

致率97.3%となり、すべての評価基準で95%を超えていた。TortoliらはMGIT ASTと、米国における標準法である¹³⁾ BACTEC 460TBによる結核菌の薬剤感受性検査結果を比較し、MGIT ASTにおいて耐性の過大評価傾向があることを指摘しているが、検査法としては精度に差がないことを報告している¹⁴⁾。また、長谷川らは52株の臨床分離結核菌株を用いてMGIT ASTと小川標準法を比較しており、MGIT AST耐性・小川感受性の傾向とともに92.3%の一致率があることを報告しており¹⁵⁾、同様に富田らは臨床分離結核菌15株についてINH感受性検査結果の一致率が100%であると報告している¹⁶⁾。さらに、今回の結果は小川標準法に対するビットスペクトルSR(感度83.9%、特異度98.4%、一致率97.6%)やウエルバックS(感度79.6%、特異度99.2%、一致率98.3%)と比較しても遜色ない結果であり¹⁷⁾、薬剤感受性検査法として良好な成績と考えられた。また、 κ 指数も0.798であり、ほぼ完全な一致を示すものと考えられた。

現在、日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会は、世界保健機関(WHO)と結核肺疾患予防連合(IUATLD)が指定するSupra-National Reference Laboratories(SRLs)での精度管理に使用され、薬剤感受性が既知となっている結核菌株を用いて、薬剤感受性検査の外部精度評価を行っている¹⁸⁾。同じ精度管理に使用された菌株を用いたMGIT ASTの薬剤感受性検査精度管理に関する報告では、MGIT ASTのINH感受性検査結果に関する感度、特異度、一致率は100%と報告されている¹⁹⁾。これは、外部精度評価上も、MGIT ASTが十分な検査精度を備えていることを保証しているものと考えられる。

試験結果の臨床的影響については、例数が少ないものの、MGIT AST耐性であったが小川標準法の結果が感受性であったことに従って標準的な治療を行った場合は、特に予後に影響はないものと考えられた。また、今回INHを治療から外した例は見られなかったが、MGIT ASTによりINH耐性菌と判定されて治療内容からINHを除外したとしても、臨床的な治療経過に与える影響は治療期間の延長のみであり、治療効果としてはほぼ同等の効果が得られることが示されており^{20)~22)}、検査の迅速化が与える利益に鑑みて、現状2.7%存在する小川標準法との不一致は治療効果に影響を及ぼさないと結論された。

今回の検討でも、これまでの報告と同様に、MGIT ASTにてINH耐性と判定された結核菌株95株のうち、小川標準法で30株が感受性と判定され、不一致率は31.6%(30/95)となった。小川標準法0.2 $\mu\text{g/ml}$ とMGIT AST 0.4 $\mu\text{g/ml}$ との結果を比較すると、この場合の不一致は1株のみとなるが、一方でMGIT AST感受性・小川標準法耐性となる株が8株発生することになる。従っ

て、MGIT ASTにおいてINH感受性判定濃度が0.1 $\mu\text{g/ml}$ と設定されていることがMGIT AST耐性・小川感受性となる主因と考えられる。また、このことからINHについてMGIT AST耐性・小川感受性となる結核菌株については、感受性として一致する株に比べて最小発育阻止濃度(MIC)が高い傾向にあることが予想され、実際にわれわれは不一致が認められた株にBrothMIC MTB-Iにて判定保留となるMIC 1.0~2.0 $\mu\text{g/ml}$ の株が多く認められることを報告しており、INH低濃度耐性を支配するといわれている*inhA*のプロモーター領域でのC→T変異も同定している⁶⁾。これらの株が、治療の結果として将来的に小川標準法でもINH耐性を示すようになるのかは不明であるが、臨床的には興味ある問題である。

さらに今回検討したすべての株の感受性検査結果を疫学的にみると、MGIT ASTの結果をもって薬剤感受性検査の結果とした場合、INHの耐性頻度は8.6%となり、小川標準法を用いた場合の5.9%に比べて有意に高くなる($p=0.017$)。また初回治療患者での耐性頻度はMGIT ASTと小川標準法でそれぞれ5.3%と2.7%となり、有意差を認めた($p=0.005$)。このことは将来的にMGIT ASTが薬剤感受性検査の主流となった時、INH耐性頻度を評価するうえで大きな影響を与える可能性を示している。INH耐性が4.0%を超えている地域では、初回治療を必ず4剤で開始するよう米国CDCは勧告しており、標準療法の内容にも影響を与えることが考えられる。

小川標準法とMGIT ASTとのINH感受性検査結果の不一致について、検査精度と臨床の双方の観点から検討した。結果として、通常小川標準法よりも早く結果が判明するMGIT ASTの感受性検査結果を、小川標準法の結果を待たずに、そのまま利用することに検査精度上も臨床上も問題はないと考えられた。しかしながら、疫学的にはINH耐性頻度を有意に増加させ、治療内容の選択に影響を及ぼす可能性があり、今後も引き続き検討が必要と考えられる。

謝 辞

この研究において、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社ダイアグノスティックシステム事業部の手塚隆善氏にご協力頂きました。深謝申し上げます。

文 献

- 1) 倉澤卓也: 日本結核病学会治療委員会「見直し」声明の背景と要点. 新しい結核医療の基準 平成16年改正. 結核予防会, 東京, 2004.
- 2) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993; 31: 767-770.

- 3) Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, et al.: Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3578-3582.
- 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) 御手洗聡: 抗酸菌検査法の臨床への応用 液体培地や遺伝子を用いた新しい薬剤感受性試験. *結核.* 2004; 79: 169.
- 7) 川辺芳子, 鈴木純子, 倉島篤行, 他: MGITによる薬剤感受性検査と標準法の比較. *結核.* 2005; 80: 251.
- 8) 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: 第7章精度管理. *結核予防会.* 2000, 100-102.
- 9) Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33: 159-177.
- 10) Johansen IS, Thomsen VO, Marjamaki M, et al.: Rapid, automated, nonradiometric susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex to four first-line antituberculous drugs used in standard short-course chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 50: 103-107.
- 11) 御手洗聡 (結核療法研究協議会): 2002年度療研結核菌薬剤耐性全国調査報告 (1). *結核.* 2005; 80: 288.
- 12) 御手洗聡: 結核菌とくに薬剤感受性検査の精度管理に関する研究. 小児結核及び多剤耐性結核の予防, 診断, 治療における技術開発に関する研究; 平成17年度総括・分担研究報告書. 2006; 171-191.
- 13) NCCLS: Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia*, and other aerobic *Actinomycetes*; Approved Standard. NCCLS document M24-A, 2003.
- 14) Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, et al.: Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculosis drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method and the agar plate method of proportion. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 607-610.
- 15) 長谷川美幸, 三次典男, 小山悦子, 他: 液体培地を用いた自動結核菌感受性測定法に関する検討 従来法および NCCLS法との比較. *日本化学療法学会雑誌.* 2004; 52: 371-375.
- 16) 富田元久, 竹野 華, 鈴木克洋, 他: 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. *結核.* 2004; 79: 625-630.
- 17) 大友幸二 (結核療法研究協議会): 2002年度療研結核菌薬剤耐性全国調査報告 (2). *結核.* 2005; 80: 288.
- 18) 御手洗聡 (日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会): 検査センターを対象とした結核菌薬剤感受性試験外部精度アセスメント. *結核.* 2005; 80: 349-358.
- 19) 小林郁夫, 阿部千代治, 御手洗聡: 結核菌薬剤感受性検査のための BACTEC MGIT 960 ASTの評価: 外部精度管理菌株を用いた研究. *結核* 2006; 81: 57-62.
- 20) Mitchison DA, Nunn AJ: Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133: 423-430.
- 21) Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council: Five-year follow-up of a controlled trial of five 6-month regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136: 1339-1342.
- 22) Zierski M: Prospects of retreatment of chronic resistant pulmonary tuberculosis patients. A critical review. *Lung.* 1977; 154: 91-102.
- 23) 山根誠久, 一山 智, 河原 伸, 他: Middlebrook 合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験 (第3報): 微量液体希釈法を原理とする BrothMIC MTBの多施設間評価—施設間再現性と Agar Proportion法との判定互換性の解析. *臨床病理.* 1999; 47: 754-766.
- 24) American Thoracic Society: Treatment of Tuberculosis and Tuberculous Infection in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149: 1359-1374.

