

tion control in the same tube by means of two-color fluorescence monitoring of the reaction mixture at 520 nm and 610 nm, respectively. For the experiments to be able to evaluate the species specificity of the assay, the 16S rRNAs of 16 mycobacterial species other than MTC were prepared in the same manner described above for MTC 16S rRNA. These species comprised *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. gastri*, *M. xenopi*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, and *M. peregrinum*.

TRC method for detection of *M. tuberculosis* complex. The principles of amplification and fluorescence-based detection have been described elsewhere (9). Briefly, 20 μ l of the TRC buffer, consisting of a mixture of the substrate solution and the primer solution at a 1:1 (vol/vol) ratio, was added to 5 μ l of the nucleic acid extract in a thin-walled PCR tube (Applied Biosystems, Foster City, CA). The basic composition of the reaction mixture was the same as that described previously (9), with the exception of a slight modification consisting of the omission of RNase H. The tube was then set in the dedicated instrument, a TRCR-160 real-time monitor (Tosoh Co., Tokyo, Japan), for 5 min while being preheated to 43°C, followed by the addition of 5 μ l of the enzyme solution. The TRCR-160 real-time monitor consists of a square incubator block maintained at 43°C and a sliding fluorescence scanning unit. The latter comprises a light-emitting diode light source to irradiate the excitation light (470 nm) from below into the tube from the bottom and a light guide to collect the fluorescence from the bottom of the reaction tube in two photomultiplier tubes (520 nm and 610 nm) at 1-min intervals. The reaction time required for fluorescence enhancement to reach a cutoff value of 1.2 was adopted as the detection time for the TRC assay. The samples for which the detection time was ≤ 30 min were considered to have a positive signal, and those with positive signals at 520 nm were judged to be positive. Samples without a positive signal at 520 nm and with a positive signal at 610 nm were considered negative, and those with negative signals at both 520 nm and 610 nm were considered indeterminate.

Sample processing for detection of MTC in experimental sputum samples by TRC method. *Mycobacterium* culture-negative, clinical sputum specimens were obtained from patients diagnosed as not having mycobacterial infection at Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan. The samples were mixed and homogenized by vigorous vortexing and were decontaminated by treatment with N-acetyl-L-cysteine (NALC)-NaOH. Various amounts of *M. bovis* BCG (10^0 to 10^4 cells per 100 μ l), *M. avium* (10^2 to 10^6 cells per 100 μ l), and *M. kansasii* (10^2 to 10^6 cells per 100 μ l) were added to these culture-negative sputum specimens. Pretreatment consisted of mixing of 100 μ l of the decontaminated samples with 500 μ l of 67 mM phosphate buffer (pH 8.6) containing glass beads. After centrifugation at $3,000 \times g$ for 5 min at room temperature, the supernatant was removed, followed by the addition of 300 μ l of extraction buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.25 U/ μ l RNase inhibitor, and 1 mM dithiothreitol. After sonication for 5 min, followed by centrifugation at $3,000 \times g$ for 5 min, 5 μ l of the supernatant was used as the template.

Sample processing for detection of MTC in clinical sputum samples by culture, TRC method, and COBAS AMPLICOR PCR. Clinical samples were obtained from patients diagnosed with or suspected of having a mycobacterial infection at the National Central Hospital for Chest Disease, Osaka, Japan, and the National Tokyo Hospital, Tokyo, Japan. All samples were decontaminated by treating them by a commercially available NALC-NaOH-based method, CC-E Nichibi (Japan BCG Laboratory, Tokyo, Japan) or BBL Micoprep (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). After centrifugation at $3,000 \times g$ for 15 min at room temperature, the sediment was resuspended in 1.0 ml of phosphate buffer (pH 7.0). A smear of the decontaminated suspension was stained with the Ziehl-Neelsen stain, and a 500- μ l aliquot of the suspension was cultivated in the BACTEC MGIT 960 liquid culture system (Becton Dickinson) for 6 weeks, in accordance with the manufacturer's recommendations. The remaining decontaminated suspension of the samples was immediately used or was stored at -20°C until use. The TRC method was applied to 100 μ l of the suspension; the Roche COBAS AMPLICOR PCR was applied to 200 μ l of the suspension, which had been treated with the Amplicor Mycobacterium Specimen Pretreatment Set II (Roche Diagnostics). The isolated mycobacteria were identified by an immunochromatographic assay with the anti-MPB64 antibody (Capilia; Becton Dickinson), a chemiluminescent DNA hybridization probe assay (AccuProbe; Gen-Probe Inc.), or a DNA hybridization assay (DDH Mycobacteria; Kyokuto Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan).

RESULTS

Sensitivity and specificity of TRC assay with experimental samples. In the experiment with the standard RNA calibrator

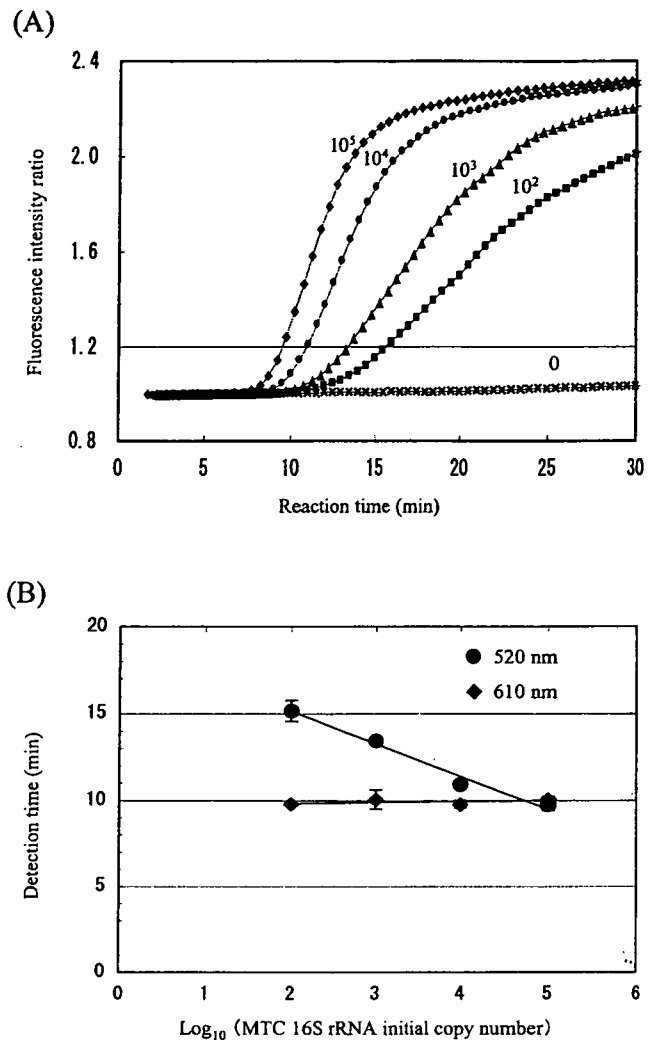


FIG. 3. (A) Fluorescence monitoring of the TRC reaction of the MTC 16S rRNA calibrator. The initial copy numbers of the calibrator are indicated as follows: diamonds, 10^5 ; circles, 10^4 ; triangles, 10^3 ; squares, 10^2 ; crosses, 0. (B) Initial copy numbers of the calibrator on a logarithmic scale plotted against the time needed to reach the cutoff value of 1.2. Circles indicate the detection time at 520 nm, and diamonds indicate that at 610 nm. The average of the values obtained with triplicates of each sample is plotted.

for the TRC assay (Fig. 3), the time to detection depended on the initial copy number, which ranged from 10^2 to 10^5 . For the internal control, the time to detection at 610 nm remained approximately constant at about 10 min, irrespective of the initial copy number. The results for MTC detection in experimental sputum samples containing BCG by the TRC method are shown in Table 1. The detection limit for BCG was one organism per 100 μ l of sputum, and the time to detection became shorter for samples with a lower number of BCG organisms. All of the sputum samples containing $\geq 10^2$ *M. avium* or *M. kansasii* organisms per 100 μ l were judged to be negative by the TRC method (Table 1). The species specificity of the TRC method was examined by testing the 16S rRNA solution with 16 mycobacterial species other than MTC as the templates. The TRC method did not show positivity for any of the 16S rRNAs

TABLE 1. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific 16S rRNA sequence by TRC method in sputum containing BCG (10^0 to 10^4 cells/100 μ l), *Mycobacterium avium*, and *M. kansasii* (10^2 to 10^6 cells/100 μ l)

No. of organisms/ 100 μ l of sputum	Detection time (min)		
	BCG	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
10^6	NE ^a	ND ^b	ND
10^5	NE	ND	ND
10^4	10.0	ND	ND
10^3	10.4	ND	ND
10^2	12.5	ND	ND
10^1	15.6	NE	NE
10^0	21.7	NE	NE

^a NE, not evaluated.

^b ND, not detected.

(10^6 copies, equivalent to an rRNA content of 10^3 cells, per 100 μ l) of the species examined (data not shown).

Evaluation of performance of TRC assay for detection of MTC in clinical sputum samples. Table 2 presents the results of the clinical evaluation of the TRC method and the COBAS AMPLICOR PCR with 201 sputum samples from 173 patients. The TRC method detected as positive 39 of 43 smear-positive, culture-positive samples (sensitivity, 90.7%) and 13 of 29 smear-negative, culture-positive samples (sensitivity, 44.8%), for a total of 52 of 72 culture-positive samples (sensitivity, 72.2%). The COBAS AMPLICOR PCR detected as positive 41 of 43 smear-positive, culture-positive samples (sensitivity, 95.3%) and 17 of 29 smear-negative, culture-positive samples (sensitivity, 58.6%), for a total of 58 of 72 culture-positive samples (sensitivity, 80.6%). The 129 culture-negative samples (Table 2) contained 40 samples culture positive for nontuberculous mycobacteria, such as 13 *M. avium*, 15 *M. intracellulare*, 6 *M. kansasii*, 3 *M. abscessus*, and 2 *M. goodii* isolates and 1 *M. fortuitum* isolate, as well as 89 mycobacteria culture-negative samples. The TRC method did not produce positive results for any of the 129 culture-negative samples (specificity, 100%), none of which were kept suspended, as in the case of in the TRC method, because the fluorescence intensity ratios at 610 nm reached ≥ 1.2 .

Comparison of TRC assay and COBAS AMPLICOR PCR for detection of MTC in clinical sputum samples. As shown in Table 2, the COBAS AMPLICOR PCR detected as positive 41 of 43 smear-positive, culture-positive samples (sensitivity, 95.3%) and 17 of 29 smear-negative, culture-positive samples

TABLE 2. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in 201 clinical sputum samples from 173 patients with diagnosed or suspected mycobacterial infection by TRC method, the COBAS AMPLICOR PCR, MGIT^a culture for MTC, and smear test

Smear result (n)	Culture result (n)	No. of samples with the indicated result by:			
		TRC method		COBAS AMPLICOR-PCR	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Positive (43)	Positive (43)	39	4	41	2
Negative (158)	Positive (29)	13	16	17	12
	Negative (129)	0	129	0	129

^a MGIT, mycobacterial growth indicator tube.

