/1 7/1	--	5/1	--	5/3	--	5/1	--	--	--
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 4403836 bp	5/32 6/1	--	5/1	--	5/3	--	5/1	--	--	--
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58 2272351 bp	5/6	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491 2184406 bp	5/2 6/1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6264403 bp	5/5	--	--	--	5/2 14/1	--	--	--	--	--
<i>Rickettsia conorii</i> Malish 7 1268755 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	--	5/1
<i>Rickettsia prowazekii</i> 1111523 bp	--	--	--	--	5/1	--	--	--	--	5/1
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi 4809987 bp	5/4	10/1	--	--	5/1	--	--	--	--	--
<i>Salmonella typhi</i> 4809037 bp	5/2 6/1	10/1	--	--	5/1	--	--	--	--	--
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 4857432 bp	5/4	5/2	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i> Mu50 2878040 bp	--	4/4	--	--	4/3	4/8	4/8 5/1	4/1	4/6	4/24
<i>Staphylococcus aureus</i> N315 2160837 bp	--	4/4	--	--	4/2	4/2	4/6	--	4/2	4/7
<i>Thermoplasma acidophilum</i> 1564906	--	--	--	4/1	--	4/4	4/4	--	4/1	4/5
<i>Thermoplasma volcanicum</i> 1584804 bp	--	4/2	--	--	--	4/5	4/4	4/2	--	4/5
<i>Yersinia pestis</i> 4653728 bp	4/9	4/14 5/1 6/1	4/1	--	4/13 5/2	4/5	4/8	--	4/3	4/10

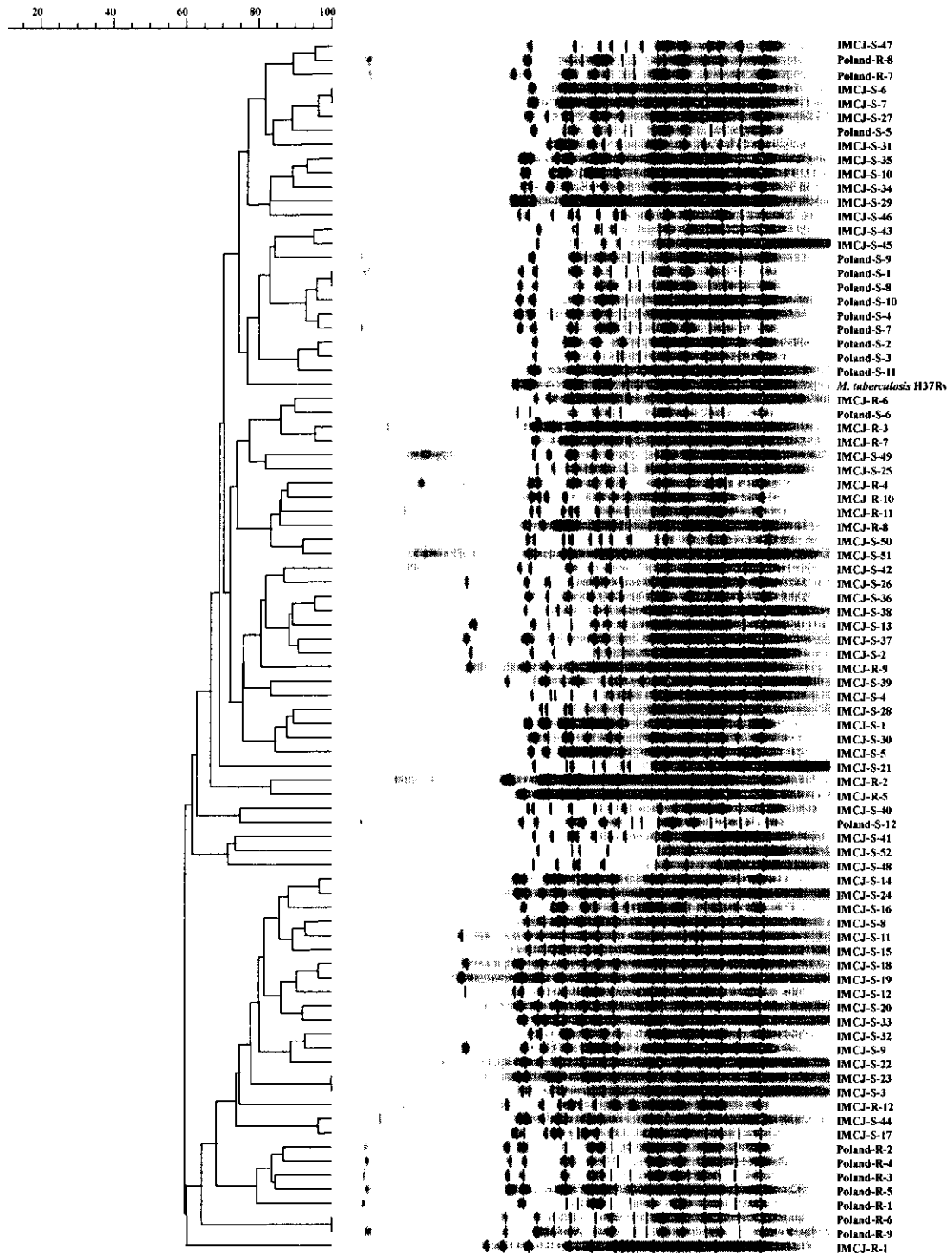


図4 臨床分離株における(CGG)₅パターン
 IMCJ-S (IMCJ 株薬剤感受性菌)、IMCJ-R (IMCJ 株薬剤耐性菌)
 Poland-S (ポーランド株薬剤感受性菌)、Poland-R (ポーランド株薬剤耐性菌)