Original Article

COMPARATIVE STUDY OF BACTEC MGIT 960 AST AND CONVENTIONAL PROPORTION METHOD USING OGAWA MEDIUM FOR THE DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* TO ISONIAZID

¹Satoshi MITARAI, ³Ikuo KOBAYASHI, ³Chiyoji ABE, ²Masako WADA, ⁴Katsuhiro SUZUKI, ⁵Tetsuya TAKASHIMA, ⁶Yoshiko KAWABE, ⁶Kazuko MACHIDA, ⁷Masao TANO, ⁸Shuichi TAKIGAWA, ⁹Arisu KAMADA, ¹⁰Eriko SHIGETOH, ¹¹Shunji FUJII, ¹²Kenichi MORI, ¹³Hisashi SUYAMA, ¹⁴Shuichi YANO, ¹⁵Takeo KAWASHIRO, and ¹⁶Hideo OGATA

Abstract [Objective] To evaluate the accuracy of drug susceptibility testing to isoniazid with BACTEC MGIT 960 (MGIT AST) comparing with the standard proportion method using Ogawa medium.

[Method] A total of 1,109 *M. tuberculosis* strains, which were selected from the collection of RYOKEN drug resistance survey in 2002, were selected and subjected to the susceptibility testing to isoniazid using MGIT AST and 1% Ogawa standard methods. The results from MGIT AST were compared with the judicial diagnosis by Ogawa. The sensitivity to detect drug resistance, the specificity for susceptible strain, the efficiency of overall agreement, and kappa coefficient were calculated to evaluate the performance. The treatment process, outcome and prognosis were analysed for the patients on whom the tests showed discrepant results.

[Results] Compared with the judicial results, the sensitivity, specificity, efficiency, and kappa coefficient of MGIT AST were 100%, 97.1%, 97.3%, and 0.798, respectively. The strains, which showed discrepant results between MGIT AST and Ogawa, were all susceptible by Ogawa and resistant by MGIT AST. A total of 11 out of 30 discrepant cases were followed clinically and no relapse cases were identified, irrespective of the modification of the treatment regimen. As for the proportion of primary INH drug resistance in the present study, it was 5.3% with MGIT AST but was 2.7% with Ogawa, and the difference was statistically significant ($p=0.005$).

[Discussion] The discrepancies on the results of drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* strains to isoniazid between MGIT AST and 1% Ogawa proportion method have been reported. In the present study, the sensitivity, specificity, and overall efficiency of MGIT AST on the prevalent strains in Japan were all beyond 95%, and considered sufficient as the anti-tuberculosis drug susceptibility testing (AST), though

2.7% of discrepancy was observed. Even for the discrepant cases, there was no difference in the treatment outcome and prognosis. Thus, MGIT AST was confirmed as a reliable AST method comparable to Ogawa standard. However, MGIT AST might increase the proportion of INH resistance if it was used as a major AST method, compared with Ogawa.

Key words: Tuberculosis, Anti-tuberculosis drug susceptibility testing, Isoniazid, Low concentration, MGIT AST

¹Bacteriology Division, Mycobacterium Reference Centre, and ²Research Division, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), ³Diagnostic Systems, Nippon Becton Dickinson Company Ltd. ⁴Respiratory Medicine, National Hospital Organization (NHO) Kinki-chuo Chest Medical Center, ⁵Tuberculosis Medicine, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, ⁶Respiratory Medicine, NHO Tokyo National Hospital, ⁷Respiratory Medicine, NHO Higashi Nagoya National Hospital, ⁸Respiratory Medicine, NHO Nishibeppu National Hospital, ⁹Respiratory Medicine, NHO Sapporo Minami National Hospital, ¹⁰Respiratory Medicine, NHO Higashihiroshima Medical Center, ¹¹Respiratory Medicine, NHO Yamagata National Hospital, ¹²Respiratory Medicine, NHO Higashitokushima National Hospital, ¹³Respiratory Medicine, Nagasaki Municipal Medical Center, ¹⁴Respiratory Medicine, NHO Matsue National Hospital, ¹⁵Respiratory Medicine, NHO Higashisaitama National Hospital, ¹⁶Respiratory Medicine, Double-barred Cross Hospital, JATA

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

Anti-tuberculosis drug susceptibility testing of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo strain

Y. Shishido,* S. Mitarai,† K. Otomo,† M. Seki,‡ A. Sato,‡ I. Yano,‡ A. Koyama,‡ T. Hattori*

* Department of Infectious Disease and Respiratory Medicine, Post-graduate Division, Tohoku University, Miyagi,

† Bacteriology Division, Mycobacterium Reference Centre, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose, Tokyo, ‡ Japan BCG Laboratory, Kiyose, Tokyo, Japan

SUMMARY

SETTING: The *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine is the only vaccine against tuberculosis (TB), owing to its valuable protective effects and low virulence. However, it can occasionally cause systemic infection in immunocompromised hosts. Isoniazid (INH), rifampicin (RMP), streptomycin (SM) and ethambutol (EMB) are known to be effective anti-tuberculosis drugs and are used for the treatment of BCG infections. Unfortunately, there are few studies of the susceptibility of BCG vaccine strains to these drugs.

OBJECTIVE: To measure the minimum inhibitory concentrations (MICs) of BCG Tokyo vaccine products for anti-tuberculosis drugs and assess vaccine safety in terms of drug susceptibility.

DESIGN: We measured the MIC for one seed and five product lots of BCG Tokyo strain for INH, RMP, SM and EMB using Middlebrook 7H11 agar plates.

RESULTS: The MIC results for INH were 0.06 and 0.125 µg/ml for the product and seed lots, respectively. The MIC results for RMP, SM and EMB were 0.25–0.5, 0.25 and 2–4 µg/ml, respectively.

CONCLUSION: Our results indicate that the BCG Tokyo strain was susceptible to the major anti-tuberculosis drugs and treatable even in cases of severe adverse events, including systemic infection.

KEY WORDS: BCG; minimum inhibitory concentration; drug susceptibility

TUBERCULOSIS (TB) is an infectious disease of international importance that remains a major life-threatening disease worldwide. It is estimated that approximately one third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Every year, approximately 9 million people develop active disease and 1.7 million die of TB.¹

Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccines are safe, attenuated live bacteria and have been shown to have valuable protective effects against TB. The BCG Tokyo strain is recognised as a low virulence strain among all BCGs,² and is widely used in several countries as a vaccine strain. If used properly, it protects against the development of TB and the dissemination of TB bacilli. Few severe complications have been reported.³ However, systemic BCG infection may occur frequently when it is administered to immunocompromised hosts with congenital or acquired immunodeficiency such as human immunodeficiency virus (HIV) infection.^{4,5} BCG is contraindicated in symptomatic HIV diseases. When general BCG infection occurs, patients are treated empirically using anti-tuberculosis drugs because there is limited information about the

drug susceptibility of BCG strains. It is therefore very important to evaluate the drug susceptibility of BCG Tokyo strain to ensure the safety of the vaccine.

Isoniazid (INH), rifampicin (RMP), streptomycin (SM) and ethambutol (EMB) are the first-line anti-tuberculosis drugs most commonly used in standard TB treatment regimens. These drugs are currently available even in developing countries. The present study aimed at measuring the minimum inhibitory concentrations (MICs) of these drugs against the BCG Tokyo strain to estimate the effect of clinical treatment in case of infection by the BCG Tokyo strain.