TABLE 3. Agreement between of results of TRC method and COBAS AMPLICOR PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in 201 respiratory samples from 173 patients

COBAS AMPLICOR PCR result	No. of samples with the following result by TRC method:	
	Positive	Negative
Positive	50	8
Negative	2	141

(sensitivity, 58.6%), for a total of 58 of 72 culture-positive samples (sensitivity, 80.6%). The COBAS AMPLICOR PCR produced no positive results for any of the 129 culture-negative samples (specificity, 100%). There were thus no significant differences in sensitivity and specificity between TRC and PCR, although the sample size was comparatively small for the detection of small differences in sensitivity between the two methods. The correlation of the results of the TRC method and the COBAS AMPLICOR PCR are shown in Table 3, with the overall agreement between TRC and PCR being 95.0% (191 of 201 samples).

DISCUSSION

In this study, we were able to demonstrate that the performance of the TRC method for the detection of MTC from respiratory samples was comparable to that of the COBAS AMPLICOR PCR in terms of sensitivity and specificity. The TRC method detected as little as one BCG organism per 100 μ l of sputum. The selection of rRNA as the amplification target, of which a single cell contains multiple copies, may be the primary reason for this favorable result.

In the case of MTC smear-negative and culture-positive samples, the TRC method showed substantially lower rates of positivity than it did for smear- and culture-positive samples, as did the COBAS AMPLICOR PCR. This less favorable result was, however, comparable to the results of previous studies that evaluated nucleic acid amplification assays in similar settings (18). As for the specificity, the TRC method did not show positivity for 10^6 *M. avium* or 10^6 *M. kansasii* organisms per 100 μ l of sputum, nor did it show positivity for 10^6 initial copies of 16S rRNA of 16 non-MTC mycobacterial species. The 129 MTC culture-negative samples comprised 40 samples which were culture positive for nontuberculous mycobacterial isolates as well as 89 mycobacterial culture-negative samples. These results clearly demonstrate the excellent specificity of the TRC method for the detection of MTC.

As to sensitivity, the difference between the two methods was not significant, although the comparatively small sample size provided this study with insufficient power to detect small differences in sensitivity. The slightly smaller number of MTC culture-positive samples detected by the TRC method than by the COBAS AMPLICOR PCR may have been due to a reduction in the numbers of viable cells during treatment, since this study included samples from patients undergoing antituberculosis chemotherapy. The levels of mycobacterial rRNA may therefore have decreased faster than the levels of DNA in proportion to the decrease in viable cells. This finding may, rather, indicate some advantage of the TRC method over DNA-based amplification methods in terms of greater correct-

ness in the diagnosis of active disease. Actually, Moore et al. has reported that elimination of MTC rRNA from sputum samples may indicate successful antituberculosis therapy (12).

We found unaccountable false-negative results, four by the TRC method and two by the COBAS AMPLICOR PCR, among the 43 smear- and culture-positive samples. The reason could not be that no viable cells remained in the samples, since MTC was indeed identified by smear as well as culture of these samples. The promptly appearing positive signal of the internal control with the use of either method excluded the possibility that inhibitors were present in the samples. The slightly greater number of false-negative results obtained by the TRC method could be explained by a reduction in the number of viable cells during treatment, although the exact reason is difficult to identify. The fact that these false-negative results were found with the use of both methods together, however, makes it less likely that there are any critical problems specific to the TRC method in terms of false-negative results.

The samples examined in this study showed a prevalence of MTC-positive samples considerably higher than the prevalence in most clinical laboratories in developed nations. This is not surprising, since Japan is characterized by a substantially higher prevalence of tuberculosis compared with that in other developed countries: 24.8 new cases per million population in 2003 (11). In addition, public health policies in Japan have been promoting the concentration of tuberculosis patients in core referral centers specializing in tuberculosis, which include the Kinki-Chuo Chest Medical Center and National Tokyo Hospital.

Of special importance are the several advantages that the TRC method has over the other nucleic acid amplification tests. First, an internal control is amplified to avoid false-negative results; second, the entire procedure is conducted in a completely homogeneous and isothermal format, thus eliminating contamination by postamplification analysis; and third, the results from the time that the samples are decontaminated are available within an hour because amplification and detection require only 30 min. The TRC method also proved to be clinically useful for the rapid identification of MTC in respiratory samples, at least for those smear-positive ones, as is the case for COBAS AMPLICOR PCR.

Pulmonary tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infection are sometimes difficult to differentiate based on clinical findings. The nucleic acid amplification test, which could detect MTC only, may add little information in such cases if the result was negative. Development of the TRC method for the detection of *M. avium* complex and *M. kansasii*, which is now in progress in the laboratory at Tosoh Corporation, could further enhance the clinical usefulness of this method for the management of patients with suspected mycobacterial infection especially when the smear result is positive.

In summary, the sensitivity of the TRC method was found to be comparable to that of the COBAS AMPLICOR PCR, and its specificity was excellent. Moreover, less than an hour was required to obtain results after the specimens had been treated with NALC-NaOH. This novel method can thus be expected to be suitable for routine use for the rapid diagnosis of tuberculosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Juichi Saito, Ryuichi Horie, Masahide Kondo, and Hideo Suzuki of Tosoh Corporation; Akiko Irie of the Kinki-chuo

Chest Medical Center; and Sadao Aoki, Shigeru Takeyama, and Shuichi Ohtawa of National Tokyo Hospital for their contributions.

REFERENCES

- Fadda, G., F. Ardito, M. Sanguinetti, B. Posteraro, L. Ortona, C. Chezzi, L. Polonelli, G. Dettori, S. Conti, F. Fanti, and C. Galli. 1998. Evaluation of the Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis assay in comparison with culture methods in selected Italian patients. *New Microbiol.* 21:97-103.
- Ginesu, F., P. Pirina, L. A. Sechi, P. Mollicotti, L. Santoru, L. Porcu, A. Fois, P. Arghittu, S. Zanetti, and G. Fadda. 1998. Microbiological diagnosis of tuberculosis: a comparison of old and new methods. *J. Chemother.* 10:295-300.
- Reference deleted.
- Ichiyama, S., Y. Iinuma, S. Yamori, Y. Hasegawa, K. Shimokata, and N. Nakashima. 1997. Mycobacterium growth indicator tube testing in conjunction with the AccuProbe or the AMPLICOR-PCR assay for detecting and identifying mycobacteria from sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 35:2022-2025.
- Ichiyama, S., Y. Iinuma, Y. Tawada, S. Yamori, Y. Hasegawa, K. Shimokata, and N. Nakashima. 1996. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 34:130-133.
- Ichiyama, S., Y. Ito, F. Sugiura, Y. Iinuma, S. Yamori, M. Shimojima, Y. Hasegawa, K. Shimokata, and N. Nakashima. 1997. Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 35:3082-3085.
- Iinuma, Y., S. Ichiyama, S. Yamori, J. Oohama, N. Takagi, Y. Hasegawa, K. Shimokata, and N. Nakashima. 1998. Diagnostic value of the Amplicor PCR assay for initial diagnosis and assessment of treatment response for pulmonary tuberculosis. *Microbiol. Immunol.* 42:281-287.
- Iinuma, Y., K. Senda, N. Fujihara, T. Saito, S. Takakura, M. Shimojima, T. Kudo, and S. Ichiyama. 2003. Comparison of the BDProbe Tec ET system with the Cobas Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22:368-371.
- Ishiguro, T., J. Saitoh, R. Horie, T. Hayashi, T. Ishizuka, S. Tsuchiya, K. Yasukawa, T. Kido, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and K. Ueda. 2003. Inter-calation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel. *Anal. Biochem.* 314:77-86.
- Ishiguro, T., J. Saitoh, H. Yawata, H. Yamagishi, S. Iwasaki, and Y. Mitoma. 1995. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalator. *Anal. Biochem.* 229:207-213.
- Japan Anti-Tuberculosis Association. 2004. Japan tuberculosis statistics, annual report: tuberculosis notifications in Japan, 2000-2003. <http://www.jata.or.jp/eindex.htm>. Accessed 9 July 2005.
- Moore, D. F., J. I. Curry, C. A. Knott, and V. Jonas. 1996. Amplification of rRNA for assessment of treatment response of pulmonary tuberculosis patients during antimicrobial therapy. *J. Clin. Microbiol.* 34:1745-1749.
- Nakaguchi, Y., T. Ishizuka, S. Ohnaka, T. Hayashi, K. Yasukawa, T. Ishiguro, and M. Nishibuchi. 2004. Rapid and specific detection of *tdh*, *trh1*, and *trh2* mRNA of *Vibrio parahaemolyticus* using transcription-reverse transcription concerted (TRC) reaction with automated system. *J. Clin. Microbiol.* 42:4284-4292.
- Piersimoni, C., and C. Scarparo. 2003. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 41:5355-5365.
- Piersimoni, C., C. Scarparo, P. Piccoli, A. Rigon, G. Ruggiero, D. Nista, and S. Bornigia. 2002. Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J. Clin. Microbiol.* 40:4138-4142.
- Portaels, F., E. Serruys, H. De Beenhouwer, J. Degraux, K. De Ridder, K. Fissette, J. Gomez-Marin, H. Goossens, F. Muhberger, S. R. Pattyn, F. Nturanje, F. Pouthier, and A. Van Deun. 1996. Evaluation of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for the routine diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Acta Clin. Belg.* 51:144-149.
- Reference deleted.
- Sarmiento, O. L., K. A. Weigle, J. Alexander, D. J. Weber, and W. C. Miller. 2003. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 41:3233-3240.
- Takakura, S., S. Tsuchiya, N. Fujihara, T. Kudo, Y. Iinuma, S. Mitarai, S. Ichiyama, K. Yasukawa, and T. Ishiguro. 2005. Isothermal RNA sequence amplification method for rapid antituberculosis drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 43:2489-2491.

Bedside Teaching

肺結核を見落とさないために

鈴木 克洋

呼吸と循環

第54巻 第1号 別刷

2006年1月15日 発行

医学書院



肺結核を見落とさないために*

鈴木 克洋¹

はじめに

結核罹患率の低下に伴い、医療従事者の結核に対する関心は院内感染対策に絞られてきた。この点で臨床医に求められる最も重要な事項が、診断の遅れをなくすことであることは言うまでもない。一般病棟に肺炎として、喘息として、または高齢者の衰弱として入院していた患者が、後に喀痰塗抹(ガフキー)陽性結核と判明した場合、同室者や医療従事者の接触者検診に膨大なエネルギーを費やすことになる。

本稿では、一般臨床医が肺結核の診断の遅れをなくすための注意点を、当院に紹介されてくる症例をとおして概説する。注意点の理解に必要な結核の基礎知識と肺結核診断の基本プロセスについても述べる。

結核の基礎知識

結核は結核菌による慢性の感染症であり、全身全ての臓器に病変が生じうる。しかし、空気感染(後述)という伝染様式から、肺結核が全体の85%を占める。肺以外の結核も肺からリンパ行性または血行性に広がったものである。胸膜、リンパ節、骨・関節、腎、全身播種型(粟粒結核)が比較的頻度が高い肺外結核である。

戦後順調に低下した結核罹患率であるが、1980年代より低下率の鈍化傾向が顕著となり、97年から99年まで微増に転じたことは記憶に新しい。幸い各方面の努力により2000年以降は再度低下

している。現在、結核は高齢者の病気であり、70歳以上が40%以上を占めている。罹患率の地域格差が大きいのも近年の特徴である。2003年罹患率ワースト3は大阪、東京、兵庫である。現在結核は東京地区以西の大都市の病気といっても過言ではない¹⁾。

結核の感染様式は空気(飛沫核)感染である。喀痰塗抹陽性の呼吸器系の結核患者が咳やくしゃみをした時に2~3個の結核菌を中心に含む飛沫が放出され、その一部が裸の飛沫核となり、空気中を長時間浮遊する(図1)。この飛沫核を肺胞内に直接吸い込むことが感染の必要条件である。体内には各種非特異的防御機序が存在し、結核菌の分裂速度が遅い(15~24時間)こともあり、大部分の菌は増殖する前に体外に排出されるか殺される。頻回・多量に吸い込んだ場合にのみ、結核菌が体内で増殖を開始し感染が成立する。この後6~8週間かけて結核菌に対する特異細胞性免疫が成立し、菌は肉芽腫中に封じ込められて増殖を停止する²⁾。感染の成立は結核菌に対する特異細胞性免疫の存在を通して間接的に判断される。従来ツベルクリン反応が唯一の方法であったが、最近 QuantiFERON TB-2G(QFT2G)が開発された(後述)。

感染者の9割は菌の封じ込めが継続し生涯発病せず経過す。しかし、約6~7%の感染者は2年以内に封じ込めが破綻し、結核菌が再増殖を開始し発病に至る²⁾。この場合には免疫低下を示唆する基礎疾患が特にならぬ例も多い。感染2年以内

* Prevention of Delay in Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis

¹⁾ 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター、臨床研究センター感染症研究部(〒591-8555 大阪府堺市長曾根町1180) Katsuhiko Suzuki : NHO Kinki-chuo Chest Medical Center

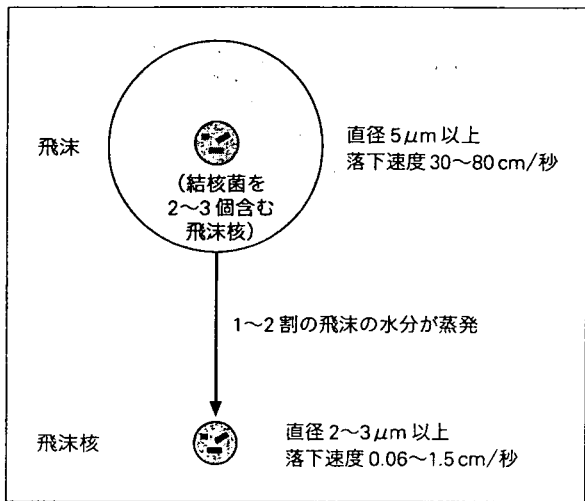


図1 結核は飛沫核(空気)感染である

は封じ込めが未完成であり、軽度な感染防御力の低下(過労、ストレスなど)で菌が再増殖するためと理解される。感染2年以後発病率は低下し、明らかな感染防御力の低下(糖尿病、腎不全、免疫抑制剤の投与、高齢)がある場合に限り発病する。結核の感染と発病の概略を図2に示した。

肺結核の診断

臨床医が結核を診断するプロセスを表1に呈示した。現在結核の8割は有症状で医療機関を受診

表1 肺結核診断のプロセス

- 1) 2週間以上続く典型的な症状
- 2) 発病リスク要因の存在
- 3) 典型的な画像所見の存在
- 4) 排菌患者との接触歴
- 5) ツベルクリン反応, QFT2G, 抗酸菌抗体
- 6) 慢性炎症を示唆する血液検査
- 7) 抗酸菌検査(喀痰, 胃液, 気管支鏡検体)
- 8) 類上皮細胞肉芽腫の検出

し発見され、検診発見の結核は全体の1割に過ぎない。肺結核の典型的な症状は、2週間以上続く咳・痰・発熱である。熱は37°C台であることが多いが、38~39°C台のことも稀ではない。他に血痰・咯血・胸痛・労作時呼吸困難・寝汗・全身倦怠感・体重減少などが代表的な症状である。

結核の基礎疾患として最も重要なのが糖尿病であり、当院結核入院患者の15%以上を占めるまでになった。他に慢性肝炎、悪性腫瘍、腎透析、塵肺、ステロイドや免疫抑制剤の投与などがある。70歳以上の高齢者であることも発病の重要な要因である。また、2年以内にガフキー陽性患者と接触があった場合、特に結核を疑う必要があることは先述した基礎知識からも明らかであろう。

典型的な症状があり、特に上述した要因をもつ場合、肺結核を強く疑い胸部X線写真を撮る。

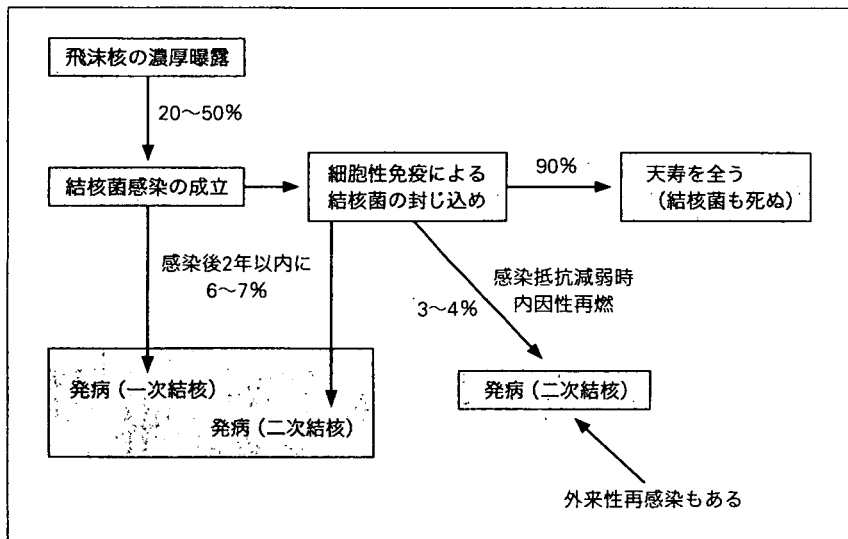


図2 結核の感染と発病

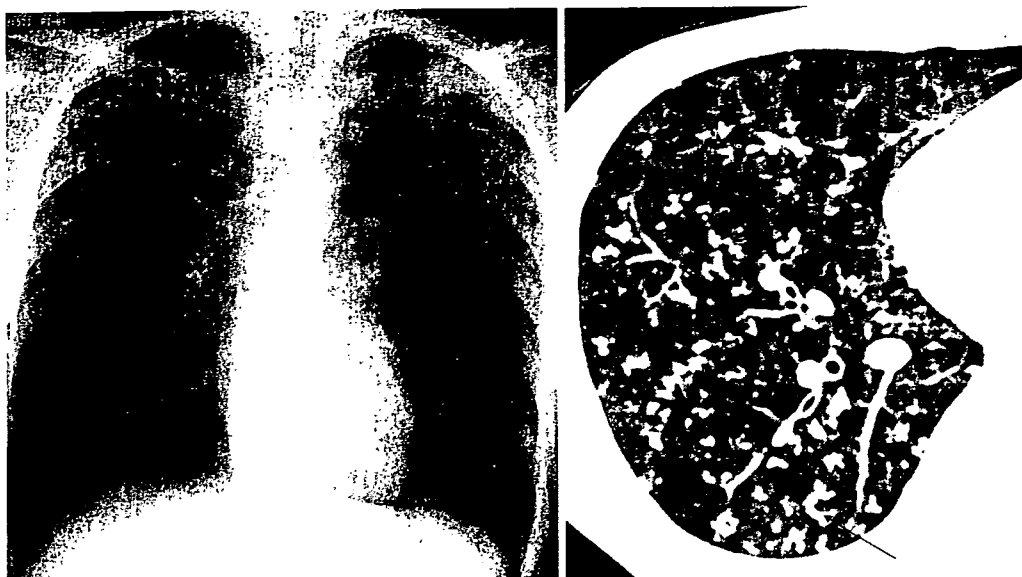


図3 22歳男性，肺結核．全肺野に木の芽様所見が多発している．

肺結核の典型像は，肺尖から上肺野の境界が比較的明瞭な多発性結節影で時に空洞を伴うというものである．近年 HRCT が普及し，呼吸器疾患の鑑別診断に威力を発揮している．結核も例外ではなく，活動性結核に特徴的な所見として木の芽様所見 (tree in bud appearance) と小葉中心性粒状影が Im, Itoh らにより報告され，臨床の現場で多用されている (図3)^{3,4)}．

次に喀痰検査をする．臨床検体から結核菌が培養されることが結核診断のゴールドスタンダードであることは現在も全く変わっていない．喀痰が出ない場合，まず胃液を採取し，ついで気管支鏡検査を考慮する．各種検体の抗酸菌塗抹陽性は必ずしも結核菌の検出を意味しない．非結核性抗酸菌の検出が急増しているためであることは言うまでもない．核酸増幅法で結核菌の核酸が検出されることは結核の有力な証拠であるが，偽陽性が数%存在することを認識し⁵⁾，臨床背景や画像診断も併せた総合的判断をしなければならない．

気管支鏡などによる生検で類上皮細胞肉芽腫が検出された場合も結核の可能性が高いが，非結核性抗酸菌症，サルコイドーシス，クリプトコッカスなどの可能性も否定できない．組織の培養を必ず提出し，結核の確定診断と薬剤感受性の確認

に努めなければならない．組織の塗抹と核酸増幅法のみ提出する臨床医が増加しているが，基本を忘れた態度と言わざるを得ない．

ツベルクリン反応陽性は，結核発病の前提となる感染を示すものとして，診断の際にもしばしば用いられている．しかし，本邦では広範に BCG を接種してきたため，健康人の8割以上が陽性である．健康な大学生でも，強反応者が2割以上存在するとの報告もあり，結核の診断にはあまり役立たない．逆に結核確定例の約8%がツベルクリン反応陰性であったとの報告もある⁶⁾．粟粒結核などの重症結核，また HIV 合併結核に代表される免疫低下状態の結核の際に，しばしばツベルクリン反応が陰性化することも常識であろう．

最近，QuantiFERON TB-2G (QFT2G) 検査が発売された．これは末梢血リンパ球を結核菌にはあるが BCG にはない2種類の抗原で刺激し，分泌されるインターフェロン γ 量を測定することで，BCG の影響を受けずに結核菌感染の有無を正確に判定する方法である．一度の採血ですみ，痕跡が残らず，以前の検査の影響を受けないなどの利点もあり，ツベルクリン反応に代わる検査法としてその有用性が続々と報告されている^{7,8)}．現時点では健康保険が適応されていないうえに，

表 2 肺結核診断の遅れの原因

- | |
|--|
| 1) 慢性の咳嗽や喀痰があるのに X 線写真や喀痰検査をしない |
| 2) 肺に陰影があるも肺炎と考えてしまう |
| 3) 肺に陰影があるも以前の写真と直接比較をせずに陳旧性病巣と判断してしまう |
| 4) 喀痰検査を実施するが、よい喀痰が提出されていない |
| 5) 気管支結核を喘息と間違える |