MATERIALS AND METHODS

BCG Tokyo strain

Five lots of vaccine product (number 1003 as 'Lot A', 1960 as 'Lot B', 1036 as 'Lot C', 1061 as 'Lot D', 1998 as 'Lot E') and one seed lot were provided by the Japan BCG Laboratory (Tokyo, Japan) and used in this study. These vaccines were produced by Japan BCG Laboratory for vaccination from the seed lot in 2004. The experiment was carried out in a type II-B

Correspondence to: Yuichiro Shishido, Department of Infectious Disease and Respiratory Medicine, Post-Graduate Division, Tohoku University, 2-1 Seiryō-cho Aoba-ku Sendai, Miyagi 980-8575 Japan. Tel & Fax: (+81) 22 717 8220/(+81) 22 717 8221. e-mail: yshishido@jata.or.jp

Article submitted 16 August 2007. Final version accepted 28 August 2007.

biological safety cabinet at the Research Institute of Tuberculosis, Tokyo.

Minimum inhibitory concentrations

The MICs were measured modifying the proportion method described in M24-A of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, former National Committee for Clinical Laboratory Standards) and in previous reports.^{6,7} The following procedure was used: lyophilised BCG Tokyo products were suspended in 1 ml of distilled water and were cultured on Middlebrook 7H10 agar (DIFCO, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC: BBL Prepared Culture Media, Becton Dickinson) at 37°C until sufficient growth was observed. After harvesting colonies from culture media, each lot strain of BCG Tokyo was dispersed by vortex mixing with glass beads (dispenser tube: Nichibi, BCG Laboratory, Tokyo, Japan) and two drops of 10% Tween 80 (LC-MS, Santa Fe, CA, USA). After vortex mixing for 30 s, 1 ml of distilled water was added to each sample and they were vortexed again for 10 s. The supernatant of each bacterial suspension was transferred to 10 ml of Middlebrook 7H9 broth supplemented with albumin, dextrose and catalase (BBL Prepared Culture Media, Becton Dickinson), and the suspension density was adjusted to an optical density (OD) of 0.05 at 530 nm. These culture tubes were incubated at 37°C with daily mixing and OD checking. When the OD reached 0.2, they were used as the original bacterial suspension.

To prepare 10⁻² dilutions, a 100 µl aliquot was transferred into 10 ml of distilled water. In a similar way, 100 µl of the 10⁻² dilution was added to 10 ml of distilled water for 10⁻⁴ dilutions. One hundred microlitres of the 10⁻² dilution were inoculated onto Middlebrook 7H11 agar plates with anti-tuberculosis drugs at the designated concentrations. Final INH concentrations were 0.03, 0.06, 0.125, 0.5, 1.0 and 2.0 µg/ml. RMP (0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 µg/ml), SM (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16, 32 µg/ml) and EMB concentrations (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16, 32 µg/ml) were adjusted accordingly. The 10⁻²

and 10⁻⁴ suspensions were inoculated onto Middlebrook 7H11 medium containing no drugs for growth control and 1% proportion measurements. These plates were incubated at 37°C. When the 10⁻² dilution control showed sufficient growth (>100 visible colonies), the MICs were measured as the lowest concentration of drug that inhibited more than 99% of the bacterial population compared with the number of colonies on drug-containing media and the 10⁻⁴ growth control. Each test was performed in triplicate.

RESULTS

The MICs of one seed and five product lots were measured in triplicate. The MICs of the anti-tuberculosis drugs varied slightly with the lots tested, but were identical among the triplicate tests. The MICs for all tested drugs are shown in the Table. The MICs of INH were 0.06 µg/ml and the seed lot MIC was 0.125 µg/ml. The MIC in test 3 of lot A was not determined due to contamination. For RMP, the MICs for lots A, B and C were 0.25 µg/ml; those for lots D and E were 0.5 µg/ml. It was considered that the MICs of RMP were between 0.25 and 0.5 µg/ml. For SM, the MICs were determined to be 0.25 µg/ml in all tests. For EMB, the MICs were 4 µg/ml for lots A, B and C, while the MICs for lots D and E were 2 µg/ml. The MIC of EMB was 2–4 µg/ml.

DISCUSSION

The BCG vaccine was developed by Calmette and Guérin in 1921. All BCG vaccines consist of live attenuated *Mycobacterium bovis* bacteria. BCG vaccination is commonly performed on neonates and infants once or twice in middle to high tuberculosis prevalence countries, and more than 100 million children have received BCG in recent years.⁸ Its safety is therefore a priority issue.

BCG vaccination may sometimes cause complications as a pathogen. Local adverse effects of BCG vaccination have at times been observed and usually improve spontaneously, although severe complications in immunocompromised patients have been reported. McKenzie et al. reported systemic haematological dis-

Table MIC values of four first-line drugs for the BCG Tokyo strain

Samples	MIC (µg/ml)											
	INH			RMP			SM			EMB		
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3
Lot A	0.06	0.06	cont	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	4.0	4.0	4.0
Lot B	0.06	0.06	0.06	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	4.0	4.0	4.0
Lot C	0.06	0.06	0.06	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	4.0	4.0	4.0
Lot D	0.06	0.06	0.06	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.25	2.0	2.0	2.0
Lot E	0.06	0.06	0.06	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.25	2.0	2.0	2.0
Seed lot	0.125	0.125	0.125	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

MIC = minimum inhibitory concentration; BCG = bacille Calmette-Guérin; INH = isoniazid; RMP = rifampicin; SM = streptomycin; EMB = ethambutol; cont = contaminated; ND = not done.

semination of BCG in a child with X-linked severe combined immunodeficiency.⁹ Puthanakit et al. reported four cases of BCG infection in HIV-positive children receiving BCG vaccinations at birth; the strain was not indicated.¹⁰

BCG strains have also been utilised for immunotherapy in addition to TB prevention. BCG is injected into the urinary bladder for intravesical instillation therapy in the early stages of bladder carcinoma.^{11,12} The BCG Tokyo strain is popular for such adjuvant therapy in Japan,¹³ whereas the Connaught strain is popular in other parts of the world. In a recent study, Mugiya et al. described good, complete response rates of 84% with BCG Tokyo (40 mg administered every 6 weeks) against bladder carcinoma in situ.¹⁴ However, adverse reactions can also occur after instillation therapy. Eichel et al. reported INH-resistant BCG cystitis successfully treated with RMP and EMB.¹⁵

There is at present no recommended treatment regimen for BCG infection. Anti-tuberculosis drugs are the most potent agents for treating BCG infection. Drug susceptibility testing (DST) of BCG strains has been reported using different methods. Durek et al. evaluated the Connaught BCG strain using a BACTEC 460TB system (Becton Dickinson).^{16,17} DST was performed for 31 drugs, including INH, RMP, SM, EMB and rifabutin. The BCG Connaught strain was susceptible to all of the anti-tuberculosis drugs except pyrazinamide (PZA) (BCG has natural/intrinsic resistance to PZA) and some other drugs used for general bacterial infections. The BACTEC 460 TB system employs critical drug concentrations of 0.1, 1.0, 2.0 and 2.5 for INH, RMP, SM and EMB, respectively. Rousseau and Dupuis reported the DST for a seed lot of the BCG Montreal strain by using solid Dubos medium.¹⁸ They showed that this strain was sensitive to INH (0.2 µg/ml), RMP (1.0 µg/ml), SM (2.0 µg/ml) and EMB (5.0 µg/ml). These reports are not, however, comparable because of the differences in testing methods. There is no standard method for the DST of BCG; however, they may be equivalent to each other in the concept of detecting 1% resistance in the strain population. The proportion method with Middlebrook 7H11/OADC media, which is commonly used for the DST of *M. tuberculosis*, was used for this study.

The MICs indicated in the present study were lower than the critical concentrations employed in the previous studies, except for EMB with MIC close to the critical concentration of BACTEC. In the previous studies, the MICs of EMB to *M. tuberculosis* vary between 0.5 µg/ml and 2.0 µg/ml,^{19,20} in 7H12 BACTEC broth MIC varies between 0.95 and 3.8 µg/ml and on 7H10 agar between 1.9 and 7.5 µg/ml.²¹ Heifets proposed possible guidelines for the interpretation of MIC to *M. tuberculosis* determined in Middlebrook 7H12 broth (radiometric), and MIC 4.0 µg/ml of EMB as moderately susceptible.²² It is possible that the MIC of BCG Tokyo strain for EMB was higher than wild

type *M. tuberculosis*. However, these reports show the tendency of lower MIC in liquid media than solid media. The plasma concentration (C_{max}) of EMB reaches 2.0–5.0 µg/ml²³ and EMB generally works in a time-dependent manner. For this reason it is suggested that EMB could be effective. Although BCG and *M. tuberculosis* are different species, these MICs and pharmacokinetic data would support the potentials of EMB for the treatment of BCG infection. It was therefore considered that, like the BCG Montreal and Connaught strains, the BCG Tokyo strain is susceptible to the four major anti-tuberculosis drugs.