検査できる施設が限られているため普及していない。早急な保健適応が望まれる。

結核菌の脂質成分に対する抗体を検討する検査法が保健適応となり普及している。ツベルクリン

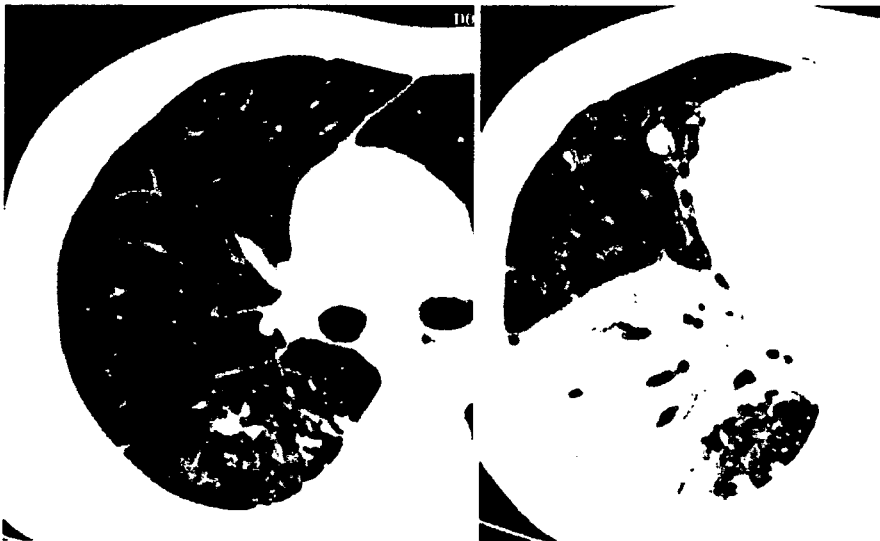


図 4 47 歳女性
39°C の発熱，WBC 13,500，
CRP 7.0，肺炎の治療で改善
せず。

反応や QFT2G と異なり発病しないと陽性にならないし、BCG の影響を受けないため結核診断の補助的有用性はある。しかし、感度が低いため偽陰性が多く、一方、治療終了後も長期間陽性が続くなど、診断に絶対的意味を持つわけではない^{9,10)}。また、非結核性抗酸菌症でも同様の反応をするため両者の鑑別には全く役立たない。

先述したように、臨床検体から結核菌が培養されると結核の確定診断となる。また、結核菌の核酸増幅法陽性や結核に合致する組織像が得られた場合も有力な証拠となる。一方、気管支鏡などを実施しても結核の証拠が得られないこともある。CT 像や臨床経過から結核が強く疑われるが証拠が得られない場合、補助的検査も含めて総合的に判断し治療に踏み切る。2~3 カ月の治療で画像所見の改善が得られた場合、肺結核の最終診断とする。

肺結核の診断の遅れ

当院で紹介されてくる症例をとおして考えられる肺結核診断の遅れの原因を表 2 に示した。

2 週間以上咳・痰が続くが X 線写真を撮らず、上気道炎の治療を漫然と 1~2 カ月継続する例がある。X 線写真には明らかな陰影があり、慌てて紹介されてくることも多い。症状が慢性で 1~2 週間の治療で改善が思わしくない場合、X 線写

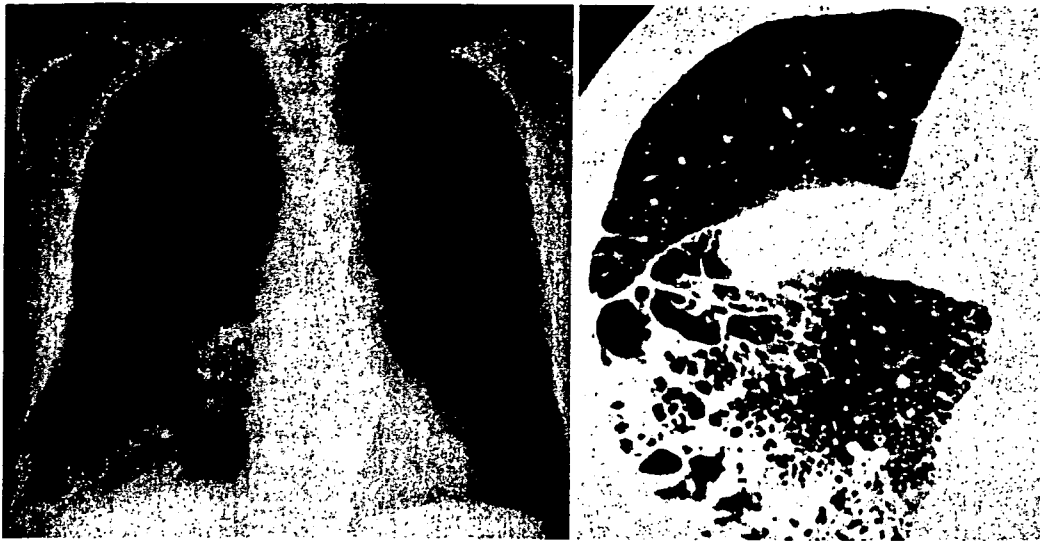


図5 68歳男性。前医で肺炎の治療するも陰影改善しないため転院となる。前医の喀痰3回すべてガフキー0号、PCR-TB(-)、WBC 12,500、CRP 10.5、39°Cの発熱あり。

真をとるか専門医に紹介しなければならない。

X線写真で異常陰影を認識するも肺炎と診断し、改善傾向が明らかでないにもかかわらずエンピリック治療を継続する例がある。比較的若年者で症状や炎症所見が強い例に多い。図4に47歳女性症例のX線写真とCTを提示する。39°C以上の発熱と咳・痰があり、白血球数13,500・CRP 7.0であった。市中肺炎としてエンピリック治療したが、症状などの改善が思わしくない。ガフキーは陰性であった。最終的に気管支鏡検査で肉芽腫と結核菌を検出し診断された。CTでは右下葉の容量減少を伴うコンソリデーションが目立つが、やや上のスライスに木の芽様所見が明らかである。容量減少を伴うコンソリデーション(特に上葉)は結核で時々認められる所見である。

図5は68歳男性、喫煙者のX線写真とCTである。肺気腫を背景として右下葉に広範なコンソリデーションを認める。結節影や木の芽様所見は明らかではない。数回肺炎での入院歴があり、いつもどおりエンピリック治療をしたが全く改善しないため紹介となった。白血球12,500、CRP 10.5、39°C以上の発熱と強い咳が2週間以上続いていた。前医で喀痰検査を3回実施し塗抹・核酸増幅法ともに陰性と紹介状に記載されている。肺

気腫に合併した肺炎として、カルバペネム系とマクロライド系抗生剤の併用療法を開始したが72時間後も発熱・咳ともに全く改善しないため、再度喀痰検査を実施しガフキー6号を検出した。肺気腫が背景にあると結核に特徴的なCT所見が出ていくことが知られている。もう一つ重要な点は、喀痰の質が悪いと中等症以上の症例でも、ガフキーや核酸増幅法が陰性になりうるということである。膿性の部分が多い喀痰を提出するように指導し、できるだけ喀痰の品質評価をする体制を構築しておく。

図6に28歳女性、気管支喘息と誤診された気管支結核例の画像所見を提示した。X線写真でも左下葉の広範な陰影は明らかであるが、胸部X線写真に習熟していない場合、陰影を見逃す危険性が皆無ではない。本例は咳、喘鳴があり、当初気管支炎として一般抗菌薬を、その後気管支喘息としてステロイドの投与を受けている。症状が改善しないため別の病院に入院となり、ガフキー2号を検出。当院転院後気管支鏡で左下葉に気管支結核の合併が確認された。気管支結核の大部分は肺結核に合併するため画像で見逃されることは少ないが、時に気管支結核単独例があり診断に難渋することがある。症状的に喘息と間違われ

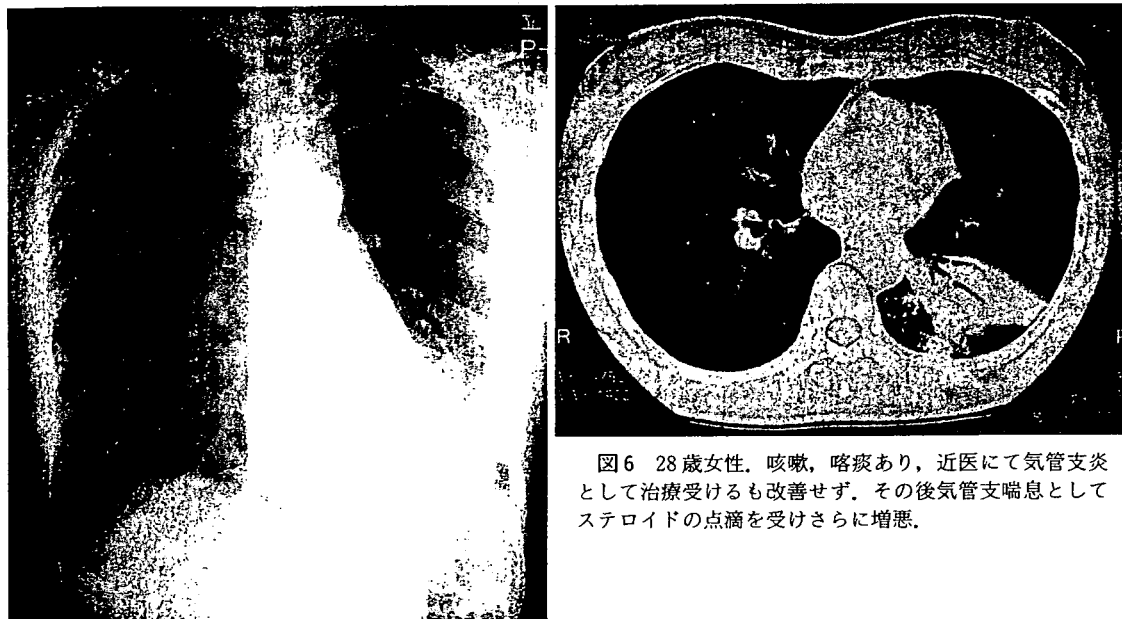


図6 28歳女性。咳嗽、喀痰あり、近医にて気管支炎として治療受けるも改善せず。その後気管支喘息としてステロイドの点滴を受けさらに増悪。

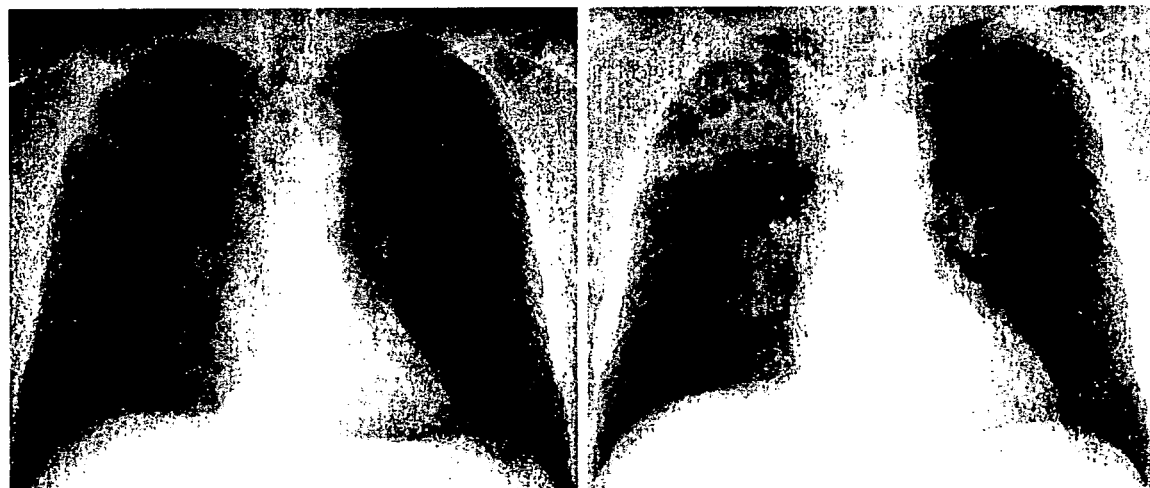


図7 48歳男性，検診発見(a. 42歳時，b. 48歳時)
精査するも診断できず。以後検診のたびに異常を言われていた。6年後陰影が急速に悪化。

る危険性があるうえ、排菌量が一般的に多く院内感染対策上問題になる疾患である。逆にいうと喀痰検査をしておけば見逃されにくいともいえる。

肺結核を疑いX線写真を撮影し異常陰影を認識するが、安直に陳旧性病巣と判断してしまう例も散見する。高齢者には現在でも陳旧性病巣がしばしば認められるが、現在50歳未満の推定結核感染率は10%未満であり、まして治療歴のない

陳旧性病巣はほとんど存在しないと考えたほうがよい。「前から古い傷跡を指摘されている」との患者の申告を鵜呑みにしてはならない。

図7に特に基礎疾患のない48歳男性の画像経過を提示した。42歳時検診で異常影を指摘され精査したが診断つかず経過観察となった。以後毎年X線写真を撮るも、陳旧性病巣として経過観察になっていた。6年後の検診で初めて陰影の急

速な悪化を認め紹介された。精査入院直後にガフキー4号、後に結核菌が培養され確定診断となる。陳旧性病巣と判断するためには少なくとも1年以上前のX線写真と比較して全く変化がないことか、HRCTで活動性結核を示唆する所見がないことを確認する必要がある。確認された場合でも、治療歴のない例では完全に活動性結核が否定された訳ではないので、慎重に経過観察しなければならない。

おわりに

肺結核の見落としをなくするためには、結核の感染と発病の基礎知識と診断の基本プロセスを理解することがまず必要である。ついでしばしば認められるピットフォールを実感することが大切である。しかし、結核罹患率はますます低下し、結核を「体で覚える」機会は減る一方である。忘れたころにガフキー陽性結核がやってくる事態となりかねない。そのため万が一に備えた結核の院内感染対策を普段から実施しておく必要がある。紙数の都合で院内感染対策には言及しなかったので、拙著を含めた文献¹¹⁻¹³⁾を参照し実行していただきたい。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症科監修：結核の統計 2004。財団法人結核予防会，東京，2004
- 2) 鈴木克洋：結核の感染と発病。結核(泉 孝英，網谷良一編)，医学書院，東京，pp37-41，1998
- 3) Im JG, Itoh H, Shim YS, et al: Pulmonary tuberculosis: CT findings, early active disease and sequential change with antituberculous therapy. *Radiology* 186: 653-660, 1993
- 4) 審良正則：結核の診断法，胸部X線分類とCT画像。化学療法の領域 17S-1: 65-69, 2001
- 5) 鈴木克洋，網谷良一：呼吸器感染症の遺伝子診断とその意義。特集 高齢者の呼吸器感染症：診断と治療の進歩。日内会誌 87: 236-242, 1998
- 6) 倉澤卓也，久世文幸，鈴木克洋，他：各種呼吸器疾患患者のツベルクリン反応—第1編 結核患者のツベルクリン反応。日胸 49: 567-572, 1990
- 7) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al: Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 59-64, 2004
- 8) 原田登之，森 亨，穴戸真司，他：集団感染事例における新しい結核感染診断法 QuantiFERON TB-2G の有効性の検討。結核 79: 637-643, 2004
- 9) 豊田丈夫，大角光彦，青柳昭男，他：抗結核菌糖脂質抗原(抗 TBGL 抗原)抗体による結核の血清診断。結核 71: 655-661, 1996
- 10) 螺良英郎，山中正彰，坂谷光則，他：抗酸菌抗体検出法の臨床的有用性に関する共同研究。結核 72: 611-615, 1997
- 11) 鈴木克洋：病院感染対策の進歩—結核菌。日本臨床 60: 2172-2176, 2002
- 12) CDC: Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care facilities. *MMWR* 43: 1-132, 1994
- 13) Davis YM, McCray E, Simone PM: Hospital infection control practice for tuberculosis. *Clin Chest Med* 18: 19-33, 1997

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

標準微生物学 第9版

監修 山西弘一
編集 平松啓一・中込 治

●B5 頁696 2005年
定価7,350円(本体7,000円+税5%)
[ISBN4-260-10453-5]

病原微生物の基本的事項を詳細に解説する点は初版以来の精神を継承しつつ、「微生物の基礎知識」が「感染症学」という臨床にどう展開されるかを理解できるように配慮した。目次を再編し、各章の内容バランスを是正。疫学に関する章を新設するなど、関連分野とのつながりも深め、最近の医学教育の変革に対応する構成とした。

○診療の秘訣○

ツベルクリン反応の解釈

鈴木 克洋 近畿中央胸部疾患センター
臨床研究センター感染症研究部長

ツベルクリン反応（ツ反）は結核菌抗原に対する皮膚の遅延型アレルギー反応から、結核菌特異的な細胞性免疫の有無を判定する検査である。液体培地中に分泌された100種類以上のタンパクの精製物（PPD）を皮内に接種し、48時間後の発赤・硬結の大きさを判定する方法が一般的に使用されている。発赤10mm未満が陰性、10mm以上が陽性であることは医療関係者の常識であろう。また硬結をともなう陽性を中等度陽性、水泡・壊死・二重発赤のどれかをともなう陽性を強陽性、何もない陽性を弱陽性と呼んでいる。ところでツ反陽性は何を意味しているのだろうか。先述したように、結核菌に対する細胞性免疫の存在、そして間接的に結核菌に感染している事実を示しているはずである。

結核菌とヒトとの関係には、感染と発病の2段階が存在する。結核菌の濃厚暴露を受けたヒトの20～50%で非特異的な防御起序を突破してマクロファージ内で結核菌が増殖し、感染が成立する。その後結核菌特異的な細胞性免疫の成立により、結核菌は肉芽腫内に封じ込められて増殖を停止する。感染者の90%はそのまま生涯発病せずに死ぬ。10%の感染者ではその後封じ込めが何らかの理由で破綻し、結核菌が再増殖して病気としての結核となる（発病）。ツ反陽性は発病の前提となる感染の存在を示すとして結核の診断に用いられ、また感染・未発病者を見極めるために多用されてきた。

しかしBCG接種を広範に実施してきたわが国では、ツ反陽性は決して結核感染を意味していない。各年代の結核罹患率の推移から推定した2000年の

結核感染率はたかだか20歳で1.3%、30歳で3.1%である。ところが滋賀大学や東北大学で学生に行ったツ反では約80%が陽性と報告されている。陽性者の大部分がBCGのために陽性になっていることは言うまでもない。PPD中にBCGと結核菌の共通抗原が多数含まれているためである。

そこで強陽性と発赤径30mm以上を併せて強反応とし、真に結核感染を示すものとする判断基準が提唱された。結核の接触者検診で、化学予防の対象となる感染・未発病者を選ぶ際しばしば使用されているが、この基準が正しいという証拠はない。

近年遺伝子工学的手法により結核菌にはあるがBCGにはない抗原が複数開発された。それらの抗原でリンパ球を刺激し分泌されるインターフェロンガンマ量から、BCG接種に影響されずに結核菌特異的な細胞性免疫の有無を判定する検査法（QFT-2G）が市販され、その有用性に関する報告がなされている。ツ反陽性率83%（強陽性率26%）の健常な看護学生のQFT-2G陽性率は2%であり、はるかに推定値に近い。一方排菌陽性の結核確定例のツ反陽性率92%に対して、QFT-2G陽性率は89%とほぼ遜色ない数字となっている。その他集団感染事例や病院職員の院内感染対策に応用され、ツ反よりも有用性が高いことが判明しつつある。同時にわが国ではツ反から結核感染の有無を判定することがほとんど不可能に近いこともはっきりしてきた。今後QFT-2Gが広く用いられることで、結核を取り巻く誤解の一部が晴らされることを期待したい。

バクテック MGIT 960 による薬剤感受性検査 における接種菌量の検討と検査の再現性

¹富田 元久 ¹竹野 華 ¹鈴木 克洋 ¹坂谷 光則
²木下 幸保 ³小林 郁夫

要旨：〔目的〕結核菌の迅速薬剤感受性検査であるミジットシリーズでは分離用 MGIT が陽性になってから、1～2 日後はそのまま、3～5 日後は 5 倍希釈液を接種菌液とすることになっており、菌量が安定せず、薬剤感受性検査の結果が変動する危険性が考えられた。今回われわれは、分離用 MGIT 陽性チューブから調製した接種菌液を用いて、主要 5 薬剤 (INH, RFP, SM, EB, PZA) の感受性結果を比較した。〔対象・方法〕当院で結核の治療中に依頼された 19 例の検体を用いた。分離用 MGIT が陽性を示した後 1 日目、3 日目、5 日目の菌液での再現性とミジットシリーズと従来法との比較を行った。〔結果・考察〕分離用 MGIT が陽性を示した後 1 日目、3 日目、5 日目のチューブから調製した接種菌液の平均菌量 (CFU/ml) はそれぞれ 3.6×10^6 , 1.6×10^6 , 3.1×10^6 であった。3 接種菌でミジットシリーズの結果は完全に一致した。さらに主要 5 薬剤についてミジットシリーズと従来法の全体の一致率は 90% 以上であった。これらの結果は、バクテック MGIT 960 システムは薬剤耐性結核の迅速診断に有用であることを示している。

キーワード：結核菌, バクテック MGIT 960, ミジットシリーズ, 薬剤感受性検査, 再現性

はじめに

1993 年に米国の疾病対策予防センター (CDC) は、結核菌検査に携わる施設に対して薬剤感受性検査結果を 15 日～30 日以内に臨床医に報告するように勧告した¹⁾。わが国では 2000 年の結核菌検査指針改訂で、世界で広く用いられている卵培地による比率法を採用したが²⁾、この方法では判定までに最長 4 週間を費やすため、迅速性において CDC の勧告を満足するものではない。結核菌検査指針を改訂した時点では、液体培地を用いる感受性検査法として MGIT (日本ベクトン・ディッキンソン) 培地によるマニュアル法 (目視判定) が発売されていたが、あまり普及していなかった。2000 年以降は分離用 MGIT へ添加するサプリメントに界面活性剤 (ステアリン酸ポリオキシエチレン) を加えたことで、分離用 MGIT から別途菌液の調整をせずに薬剤感受性検査に移行できるようになった³⁾。さらに 2002 年には、結果判定

が自動化されたバクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (以下ミジットシリーズ) が発売された。ミジットシリーズでは、ストレプトマイシン (以下 SM), イソニアジド (以下 INH), リファンピシン (以下 RFP), エタンブトール (以下 EB) の 4 薬剤 (以下 SIRE) とピラジナミド (以下 PZA) を加えた計 5 薬剤の検査が可能であり、今後 CDC の勧告を満足する薬剤感受性検査としてわが国でも普及していくものと思われる。

ミジットシリーズによる薬剤感受性検査の有用性について、保存菌株を用いた成績はすでに多数報告されているが^{4)~11)}、臨床検体から直接分離した菌液を用いての検討報告は少ない。また、ミジットシリーズの取扱説明書では分離用 MGIT が陽性を示してから 1～2 日後はそのままの培養液を、3～5 日後では培養液を滅菌生理食塩水で 5 倍希釈したものを接種菌液として薬剤感受性検査に用いることとされている。しかしこの方法では菌量