Hesseling et al. reported that BCG in an HIV co-infected infant who received a BCG Danish 1331 strain vaccination developed INH and RMP resistance following treatment with INH and RMP.²⁴ The MICs of the original strain were 0.15 and <0.4 µg/ml for INH and RMP, respectively. However, they had risen above 0.3 and 32 µg/ml after treatment. These results suggest that the strain was already clinically resistant to INH (MIC 0.15 µg/ml for INH), and monotherapy with RMP against BCG resulted in RMP resistance. Su et al. reported two general disseminated cases of the BCG Tokyo vaccine strains.⁵ One of them was treated using anti-tuberculosis drugs (INH, RMP, SM and EMB) based on the susceptible DST results, and the patient recovered. Another case died following one month's treatment with INH, RMP and EMB. However, no DST data were shown in the mortality case and the infant seemed to have died from severe combined immunodeficiency. The MICs of the BCG Tokyo strain indicated in this study were considered less than or equivalent to those of the previous cases, so it was estimated that BCG Tokyo could be treated successfully even in severe adverse events such as systemic dissemination.

The reason why BCG strains have different phenotypic characteristics with respect to drug susceptibility is not clear. BCG has lost several regions of difference (RD) compared to *M. bovis* as the ancestral strain. In particular, the RD1 deletion made a significant contribution to the attenuation of BCG.^{24–26} RD1 encodes a 6 kDa early secreted antigenic target protein (ESAT-6)²⁷ and a 10 kDa culture filtrate protein (CFP-10)²⁸ associated with virulence in *M. tuberculosis* complex. The BCG vaccine therefore has attenuated virulence compared to wild *M. bovis* strains. The loss of virulence apparently occurred through repeated passages.

The BCG strains were originally donated by the Pasteur Institute (Paris, France), and have been subcultured by several tuberculosis institutes around the world (Russia, Brazil, Sweden, Denmark, Japan, etc.) since 1924. The donated BCG strains differ from the original BCG strains due to differences in passage cultivation, culture medium and storage conditions. In 1972, Hesselberg found that a Swedish/Norwegian BCG strain became resistant to INH during the period 1953–1964, which was the reason why the serial sub-

culture system was discontinued and a seed lot system was adopted.²⁹ However, in 2003, low-grade INH-resistant (MIC >0.5 µg/ml) Danish 1331 strains were reported again to the World Health Organization (WHO). The WHO therefore recognises the necessity of a new quality assurance method for BCG vaccines.^{30,31}

The BCG Tokyo strain was obtained from Calmette in the Pasteur Institute in 1924. Passage cultivation of BCG Tokyo strain has been performed strictly according to Calmette's original instructions, while some of the other BCG strain passages were tailored to each institute's needs. The BCG Tokyo 172 strain, which has undergone 172 passages since the Second World War II, has been used as the seed lot for lyophilised BCG Tokyo vaccines. In this study, the BCG Tokyo strain proved to be susceptible to the major anti-tuberculosis drugs; however, the results of this study do not apply to all BCG substrains. It will be necessary to ensure the safety of BCG vaccine by checking susceptibility to other antimicrobial agents.

Acknowledgements

The authors thank Dr G Heinner and Mr B Bell for reading and making suggestions regarding the manuscript.

References

- World Health Organization. WHO report 2005. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO/HTM/TB/2005.349. Geneva, Switzerland: WHO, 2005.
- Landi S, Barbara C, Przykuta K, Held H R. Comparison of freeze-dried vaccines prepared from four different strains of BCG. *Dev Biol Stand* 1977; 38: 19–28.
- Okazaki T, Ebihara S, Takahashi H, Asada M, Sato A, Seki M. Multiplex PCR-identified cutaneous tuberculosis evoked by *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in a healthy baby. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 523–525.
- Su W J, Huang C Y, Huang C Y, Perng R P. Utility of PCR assays for rapid diagnosis of BCG infection in children. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 380–384.
- Albrecht H, Stellbrink H J, Eggers C, Rusch-Gerdes S, Greten H. A case of disseminated *Mycobacterium bovis* infection in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 226–229.
- Heifets L B. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. London, UK: CRC Press, 1991.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardiae*, and other aerobic *Actinomycetes*: approved standard. NCCLS document M-24A. Vol 23, no 18. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.
- Trunz B B, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and military tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 2006; 367: 1173–1180.
- McKenzie R H, Roux P. Disseminated BCG infection following bone marrow transplantation for X-linked severe combined immunodeficiency. *Pediatr Dermatol* 2000; 17: 208–212.
- Pathanakit T, Oberdorfer P, Punjaisee S, et al. Immune reconstitution syndrome due to bacillus Calmette-Guérin after initiation of antiretroviral therapy in children with HIV infection. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1049–1052.
- Morales A, Eidinger D, Bruce A W. Intracavitary bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976; 116: 180–183.
- Debois H, Loupi E, Saliou P. Surveillance of the safety of intravesical BCG therapy in France: quantitative analysis of serious adverse events notified over a period of five years. *Prog Urol* 2002; 12: 604–608. (in French)
- Ikeda N, Honda I, Yano I, Koyama A, Toida I. Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain for superficial bladder cancer: characterization and antitumor effect. *J Urol* 2005; 173: 1507–1512.
- Mugiya S, Ozono S, Nagata M, et al. Long-term outcome of a low-dose intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy for carcinoma in situ of the bladder: results after six successive instillations of 40 mg BCG. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 395–399.
- Eichel L, Erturk E, Disant'Agnes A. Drug resistant *Mycobacterium bovis* cystitis following intravesical bacillus Calmette-Guérin treatment. *J Urol* 1999; 162: 2096.
- Durek C, Rusch-Gerdes S, Jocham D, Bohle A. Sensitivity of BCG to modern antibiotics. *Eur Urol* 2000; 37 (Suppl): S21–S25.
- Durek C, Rusch-Gerdes S, Jocham D, Bohle A. Interference of modern antibacterials with bacillus Calmette-Guérin viability. *J Urol* 1999; 162: 1959–1962.
- Rousseau P, Dupuis M. Antituberculous drug susceptibility testing of *Mycobacterium bovis* BCG strain Montreal. *Can J Microbiol* 1990; 36: 735–737.
- Otten H. Ethambutol (EMB). In: Bartmann K, ed. Anti-tuberculosis drugs. Berlin, Germany: Springer-Verlag 1988: pp 197–204.
- Rastogi N, Labrousse V, Goh K S. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages. *Curr Microbiol* 1996; 33: 167–175.
- Suo J, Chang C E, Lin T P, Heifets L B. Minimal inhibitory concentrations of isoniazid, rifampin, ethambutol and streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated before treatment of patients in Taiwan. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 999–1001.
- Heifets L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in mycobacteriology. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 1217–1222.
- Holdiness M R. Clinical pharmacokinetics of the antituberculosis drugs. *Clin Pharmacokinet* 1984; 9: 511–544.
- Hesseling A C, Schaaf H S, Victor T, et al. Resistant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin disease: implications for management of bacillus Calmette-Guérin disease in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 476–479.
- Mahairas G G, Sabo P J, Hickey M J, Singh D C, Stover C K. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996; 178: 1274–1282.
- Pym A S, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole S T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 2002; 46: 709–717.
- Behr M A, Wilson M A, Gill W P, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999; 284: 1520–1523.
- Sørensen A L, Nagai S, Houen G, et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63: 1710–1717.
- Berthet F X, Rasmussen P B, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 1998; 144: 3195–3203.
- Hesselberg I. Drug resistance in the Swedish/Norwegian BCG strain. *Bull World Health Organ* 1972; 46: 503–507.
- Knezevic I, Corbel M J. WHO discussion on the improvement of the quality control of BCG vaccines. Pasteur Institute, Paris, France, 7 June 2005. *Vaccine* 2006; 24: 3874–3877.