¹独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター, ²独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター, ³日本ベクトン・ディッキンソン株式会社福島ラボラトリー

連絡先: 富田元久, 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター研究検査科, 〒591-8555 大阪府堺市長曾根町 1180 (E-mail: mhtomita@kch.hosp.go.jp)

(Received 7 Jul. 2004/Accepted 4 Oct. 2004)

が一定せず、ひいては薬剤感受性結果に影響を与える恐れがあると考えられた。今回われわれは上記諸点を解明すべく次の項目について基礎的検討を試みたので報告する。①分離用 MGIT が陽性を示してから、1日後、3日後、5日後のチューブから調製した接種菌液の菌数とそれらを用いたミジットシリーズでの薬剤感受性検査の一致率、②ミジットシリーズの薬剤感受性結果と小川培地による比率法、極東結核菌感受性ピットスペクトル-SR、極東結核菌感受性 PZA 液体培地、ピラジナミダーゼ試験の結果の比較。

対象と方法

(1) 試験検体

今回の基礎検討には薬剤耐性菌が必要なことから、当院で薬剤感受性検査が既に終了し入院治療中の患者19例(うち薬剤耐性結核8例)の喀痰を用いた。また感受性検査の標準株として結核菌 H37Rv (ATCC 27294), 結核菌 INH 高度耐性株 (ATCC 35822), 結核菌 SM 高度耐性株 (ATCC 35820), 結核菌 EB 高度耐性株 (ATCC 35837) を用いた。

(2) ミジットシリーズによる検査

喀痰を CCE 液 (日本 BCG サプライ) で雑菌処理し、一定量を3本の分離用 MGIT チューブに接種し、バクテック MGIT 960 で培養した。陽性となった分離用 MGIT について塗抹検査で抗酸菌の確認を行った。雑菌混入の除外は滅菌綿棒を用いてチョコレート寒天培地に培養液の一部を塗布することで実施した。非結核性抗酸菌の混在は PNB 培地 (極東製薬) 上にコロニーの形成がないことで除外した¹²⁾¹³⁾。結核菌の同定はキャピリア TB (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて行い¹⁴⁾¹⁵⁾、菌数の定量はミドルブルック 7H10 寒天培地を用いて菌数 (CFU) の定量を行った。ミジットシリーズの取扱説明書に従い分離用 MGIT が陽性を示した後1日目はそのまま、3日目と5日目の培養液は滅菌生理食塩水で5倍に希釈し接種菌液とし、0.5 ml を薬剤含有 MGIT 培地に、さらに100倍希釈した接種菌液0.5 ml を Growth Control 培地に接種した。ミジットシリーズの判定はバクテック

MGIT 960 で行った。

(3) 他の方法による検査

陽性になった分離用 MGIT の培養液をマイコプロス (極東製薬) に接種し、マックファーランド0.5に達するまで培養した菌液を用い、極東結核菌感受性一濃度培地 (以下、小川比率法)、極東結核菌感受性ピットスペクトル-SR 培地 (以下ピットスペクトル)、極東結核菌感受性 PZA 液体培地 (以下、極東 PZA) による薬剤感受性検査を実施した。ピラジナミダーゼ試験は、分離用 MGIT 陽性の菌液を小川培地で純培養し、発育したコロニーを用い、Wayne により記述された方法¹⁶⁾に従って実施した。薬剤感受性検査に用いた各培地の薬剤濃度は Table 1 に示すとおりである。

(4) 結果の統計解析

平均値の差の検定は Student の t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意と考えた。

結 果

(1) ミジットシリーズの菌液調整についての検討

19例の患者検体の培養で3本の分離培地のすべてが陽性であったのは17例であり、2例は分離培地3本のうち1本が陰性であった。分離用 MGIT 陽性後1日目、3日目、5日目の培養液から調製した菌液を接種した17例中3接種菌液のいずれでも判定可能であったのが15例、3種のうちいずれかの Growth Control 培地の発育がみられず判定不能となったのが2例であった。これら4例のうち3例は MDR-TB であった。今回の比較には3接種菌液いずれでも判定できた15例を用いた。

Table 2 に示すように1日後の菌量は $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$, 3日後 (5倍希釈) では $8 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$, 5日後 (5倍希釈) では $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ の範囲であった。それらの平均菌量はそれぞれ 3.6×10^6 , 1.5×10^6 , 3.1×10^6 であり、3接種菌の菌量に有意の差は認められなかった ($p > 0.1$)。次にミジットシリーズに接種してから判定までに要した日数を比較した (Table 3)。ミジットシリーズ SIRE (SM, INH, RFP, EB 薬剤感受性) で1日後の菌液を用いた場合、その中央値は6日、3日後の菌液で

Table 1 Drug concentrations ($\mu\text{g/ml}$) used for susceptibility testing

Drug	BACTEC MGIT 960 AST	Proportion method ^a	Modified ^b proportion method	Kyokuto PZA test
Isoniazid	0.1	0.2, 1.0	0.2, 1.0	
Rifampin	1.0	40	40	
Streptomycin	1.0	10	10	
Ethambutol	5.0	2.5	2.5	
Pyrazinamide	100			100

^aProportion method on Ogawa egg slant.

^bModified proportion method using a 48-well microplate.

Table 2 BACTEC MGIT 960 AST set inoculum from positive MGIT culture (n=15)

Positive MGIT day	No. of CFU/ml			
	Median	Minimum	Maximum	Mean
1	3 × 10 ⁶	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁷	3.6 × 10 ⁶
3	1 × 10 ⁶	8 × 10 ⁴	5 × 10 ⁶	1.6 × 10 ⁶
5	1 × 10 ⁶	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁷	3.1 × 10 ⁶

Specimens were processed with CCE pretreatment solution (Japan BCG Supply, Tokyo). Each of the treated samples was incubated into 3 MGIT tubes, and they were incubated at 37°C. Cultures on day 3 and 5 post positivity were diluted 1 : 5 with saline.

Table 3 Days required for BACTEC MGIT 960 AST results (n=15)

Positive MGIT day	SIRE test		PZA test	
	Median (range)	Mean	Median (range)	Mean
1	6 (4-6)	5.5	6 (4-8)	6.4
3	7 (6-8)	6.6	8 (5-12)	7.9
5	6 (6-8)	6.4	7 (4-13)	7.6

Table 4 Comparison of the results with BACTEC MGIT 960 AST with those of other methods

Drug	MGIT vs Proportion method ^a				MGIT vs Modified proportion method ^b				
	MGIT Prop.	S	R	Concordance rate (%)	MGIT Mod.	S	R	R	Concordance rate (%)
INH		11	4	100		11	0	4	100
RFP		13	2	100		13	0	2	100
SM		11	4	100		11	1	3	93.3
EB		12	3	100		12	0	3	100

Drug	MGIT vs Pzase ^c				MGIT vs Kyokuto PZA ^d			
	MGIT Pzase	S	R	Concordance rate (%)	MGIT Kyokuto	S	R	Concordance rate (%)
PZA		12	3	100		12	3	100

^aProportion method on Ogawa egg slant.

^bModified proportion method on Ogawa egg medium using a 48-well microplate.

^cPyrazinamidase activity was assayed according to Wayne⁹⁾.

^dKyokuto PZA test medium: 4 ml modified Middlebrook 7H9 broth (pH 6.0).

は7日, 5日後では6日であった。それらの平均値は5.5日, 6.6日, 6.4日であった。ミジットシリーズ PZA (PZA 薬剤感受性) の中央値は, 同じく1日後は6日, 3日後8日, 5日後7日, 平均値は6.4日, 7.9日, 7.6日で有意差はみられなかった (p > 0.1)。15例の薬剤感受性結果は, INH感受性11例, 耐性4例, RFP感受性13例, 耐性2例, SM感受性11例, 耐性4例, EB感受性12例, 耐性3例, PZA感受性12例, 耐性3例であり, 分離用MGITで陽性後1日目, 3日目, 5日目の菌液を接種した感受性検査の結果は100%一致した。

(2) 他の検査法との比較

ミジットシリーズによる薬剤感受性検査と小川比率法, ビットスペクトル, 極東PZA, ピラジナミダーゼ試験の比較成績をTable 4に示した。ミジットシリーズSIREと小川培地比率法の結果は4薬剤すべて一致した。ミジットシリーズSIREとビットスペクトルの比較で,

SMについては93.3%で95%以下であったが, INH, RFPとEBの試験の一致率は100%であった。またミジットシリーズPZAは極東PZAおよびピラジナミダーゼ試験の結果と完全に一致した。なお標準株である結核菌H37Rv, 結核菌INH高度耐性株, 結核菌SM高度耐性株, 結核菌EB高度耐性株を用いた試験では, ミジットシリーズ, 小川比率法, ビットスペクトルの成績は100%一致した。

考 察

固形培地を用いる結核菌の薬剤感受性検査では菌液濃度を濁度計で計測し, 接種する菌量を一定に調整して検査を行っている。一方ミジットシリーズの取扱説明書では分離用MGITが陽性になってから, 1日から2日後ではMGITの培養液をそのまま接種菌液とし, 3日から5日後ではMGITの培養液を5倍希釈して接種することに

なっている。これはMGIT陽性チューブからこのように調製した接種する菌液濃度がほぼ 2×10^5 CFU/mlに相当するという成績から設定されたものである。しかしこの菌液調整法では接種菌量が安定せず薬剤感受性結果が変動する危険性が考えられた。今回のわれわれの検討では、菌数は $8 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$ と有意差はないもののばらつきがみられ、菌数の中央値は1日目で 3×10^6 、3および5日目で 1×10^6 であり、設定の基となった菌量よりも約10倍多い結果となった。しかし、分離培地陽性からの日数によらず主要5薬剤で薬剤感受性検査の結果がすべて一致したことは、取扱説明書どおりの方法による菌液調整で問題がないことを示している。

次にミジットシリーズの薬剤感受性結果と、従来法の結果との比較を試みた。検体数は15例と少数ではあったが、現在の標準法である小川比率法の結果とミジットシリーズSIREは100%一致した。またPZAの薬剤感受性結果も、現在の標準法であるピラジナミダーゼ試験および極東PZA培地の結果と完全に一致した。そのうえミジットシリーズSIREの結果判明までに要した日数の中央値は6日、PZAの結果判明までの中央値は7日と従来の小川培地を用いる方法に比べて大幅な迅速化が可能であった。以上の結果は、ミジットシリーズが迅速、簡便なうえに従来の方法の結果とよく一致する薬剤感受性検査であることを示している。今回は取扱説明書どおりの方法による菌液調整を重点に検討したため、現行の標準法との比較には例数が少なかった。今後例数を増やした追加検討が必要である。

指定期日以内にGrowth Control培地に発育がみられず判定不能になった2例は、INH、RFP、SM、EBの4薬剤耐性であり、小川培地での薬剤感受性検査でも対照培地に発育せず判定不能であった。当院で2002年8月から2004年3月までにミジットシリーズで薬剤感受性検査を実施した850例中(重複なし)Growth Controlに発育せず判定不能となったのはミジットシリーズSIREで4例(0.4%)、PZAで7例(0.8%)のみであった。これらの結核菌の背景は長期治療中の多剤耐性菌で入院治療中に薬剤感受性検査の依頼があった例と当院に初入院した時点で治療がすでに他院で開始されていた例であった。このことから未治療の結核例で判定不能になる例はなく、薬剤感受性検査用ミジットシリーズを日常検査に使用して問題ないを考える。