R É S U M É

CONTEXTE : Le bacille de Calmette et Guérin (BCG) à base de *Mycobacterium bovis* est un vaccin unique contre la tuberculose (TB) en raison de ses effets protecteurs valables et de sa faible virulence. Toutefois, il peut causer occasionnellement une infection systémique chez les sujets en état d'immunodépression. L'isoniazide (INH), la rifampicine (RMP), la streptomycine (SM) et l'éthambutol (EMB) sont des médicaments antituberculeux reconnus comme efficaces et peuvent être utilisés dans le traitement des infections par le BCG. Il n'y a malheureusement que peu d'études concernant la sensibilité des souches de vaccin BCG à l'égard de ces médicaments.

OBJECTIF : Mesurer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du vaccin BCG Tokyo pour les médicaments antituberculeux et évaluer la sécurité du vaccin en ce qui concerne la sensibilité aux médicaments.

SCHEMA : Nous avons mesuré les CMI sur plaques d'agar Middlebrook 7H11 pour la souche-mère et pour cinq lots de vaccin de la souche BCG Tokyo à la fois pour l'INH, la RMP, la SM et l'EMB.

RÉSULTATS : Les résultats des CMI pour l'INH ont été respectivement de 0,06 et de 0,125 µg/ml pour la souche-mère et pour les lots de vaccin. Les résultats des CMI pour la RMP, la SM et l'EMB ont été respectivement de 0,25-0,5, 0,25 et 2-4 µg/ml.

CONCLUSION : Nos résultats indiquent que la souche BCG Tokyo est sensible à l'égard des médicaments antituberculeux majeurs qui sont efficaces même en cas d'effets indésirables graves, y compris des infections systémiques.

RESUMEN

MARCO DE REFERENCIA : *Mycobacterium bovis*, el bacilo de Calmette y Guérin (BCG), es la única vacuna contra la tuberculosis (TB), debido a su valioso efecto de protección y a su baja virulencia. Sin embargo, esta vacuna puede causar en ocasiones infecciones generalizadas en individuos inmunodeprimidos. Isoniazida (INH), rifampicina (RMP), estreptomycina (SM) y etambutol (EMB) son medicamentos antituberculosos eficaces y se emplean en el tratamiento de las infecciones por BCG. Desafortunadamente, existen pocos estudios sobre la sensibilidad de la cepa de la vacuna antituberculosa a estos medicamentos.

OBJETIVO : Medir las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los medicamentos antituberculosos contra el BCG de Tokio contenido en las vacunas y evaluar

su seguridad toxicológica en la concentración de sensibilidad al medicamento.

MÉTODOS : Se midieron las concentraciones inhibitorias mínimas de INH, RMP, SM y EMB para un lote de siembra y cinco lotes de vacuna de la cepa BCG de Tokio usando cultivos en placas de agar con Middlebrook 7H11.

RESULTADOS : La CMI para INH fue 0,06 con los lotes de siembra y 0,125 µg/ml con los lotes de vacuna. La CMI para los lotes de vacuna con RMP fue de 0,25 a 0,5 ; con SM fue 0,25 ; y con EMB fue de 2 a 4 µg/ml.

CONCLUSIÓN : Estos resultados indican que la cepa BCG de Tokio es sensible a los principales medicamentos antituberculosos y que es posible tratar los casos de reacciones adversas graves, incluida la infección generalizada.

ポリアクリルアミドを用いた人工痰の長期保存と塗抹鏡検所見の再現性

¹山田 博之 ²松本 宏子 ¹御手洗 聡 ³藤木 明子

要旨：〔目的〕ポリアクリルアミド，THP-1細胞，BCG Pasteur株を材料として調製される人工痰の長期保存安定性と鏡検における陽性度の再現性を検討した。〔方法〕人工痰を室温，冷蔵（4℃）および冷凍（-20℃）で9カ月まで保存した後，塗抹標本を作製し，染色前後の肉眼所見と染色標本の顕微鏡所見を検討した。また，一定レベルの塗抹検査習熟技術をもつ技師により作製された4種類の陽性度の塗抹標本でその再現性を検討した。〔結果〕長期保存安定性については，顕微鏡所見で線維成分にわずかな変化が認められることがあったが，いずれの温度条件で保存された場合でも9カ月まで当初の陽性度を保って利用可能であることが示された。また，塗抹検査習熟技術をもつ技師により作製された標本は，陽性度±の標本36枚中3枚が陰性と判定され一致率が92%であったが，残りの異なる陽性度の人工痰標本はすべて100%の一致率であった。〔考察〕本人工痰は，作製後最低半年は保存可能であり，一定レベルの塗抹検査習熟技術を有する技師による標本作製によって陽性度の高度な再現性を有することが実証され，塗抹検査技術の精度管理や鏡検訓練での有用性が期待される。

キーワード：塗抹検査，人工痰，長期保存，再現性

はじめに

抗酸菌塗抹検査，特に直接塗抹による検査は，喀痰1ml中に約10,000個以上の菌，すなわち，喀痰標本を採取，塗抹する1白金耳（約10 μ l）あたり100個以上の菌が存在すれば，検査対象標本中の抗酸菌の存在を確認できることがわかっており¹⁾，顕微鏡の他に白金耳，スライドグラスと染色試薬一式があれば実行可能な安価かつ迅速な検査である。しかも，結核菌塗抹陽性の結果は他への感染性とも相関し，接触者検診や入退院の際の重要な基準となる。したがって，この検査そのものの精度管理および検査にかかわる技術者のトレーニングはきわめて重要である。

これらの目的には，既知量の結核菌を含む痰を用いて作製されるパネルテストスライドが有効である。しかしながら，これまで，これらの目的を遂行するに当たっては，結核患者由来の喀痰を使うことが一般的であり，そ

の場合，用いられる喀痰に含まれる結核菌数を正確に把握することは困難で，高度に再現性をもったパネルテストスライドセットを作製することはさらに困難であった^{2)~5)}。

そこでわれわれは，実際の喀痰の性状に類似した人工的な痰（以下，人工痰）を，培養細胞（THP-1細胞），培養抗酸菌（BCG Pasteur株）およびポリアクリルアミドを原材料として作製することに成功し⁶⁾，その有用性を検証してきた。今回，この人工痰の有用性をさらに検討するため，その長期保存における安定性について検討した。また，同じ人工痰を用いて作製された塗抹標本の鏡検所見の再現性について，複数の技師により詳細に検討した。

材料と方法

(1) 人工痰作製方法⁶⁾

(i) 175 cm²の培養用フラスコに10%ウシ胎仔血清，

財団法人結核予防会結核研究所¹抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科，²国際部，³研究部

連絡先：山田博之，結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科，〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: hyamada@jata.or.jp)

(Received 15 Aug. 2007 / Accepted 29 Oct. 2007)

penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) を含む 2 mM L-glutamine 含有 RPMI 1640 (Invitrogen) を約 180 ml 入れ、ここにヒト単球由来の THP-1 細胞を 5×10^6 cell 添加して 3~4 週間培養後、細胞培養液を 50 ml ポリプロピレンディスプレイ遠心管に移して、1,200 rpm で 15 分間遠心した。Stericup (pore size 0.2 µm, Millipore) で濾過した 0.1M リン酸緩衝液 (PB, pH.7.4) で細胞ペレットを洗浄、1,200 rpm で 15 分間遠心し、これを 3 回繰り返した。1 フラスコ分の細胞を最終的に 4 本の遠心管に等分した。最後のペレットは、上清を捨てた後、安全キャビネット内で遠心管をペーパータオル上に傾倒して余剰の水分を除去し、約 10 分間乾燥させた。