ミジットシリーズでは分離から薬剤感受性検査まですべて液体培地で行うことから、一般細菌や非結核性抗酸菌の混入により起こる間違った薬剤感受性成績の報告を避けるためにこれまで以上に注意を払わねばならない。今回の検討ではPNB培地試験¹²⁾¹³⁾により非結核性抗酸菌混在の除外を行ったが、同培地の判定には3週間を要

するため迅速性に欠けてしまう。従来から欧米で用いているBACTEC 460TBでは、NAP試験¹³⁾¹⁷⁾により結核菌群と非結核性抗酸菌を迅速に鑑別しているが、MGIT 960では今のところNAP試験を採用していない。今後非結核性抗酸菌の混在を迅速に確認できる方法の開発に期待したい。

また、技術的に習熟することが重要であり、定期的に精度管理を行うことが必要である。

使用直前にサプリメントや各薬剤をMGITチューブに添加する作業が煩雑であること、小川培地と比べてコストが高い点が問題点となる¹⁸⁾。

いくつかの問題点はあるものの、分離用MGITの菌液をそのまま用いることで薬剤感受性検査に移行する時間が短縮され、結果判定が自動化されているバクテックMGIT960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズは、従来の標準法とよく一致する結果が迅速に得られ、臨床的にきわめて有用な方法である。

謝 辞

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社の高橋洋氏の御協力に深謝いたします。

なお本論文の趣旨は、第79回日本結核病学会総会(2004年4月21日、名古屋)で発表した。

文 献

- 1) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: Guest Commentary. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993; 1: 767-770.
- 2) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会:「新結核菌検査指針」. 結核予防会, 東京, 2000.
- 3) 富田元久, 元田博子, 竹野 華, 他: バクテック960専用サプリメントの基礎的検討. 機器・試薬. 2002; 25: 265-267.
- 4) 鈴木克洋, 露口一成, 松本久子, 他: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による結核菌の迅速薬剤感受性検査. 結核. 1997; 72: 187-192.
- 5) 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重: BACTEC MGIT 960システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験: 固形培地を用いる比率法との比較. 結核. 2001; 76: 657-662.
- 6) 阿部千代治: 薬剤感受性検査. 臨床と微生物. 2001; 28: 311-321.
- 7) Bemer P, Palicova F, Rüscher-Gerdes S, et al.: Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002; 40: 150-154.
- 8) Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, et al.: Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC

- 460 TB method and the agar plate method of proportion. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 607-610.
- 9) Kontos F, Maniati M, Costopoulos C, et al.: Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: a multicenter study. *J Microbiol Methods.* 2004 ; 56 : 291-294.
- 10) Aono A, Hirano K, Hamasaki S, et al.: Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA): compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002 ; 44 : 347-352.
- 11) Pfyffer GE, Palicova F, Rüschi-Gerdes S: Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 1670-1674.
- 12) Tsukamura M, Tsukamura S: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by *p*-nitrobenzoic acid susceptibility. *Tubercle.* 1964 ; 45 : 64-65.
- 13) Rastogi N, Goh KS, David HL: Selective inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by *p*-nitro- α -acetyl-amino- β -hydroxypropiofenone (NAP) and *p*-nitrobenzoic acid (PNB) used in 7H11 agar medium. *Res Microbiol.* 1989 ; 140 : 419-423.
- 14) Abe C, Hirano K, Tomiyama T: Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1999 ; 37 : 3693-3697.
- 15) Hirano K, Aono A, Takahashi M, et al.: Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 390-392.
- 16) Wayne LG: Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1974 ; 109 : 147-151.
- 17) Laszlo A, Siddiqi SH: Evaluation of a rapid radiometric differentiation for the *Mycobacterium tuberculosis* with *p*-nitro- α -acetyl-amino- β -hydroxypropiofenone. *J Clin Microbiol.* 1984 ; 19 : 694-698.
- 18) 入江章子, 木下幸保, 富田元久, 他: 新しい抗酸菌検査導入に伴う諸問題(1) -抗酸菌液体培養法(MGIT)を導入した時のコスト-. *医療の広場.* 2001 ; 11 : 34-39.

I κ BNS Inhibits Induction of a Subset of Toll-like Receptor-Dependent Genes and Limits Inflammation

Hirota Kuwata,¹ Makoto Matsumoto,¹ Koji Atarashi,¹ Hideaki Morishita,¹ Tomohiro Hirota,² Ritsuko Koga,¹ and Kiyoshi Takeda^{1,*}

¹Department of Molecular Genetics
Medical Institute of Bioregulation
Kyushu University

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku
Fukuoka 812-8582
Japan

²Department of Gastroenterology and Hepatology
Graduate School of Medicine
Osaka University

2-2 Yamada-oka, Suita
Osaka 565-0871
Japan

Summary

Toll-like receptor (TLR)-mediated immune responses are downregulated by several mechanisms that affect signaling pathways. However, it remains elusive how TLR-mediated gene expression is differentially modulated. Here, we show that I κ BNS, a TLR-inducible nuclear I κ B protein, negatively regulates induction of a subset of TLR-dependent genes through inhibition of NF- κ B activity. I κ BNS-deficient macrophages and dendritic cells show increased TLR-mediated expression of genes such as IL-6 and IL-12p40, which are induced late after TLR stimulation. In contrast, I κ BNS-deficient cells showed normal induction of genes that are induced early or induced via IRF-3 activation. LPS stimulation of I κ BNS-deficient macrophages prolonged NF- κ B activity at the specific promoters, indicating that I κ BNS mediates termination of NF- κ B activity at selective gene promoters. Moreover, I κ BNS-deficient mice are highly susceptible to LPS-induced endotoxin shock and intestinal inflammation. Thus, I κ BNS regulates inflammatory responses by inhibiting the induction of a subset of TLR-dependent genes through modulation of NF- κ B activity.

Introduction

Toll-like receptors (TLRs) are implicated in the recognition of specific patterns of microbial components and subsequent induction of gene expression. TLR-dependent gene expression is induced through activation of two distinct signaling pathways mediated by the Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptors MyD88 and TRIF. These signaling pathways finally culminate in the activation of several transcription factors, such as NF- κ B and IRF families (Akira and Takeda, 2004). The MyD88-dependent gene induction is achieved by an early phase of NF- κ B and IRF-5 activation in macrophages (Kawai et al., 1999; Takaoka

et al., 2005). The TRIF-dependent gene induction is mainly regulated by IRF-3 (Sakaguchi et al., 2003; Yamamoto et al., 2003).

TLR-mediated gene expression regulates activation of not only innate immunity but also adaptive immunity, which provides antigen-specific responses against harmful pathogens (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Pasare and Medzhitov, 2004). However, TLR-mediated activation of innate immunity, when in excess, triggers development of autoimmune disorders and inflammatory diseases, such as SLE, cardiomyopathy, atherosclerosis, diabetes mellitus, and inflammatory bowel diseases (Bjorkbacka et al., 2004; Eriksson et al., 2003; Kobayashi et al., 2003; Lang et al., 2005; Leadbetter et al., 2002; Michelsen et al., 2004). Excessive activation of TLR4 by LPS induces endotoxin shock, a serious systemic disorder with a high mortality rate. Therefore, TLR-dependent innate immune responses must be finely regulated, and underlying mechanisms are now being examined extensively (Liew et al., 2005). Several negative regulators of TLR-mediated signaling pathways have been proposed. Cytoplasmic molecules, such as an alternatively spliced short form of MyD88 (MyD88s), IRAK-M, SOCS1, A20, PI3-kinase, and TRIAD3A, are all involved in negative regulation of TLR pathways (Boone et al., 2004; Burns et al., 2003; Chuang and Ulevitch, 2004; Fukao et al., 2002; Kinjyo et al., 2002; Kobayashi et al., 2002; Nakagawa et al., 2002). Membrane bound SIGIRR, ST2, TRAILR, and RP105 are also implicated in these processes (Brint et al., 2004; Diehl et al., 2004; Divanovic et al., 2005; Wald et al., 2003).

TLR-dependent gene induction is also regulated by nuclear I κ B proteins, such as I κ B ζ , Bcl-3, and I κ BNS. I κ B ζ is indispensable for positive regulation of a subset of TLR-dependent genes, such as IL-6 and IL-12p40 (Yamamoto et al., 2004). In contrast, Bcl-3 and I κ BNS seem to be involved in negative regulation of TLR-dependent gene induction. Bcl-3 was shown to be involved in selective inhibition of TLR-dependent TNF- α production (Kuwata et al., 2003; Wessells et al., 2004). An *in vitro* study indicated that I κ BNS is induced by IL-10 or LPS and selectively inhibits IL-6 production in macrophages (Hirota et al., 2005). Thus, nuclear I κ B proteins differentially regulate TLR-dependent gene expression. However, the physiological role of I κ BNS is still unclear.

In this study, we analyzed TLR-dependent inflammatory responses in I κ BNS-deficient mice. We found that I κ BNS is involved in selective inhibition of a subset of MyD88-dependent genes, including IL-6, IL-12p40, and IL-18. In I κ BNS-deficient macrophages, LPS-induced activation of NF- κ B was prolonged. Accordingly, I κ BNS-deficient mice showed increased production of these cytokines accompanied by high sensitivity to LPS-induced endotoxin shock. Furthermore, I κ BNS-deficient mice were highly susceptible to intestinal inflammation caused by disruption of the epithelial barrier. These findings indicate that I κ BNS inhibits the induction of a group of TLR-dependent genes, thereby preventing excessive inflammation.

*Correspondence: ktakeda@bioreg.kyushu-u.ac.jp

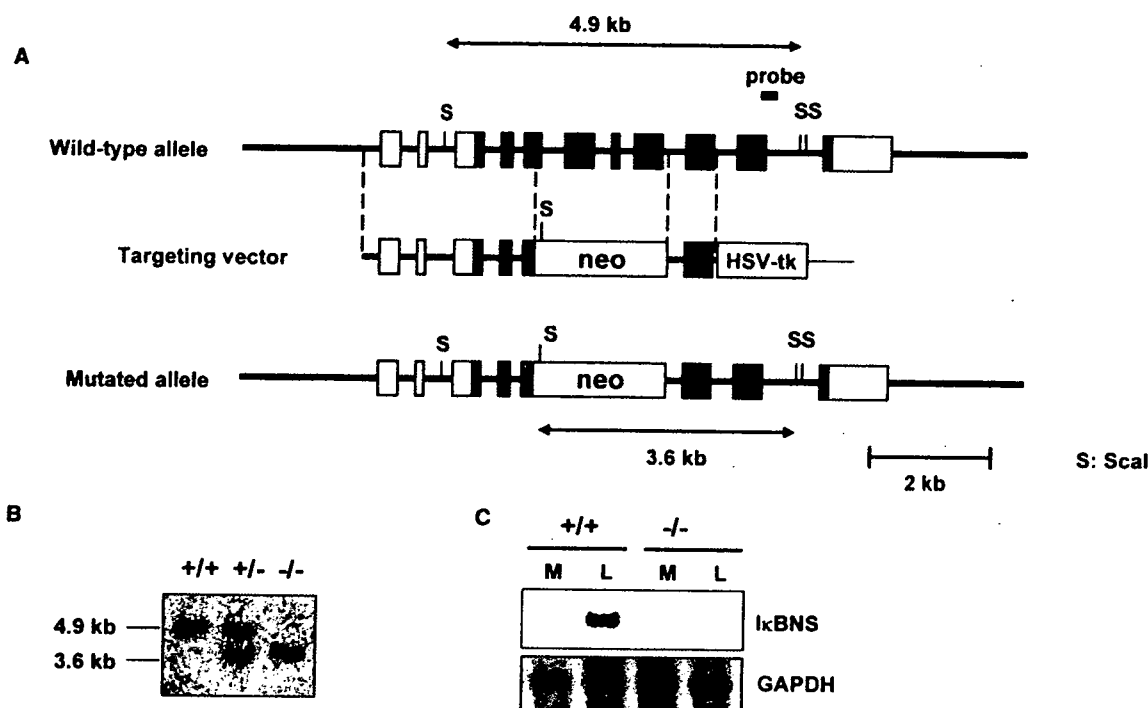


Figure 1. Targeted Disruption of the Mouse *Ikbns* Gene

(A) Maps of the κ BNS wild-type genome, targeting vector, and predicted targeted gene. Open and closed boxes denote the noncoding and coding exons, respectively. Restriction enzymes: S, *Scal*.