(ii) 菌の調製：抗酸菌は病原性が低く、結核菌と形態学的に類似している *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 株を用いた。7H9 液体培地で約 2 週間培養し、十分増菌が確認されたところで、Acrodisk filter (#4650, pore size 5.0 µm, Pall Corporation, Cornwall, UK, 日本ジェネティクス株式会社) で濾過して菌の集塊を除去し、分散した単個菌を得た。単個菌の再凝集・集塊形成を防ぐために、この濾過菌液は直ちに氷上に置いた。濾過菌液を 1% 小川培地に接種、4 週間後に CFU をカウントし、 5×10^7 CFU/ml 以上の菌濃度であることを確認した。今回用いた菌液の原液は 1×10^8 CFU/ml で、3+ 用にはこの菌液の 3 倍希釈液を、2+ 用には冷 PB にて 50 倍希釈液を、1+ 用には 500 倍希釈液を、± 用には 5,000 倍希釈液を用いた。

(iii) ポリアクリルアミドの調製：22.2 g アクリルアミド、0.6 g N,N'-メチレンビスアクリルアミドを蒸留水に溶解後、100 ml にメスアップした。これを原液として、遮光して 4℃ で保存した。ポリアクリルアミドの調製は、このアクリルアミド原液 1.75 ml に、0.2 µm フィルターで濾過した蒸留水 6.25 ml、同じく 0.2 µm フィルターで濾過した 5×TBE 2 ml、直前に調製した 10% ペルオキシ二硫酸アンモニウム (過硫酸アンモニウム) 0.1 ml を加え、攪拌し、氷上に置いた。

(iv) 人工痰の調製と保存：前記の乾燥 THP-1 細胞遠心管 2 本分のペレットに菌液 200 µl を混合した後、上記アクリルアミド混合液に重合加速剤である N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) を 8 µl 加えよく攪拌し、速やかに 200 µl を上記の細胞と菌の混合液に加え、十分に攪拌する。1~2 日実験台の上で通常の光 (昼間の間接太陽光または室内照明) が当たる状態で放置して粘性で曳糸性を与えた。陽性度の再現性の検討では、4 種類 (±, 1+, 2+, 3+, Table 1) の陽性度の人工痰を調製し、長期保存安定性の検討には、2+ の人工痰を計 9 本の 50 ml 遠沈管に調製し、これを 3 本ずつに分け、ジップロックバッグに入れて、室温 (実験室内)、

冷蔵 (4℃ 冷蔵庫内)、冷凍 (-20℃ 冷凍庫内) に置き、3 カ月、6 カ月、9 カ月間保存した。これらの人工痰の保存後の性状、肉眼所見を Fujiki の方法⁶⁾により評価した。

(2) 塗抹標本作製、染色、鏡検

上記のとおり作製、保存した人工痰の粘性の高い部分から 1 白金耳分 (約 10 µl) をとり、シランコートスライド (S8443, 松浪硝子工業株式会社) に 2×3 cm の楕円形に塗抹し、常法に従い、乾燥、火焰固定の後、Ziehl-Neelsen (ZN) 染色を行った。乾燥後、カバーガラスで封入し、対物 100 倍の油浸レンズで鏡検、写真撮影を行った。各保存条件、保存期間について、最低 3 枚の塗抹標本作製し、100 視野観察し、ZN 染色陽性菌数を計数した。各条件における 1 視野あたりの平均陽性菌数を算出し、新鮮人工痰塗抹標本の値と比較し、独立 2 試料無作為化検定法⁷⁾により有意差検定を行った。

(3) 人工痰の鏡検所見の再現性の検討

4 段階の人工痰陽性度が塗抹、染色、鏡検するスタッフごとに再現性をもって維持されるかどうかを調べるため、当研究所の国際研修結核対策細菌検査マネージメントコースに参加した研修生のうち、研修中の試験で塗抹標本の作製、鏡検に関して Fujiki の方法⁶⁾による評価で合格点を獲得した研修生 4 名と、その指導者 1 名の計 5 名に、4 段階の陽性度の人工痰の塗抹、染色、鏡検を依頼し、陽性度の再現性を調べた。

結 果

(1) 人工痰の長期保存安定性

陽性度 2+ 相当の人工痰を室温、冷蔵、冷凍の 3 段階の温度条件で、3 カ月、6 カ月、9 カ月間保存して、各時点で人工痰そのものの肉眼所見、さらに、常法に従い、塗抹標本作製し、染色、鏡検して、塗抹標本の肉眼所見と顕微鏡観察による陽性度の検証を行った。長期保存人工痰の肉眼所見は Fig. 1 に示すとおりである。室温、冷蔵で保存された人工痰は最長 9 カ月までの保存で、変化は見られなかったが、冷凍保存した人工痰の肉眼所見は、細胞成分を含む白色ゲル状部分とそれ以外の液体部分が明瞭に分離していた。

次に、塗抹染色標本の肉眼所見、顕微鏡所見を Fig. 2

Table 1 Definition of the positivity grades by IUATLD scale

Grade	Definition
- (negative)	No AFB found in at least 100 fields
±	1-9 AFB/100 fields
1+	10-99 AFB/100 fields
2+	1-10 AFB/field in at least 50 fields
3+	>10 AFB/field in at least 20 fields

AFB: Acid-fast bacilli

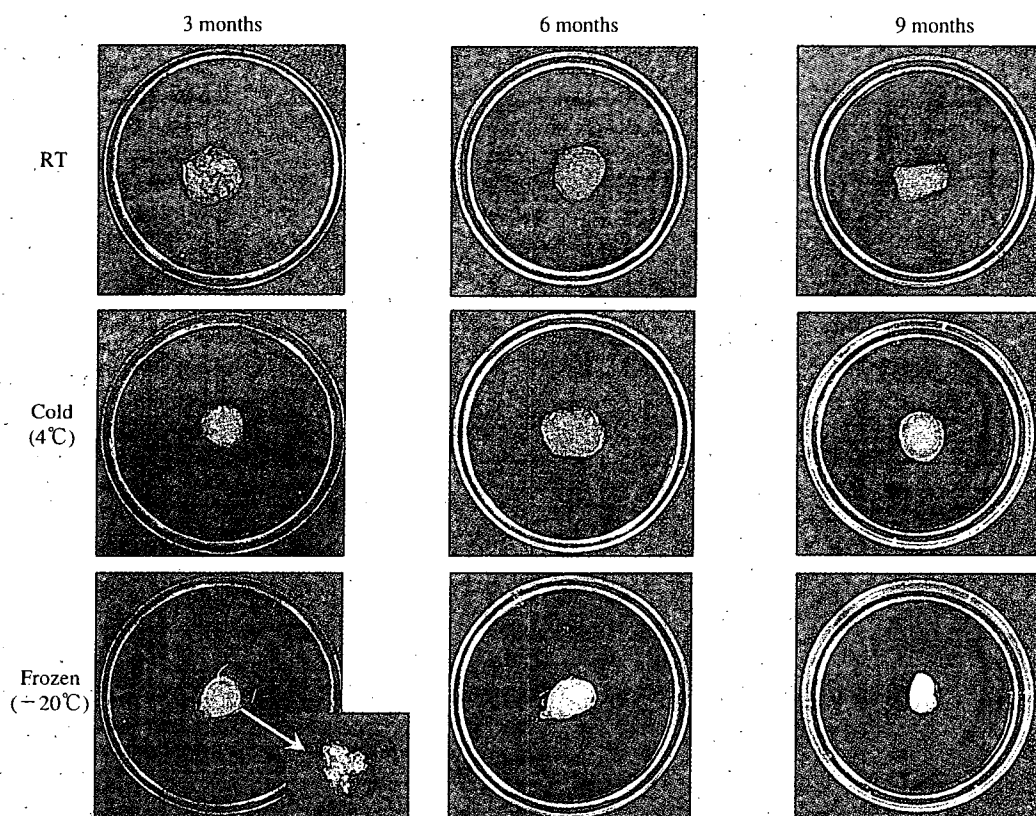


Fig. 1 Macroscopic appearance of long-term stored artificial sputa at different conditions. RT: room temperature. Inset in 3 months of frozen sample shows appearance after loosening cell clump.