(B) Southern blot analysis of offspring from the heterozygote intercrosses. Genomic DNA was extracted from mouse tails, digested with *Scal*, electrophoresed, and hybridized with the probe indicated in (A). The approximate size of the wild-type band is 4.9 kb, and the mutated band is 3.6 kb.

(C) Peritoneal macrophages were cultured with or without 100 ng/ml LPS for 1 hr (L and M, respectively), and total RNA was extracted, electrophoresed, transferred to nylon membrane, and hybridized with the mouse κ BNS full-length cDNA probe. The same membrane was rehybridized with a GAPDH probe.

Results

Targeted Disruption of the κ BNS Gene

To study the functional role of κ BNS in TLR-dependent responses, a null mutation in the *Ikbns* allele was introduced through homologous recombination in embryonic stem (ES) cells (Figures 1A and 1B). κ BNS^{-/-} mice were born alive and grew healthy until 20 weeks of age. We performed Northern blot analysis to confirm that the mutation causes inactivation of the *Ikbns* gene. LPS robustly induced κ BNS mRNA in wild-type macrophages, but not in κ BNS^{-/-} macrophages (Figure 1C).

A previous report indicated that κ BNS is involved in negative selection of thymocytes (Fiorini et al., 2002). Therefore, we first analyzed lymphocyte composition in lymphoid organs such as thymus and spleen by flow cytometry (Figures S1A and S1B). Total cell number and CD4/CD8 or CD3/B220 populations in thymus and spleen were not altered in κ BNS^{-/-} mice. Splenic T cells from κ BNS^{-/-} mice showed similar levels of proliferative responses to IL-2 and IL-7 as did wild-type T cells. Moreover, κ BNS^{-/-} T cells proliferated to almost equal degrees in response to anti-CD3 antibody compared to wild-type T cells (Figure S1C). These results indicate that T cell development and functions were generally unaffected in κ BNS^{-/-} mice.

Increased IL-6 and IL-12p40 Production in κ BNS-Deficient Cells

Since κ BNS expression was induced within 1 hr of LPS stimulation in macrophages (Figure 1B), we stimulated peritoneal macrophages with various concentrations of LPS and analyzed for production of TNF- α and IL-6 (Figure 2A). In macrophages from κ BNS^{-/-} mice, LPS-induced TNF- α production was comparable to wild-type cells, but IL-6 production was significantly increased. We then analyzed whether κ BNS^{-/-} macrophages produce increased amounts of IL-6 in response to other TLR ligands, since κ BNS mRNA was induced by several TLR ligands as well as the TLR4 ligand LPS in a MyD88-dependent manner (Figure S2A). Peritoneal macrophages were stimulated with mycoplasma lipopeptides (TLR6 ligand), Pam₃CSK₄ (TLR1 ligand), peptidoglycan (TLR2 ligand), and imiquimod (TLR7 ligand), and analyzed for production of TNF- α and IL-6 (Figure 2B). In response to these TLR ligands, the production of IL-6, but not TNF- α , was increased in κ BNS^{-/-} mice. We next analyzed the response of bone marrow-derived dendritic cells (DCs). DCs from κ BNS^{-/-} mice produced similar amounts of TNF- α and increased amounts of IL-6 in response to LPS compared to wild-type DCs (Figure 2C). In addition, DCs showed LPS-induced production of IL-12p40 and IL-12p70, and production of these

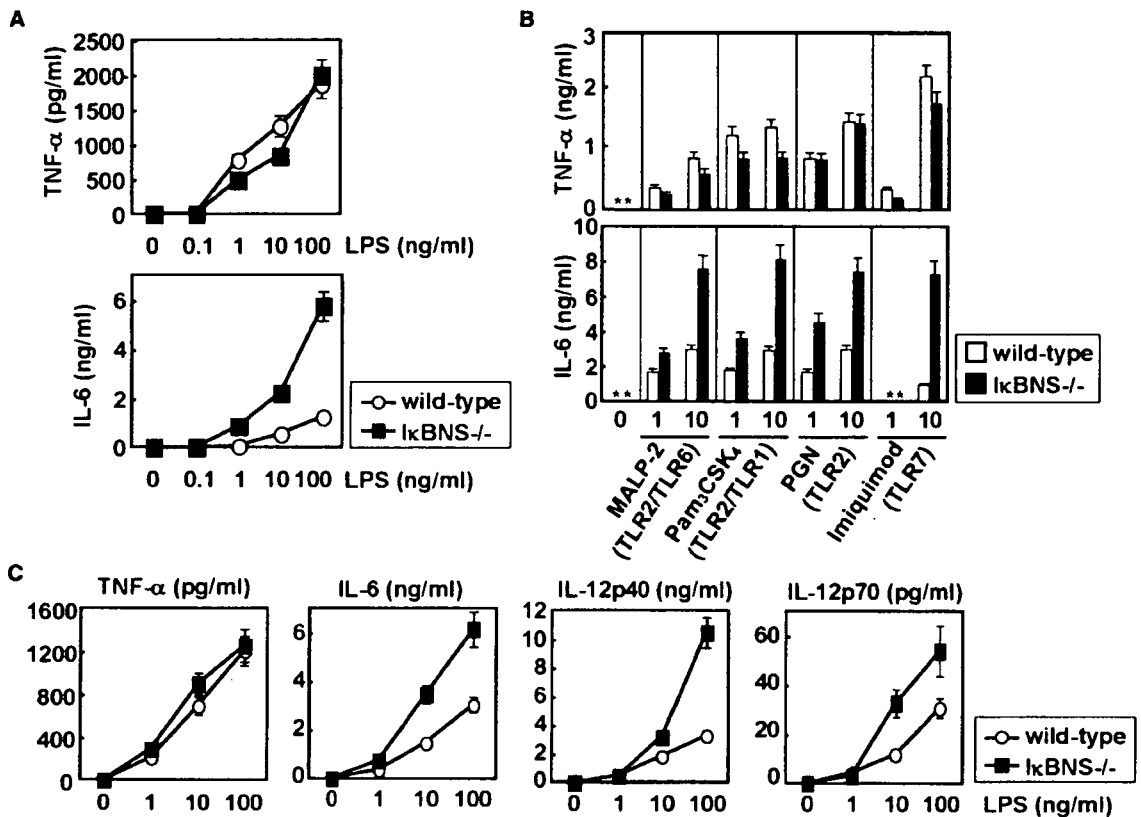


Figure 2. Increased Production of IL-6 and IL-12p40 in $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ Macrophages and Dendritic Cells
(A) Peritoneal macrophages were stimulated with the indicated concentration of LPS for 24 hr. Concentrations of TNF- α and IL-6 in the culture supernatants were analyzed by ELISA. Data are mean \pm SD of triplicate cultures in a single experiment, representative of three independent experiments.
(B) Peritoneal macrophages were cultured with 1 or 10 ng/ml of TLR6 ligand (MALP-2), 1 or 10 ng/ml TLR1 ligand (Pam₃CSK₄), 1 or 10 $\mu\text{g/ml}$ TLR2 ligand (peptidoglycan; PGN), or 1 or 10 $\mu\text{g/ml}$ TLR7 ligand (imiquimod) for 24 hr. Concentrations of TNF- α and IL-6 in the culture supernatants were analyzed by ELISA. *, not detected.
(C) Bone marrow-derived DCs were stimulated with the indicated concentration of LPS for 24 hr. Concentrations of TNF- α , IL-6, IL-12p40, and IL-12p70 in the culture supernatants were analyzed by ELISA. Data are mean \pm SD of triplicate cultures in a single experiment, representative of three independent experiments.

cytokines was significantly increased in $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ DCs. Bone marrow-derived DCs and splenic B cells were analyzed for LPS-induced surface expression of CD86 or MHC class II (Figure S2B). LPS-induced augmentation of surface expression of these molecules was not altered in $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ mice. Thus, macrophages and DCs from $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ mice showed selective increases in TLR-dependent production of IL-6 and IL-12p40.

Enhanced Induction of a Subset of TLR-Dependent Genes in $\text{I}\kappa\text{BNS}$ -Deficient Macrophages

We further analyzed LPS-induced mRNA expression of TLR-dependent genes in $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ macrophages. Peritoneal macrophages were stimulated with LPS for 1, 3, or 5 hr, and total RNA was extracted. Then, mRNA expression of TNF- α and IL-6 was first analyzed by quantitative real-time RT-PCR (Figures 3A and 3B). LPS-induced TNF- α mRNA expression in $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ macrophages was similar to wild-type cells. In the case of IL-6 mRNA, expression levels were comparable between wild-type and $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ macrophages until 3 hr of LPS stimulation. After 3 hr, IL-6 mRNA levels de-

creased in wild-type cells. However, $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ cells displayed further enhanced expression of IL-6 mRNA. TNF- α mRNA was robustly induced within 1 hr of LPS stimulation, and its expression promptly ceased in wild-type cells. In contrast, IL-6 mRNA expression was induced late compared to TNF- α . Because LPS-induced $\text{I}\kappa\text{BNS}$ mRNA expression showed similar patterns as TNF- α mRNA, we hypothesized that LPS-inducible $\text{I}\kappa\text{BNS}$ blocks mRNA expression of genes that are induced late (Figure 3C). Accordingly, we analyzed mRNA expression of other genes that are induced early (*Il-1 β* , *Il-23p19*, or *Ikbz*) or late (*Il-12p40*, *Il-18*, or *Csf3*) in response to LPS. LPS-induced mRNA expression of *Il-1 β* (*IL-1 β*), *Il-23p19* (*IL-23p19*), and *Ikbz* (*I $\kappa\text{B}\zeta$*) was similarly observed between wild-type and $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ macrophages (Figure 3A). LPS-induced expression of *Il-12p40* (*IL-12p40*), *Il-18* (*IL-18*) and *Csf3* (*G-CSF*) was observed at normal levels in $\text{I}\kappa\text{BNS}^{-/-}$ macrophages at the early phase of LPS stimulation (within 3 hr of LPS stimulation) (Figure 3B). However, at the late phase of LPS stimulation (after 3 hr of LPS stimulation), mRNA expression of these genes was significantly enhanced in