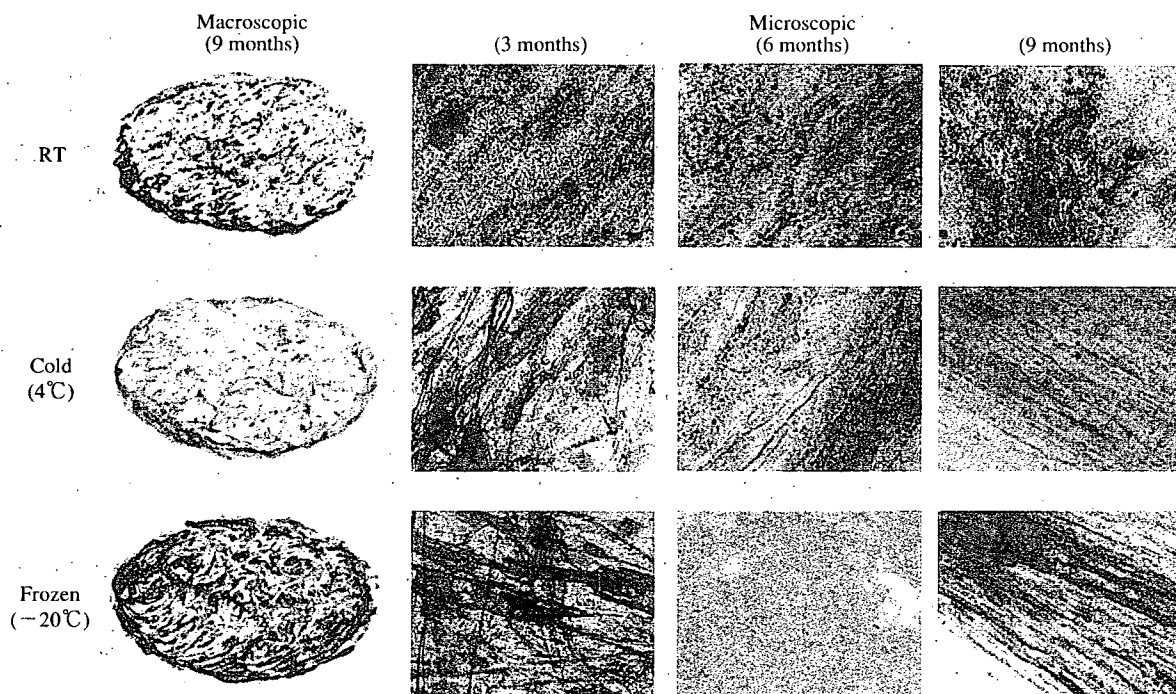


Fig. 2 Macroscopic and microscopic appearance of smears prepared from long-term stored artificial sputa at different conditions. Macroscopic appearance was shown only for 9-month stored samples.

に示す。塗抹染色標本では、肉眼的にはいずれの保存条件、保存期間の標本でも差異は見られなかったが、顕微鏡所見では、室温で6カ月以上保存した人工痰の塗抹標本で線維成分の減少が観察された。しかし、その他の点では人工痰に求められる塗抹および抗酸菌と他の基質成分の染色の再現性について支障はないと考えられた。長期保存人工痰とその塗抹標本の肉眼所見、顕微鏡所見について Fujikiの方法⁶⁾で総合的に評価した結果を Table 2 にまとめた。

表に示すように、冷蔵で長期保存した人工痰およびその塗抹標本は肉眼所見、塗抹標本の顕微鏡所見のいずれにおいても作製直後の人工痰と同様の特徴を保持していた。室温および冷凍保存した人工痰およびその塗抹標本に関しては、室温で長期保存した場合、顕微鏡所見において線維成分の減少が見られた。また、冷凍長期保存人工痰の肉眼所見が細胞成分と液体部分の分離を呈していたが、塗抹標本は新鮮調製標本と同様であった。これらの所見は、保存条件の違いにより生じた変化であるが、人工痰の本来の要件を減じるものではなく、利用者が念頭に置いておけば大きな問題は生じないと考えられる。

さらに、人工痰の塗抹染色標本に見られる抗酸菌の陽性度がこれらの保存条件と保存期間を経た後でも再現性を有するかどうかを検討した。Fig. 3に示すように、各

保存条件、保存期間を経た人工痰の塗抹標本3枚でそれぞれ100視野観察し、そこで観察された抗酸菌染色陽性菌数を300で除した1視野あたりの平均陽性度は、ある程度広がりをもっているが、新鮮人工痰の塗抹染色標本と比較して、有意な差を示す条件はなかった。

(2) 陽性度の再現性に関する検討

本人工痰は調製が容易であり、非病原性抗酸菌を用いていることに加えて、最大の長所は、陽性度の調節が任意に可能であることである。しかし、これまでの検討は著者によるものだけであったため、今回実際にフィールドで本人工痰を用いて塗抹標本を作製した場合に、陽性度が再現されるかどうかを検討した。この検討に当たって、当研究所で実施している国際研修結核対策細菌検査マネジメントコースに参加した研修生のうち、研修中の試験で一定レベルの技術を有すると判断された研修生と指導者の計5名に、4段階の陽性度の人工痰の塗抹、染色、鏡検を依頼した。結果は Table 3に示すとおりである。4段階の陽性度(±, 1+, 2+, 3+)について、5人で合計91枚の塗抹標本を作製して、鏡検した結果、±人工痰の一致率のみが92%であったが、残りの陽性度の人工痰では、1+の人工痰では3枚が±と判定され、2+の人工痰では1+, 3+と判定された標本が各1枚ずつあったが3+の人工痰はすべて3+と判定され、1+,

Table 2 Scores of artificial sputum qualities in long-term storage

Condition Term (Months)	RT storage			Cold storage (4°C)			Frozen storage (-20°C)		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9
Macroscopic appearance of artificial sputum	100	100	100	100	100	100	60	60	60
Macroscopic appearance of stained smear samples	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Microscopic appearance of stained smear samples	100	90	80	100	100	100	100	100	100

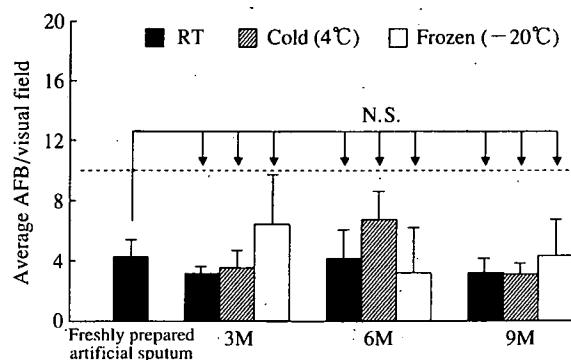


Fig. 3 Reproducibility of positivity in smears prepared from long-term stored artificial sputa. AFB: acid-fast bacilli. Original positivity of the artificial sputum was set as 2+, ie, 1 to 9 AFB per visible field should be observed. Dotted line indicates 10 AFB/field, which discriminates between 2+ and 3+.

Table 3 Examination results of smears prepared from the artificial sputum stock specimen with four positive grades

Stock specimen	Smear results*					Total
	-	±	1+	2+	3+	
±	3	33	0	0	0	36
1+	0	3	16	0	0	19
2+	0	0	1	17	1	19
3+	0	0	0	0	17	17
Total	3	36	17	17	18	91

*Correct results were within the bold line.

Table 4 Consistency between prepared grades of stock artificial sputum and examined smears

Grade of stock artificial sputum	Number of smears	Consistency	Consistence (%)
±	36	33	92*
1+	19	19	100
2+	19	19	100
3+	17	17	100

*3 smears were determined as negative.

2+, 3+のグレードに関しては100%の一致率であった。陽性度±の人工痰の不一致は36枚中3枚が陰性と判断されたものであった (Table 4)。

考 察

結核菌塗抹検査は、結核患者を検出するための手段として、迅速かつ安価な優れた方法である。抗酸菌塗抹陽性結果は感染性や入院適応の判断に必須である。したがって、この検査の精度保証や検査に携わるスタッフの技術標準化トレーニングは重要である。そのためには、標本内に含まれる抗酸菌染色陽性の菌量が明らかな材料から作製され、陽性度高精度の再現性があるパネルテストスライドが必要である。しかし、これまで、これらの条件を満たす材料を得ることは困難であった。われわれが開発した人工痰は、その肉眼所見、顕微鏡所見が実際の喀痰に類似しているだけでなく、添加する菌量を調節することにより陽性度の設定が容易であり、なおかつ非病原性の抗酸菌を使用していることから、パネルテストスライドの作製にきわめて有用であることを既に報告している⁹⁾。今回、この人工痰が、途上国を含む一般検査室で用いられることを考慮して、作製後いくつかの温度条件で、異なる期間にわたって保存した場合、性状ならびに当初の陽性度が維持されるかどうかを検討した。

その結果、室温、冷蔵、冷凍の温度条件で、最長9カ月まで保存した人工痰の性状、および塗抹標本の顕微鏡所見は、調製直後の人工痰と顕著な差がなく、Z-N染色後の陽性度も維持されていることが明らかになった。

また、今回の人工痰を当研究所で作製し、途上国など

に送付した後、現地のスタッフが塗抹標本を作製、染色した場合に、当初の陽性度が維持され、必要とするパネルテストスライドセットの作製が可能かどうかを調べるために、当研究所国際研修結核対策細菌検査マネジメントコースに参加した研修生と指導者に本人工痰を用いて、塗抹標本の作製、染色、鏡検を依頼し、当初の陽性度に応じた結果が得られるかどうかを検討した。その結果、4段階の陽性度で、±の人工痰で一致率が92%であったが、1+, 2+, 3+の人工痰はすべて100%の一致率であった。このことから、本人工痰は、一定レベルの技術を有するスタッフにより塗抹標本が作製されれば、当初の陽性度が維持され、現地でのパネルテストスライドセットの作製が可能であることを示している。

これらの結果は、本人工痰が、これまでに報告されているメチルセルロース法⁹⁾や、実際の抗酸菌陽性喀痰と陰性喀痰を用いる方法で作製される人工痰⁹⁾と比較して、人工痰そのものの性状のみならず、その陽性度の再現性の高さ、調製の容易さ、バイオハザードレベルの低さなど、あらゆる面で優れていることを示している。本人工痰は、基質がポリアクリルアミドであるため、添加した抗酸菌は調製後数日以内に死滅し、培養技術の評価には用いられないが、反面、室温で保存した場合でも雑菌の増殖、コンタミネーションが生ずる危険がなく、長期保存に適していると考えられる。さらに、NaOH法やNALC法で実際の抗酸菌陽性痰を用いる場合のように⁹⁾、あらかじめ材料をホルムアルデヒドのような毒性の高い試薬により固定する必要がないので、有害な薬品の暴露を受ける危険もない。

本人工痰作製に関する唯一の問題は、細胞培養に必要な培地に添加するウシ胎仔血清が高価な点である。現在、無血清培地を用いて THP-1細胞を培養する方法を検討中であり、これが可能になれば、われわれの試算で、当初塗抹標本1枚あたり約120円必要であった経費が、半分以下の50円を切ることができる。

これらの点から、本人工痰は塗抹検査の外部精度評価、検査室のスタッフのトレーニングのためにきわめて有用であり、今後広く応用されることが期待される。

謝 辞

この研究は2005年度厚生労働科学研究補助金・新興・再興感染症研究事業「小児結核及び多剤耐性結核の予防、診断、治療における技術開発に関する研究」から研究費の補助を受けて実施された。

文 献

- 1) Toman K: Tuberculosis case-finding and chemotherapy. Questions and answers. WHO, Geneva, 1979, 6-7.
- 2) Lan NTN, Wells CD, Binkin NJ, et al.: Quality control of smear microscopy for acid-fast bacilli: the case for blinded re-reading. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999; 3: 55-61.
- 3) Martinez-Guarneros A, Balandrano-Campos S, Solano-Ceh MA, et al.: Implementation of proficiency testing in conjunction with a rechecking system for external quality assurance in tuberculosis laboratories in Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003; 7: 516-521.
- 4) Tuberculosis Division: Tuberculosis bacteriology-priorities and indications in high prevalence countries: position of the technical staff of the Tuberculosis Division of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005; 9: 355-361.
- 5) Yamada H, Mitarai S, Aguilan L, et al.: Preparation of mycobacteria-containing artificial sputum for TB panel testing and microscopy of sputum smears. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006; 10: 899-905.
- 6) Fujiki A: AFB microscopy training. The Research Institute of Tuberculosis, Tokyo, 2005, 9-38.
- 7) 石居 進: 生物統計学入門. 培風館, 東京, 1975, 151-153.
- 8) de Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, et al.: Laboratory services in tuberculosis control. Organization and management Part I. WHO, Geneva, 1998, 42-43.
- 9) Aziz MA, Ba F, Becx-Bleumink M, et al.: External quality assessment for AFB smear microscopy. Association for public health laboratories, Washington DC, 2002, 1-111.

Original Article

STABILITY FOR LONG-TERM STORAGE AND REPRODUCIBILITY OF POSITIVITY IN THE PANEL TEST SLIDE PREPARED WITH THE POLYACRYLAMIDE-BASED ARTIFICIAL SPUTUM

¹Hiroyuki YAMADA, ²Hiroko MATSUMOTO, ¹Satoshi MITARAI, and ³Akiko FUJIKI

Abstract [Objective] A novel artificial sputum has been developed using polyacrylamide, cultured THP-1 cell and BCG-Pasteur. Smears prepared with this artificial sputum are similar to actual sputum and has feasibility to set any positivity grades. Long-term storage and reproducibility of the positivity was examined to support further availability.

[Method] The artificial sputa were stored for up to 9 months at room temperature, 4°C and -20°C. Then, smears were prepared and their macroscopic and microscopic appearance were examined compared with smears from freshly prepared artificial sputum. Furthermore, smears with different positivities (\pm , 1+, 2+ and 3+) were prepared and examined by several trained technicians, and the reproducibility of the original sputum positivity was determined.

[Results] Macroscopic and microscopic appearance of smears prepared from long-term stored artificial sputum showed little changes compared with smears of freshly prepared artificial sputum. The positivity of these smears fell in their original grade. A total of 91 smears were prepared from artificial sputum with different positivity and examined by trained technicians. Although 3 out of $36 \pm$ smears were

determined as negative, all of the remaining smears were evaluated correctly.

[Discussion] This study confirmed that the artificial sputum and the smears have long-term storage stability and reproducibility in the positivity. These results suggest that the artificial sputum can be widely used to perform external quality assessment in many countries, including high prevalence countries.

Key words: Smear examination, Artificial sputum, Long-term storage, Reproducibility

¹Bacteriology Division, Mycobacterium Reference Center,

²Department of International Cooperation, ³Department of Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to: Hiroyuki Yamada, Bacteriology Division, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: hyamada@jata.or.jp)

結核菌の分子疫学的解析

—多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較—

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ¹岡田 全司
²坂谷 光則

要旨：〔目的〕多剤耐性結核菌株と全剤感受性結核菌株の分子疫学的解析。〔対象〕国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離，同定された多剤耐性結核菌109株（MDR-TB群）と，全剤感受性結核菌226株（S-TB群）。〔方法〕IS6110を用いたRFLP法およびSpoligotyping法。〔結果〕RFLP法の結果，クラスター形成率はMDR-TB群，S-TB群ともに約43%を占め有意差は認められなかった（ χ^2 検定 $p=0.51>0.05$ ）。Spoligotyping法の結果，Beijing familyはMDR-TB群で77.1%（84株），S-TB群で84.5%（191株）認め，有意な差はなかった（ χ^2 検定 $p=0.09>0.05$ ）。〔結論〕MDR-TB群とS-TB群では，RFLPクラスター形成率，Spoligotyping法におけるBeijing familyの占める割合はほぼ同程度に認められ，両群の感染伝播力に大きな差がない可能性が支持された。

キーワード：結核菌，RFLP法，Spoligotyping法，多剤耐性，全剤感受性

はじめに

近年結核の感染状況を把握するために，様々な方法による分子疫学的解析が行われてきた。現在，菌株の識別能が高く多型性に富んだ方法として，結核菌染色体上の比較的安定した挿入配列IS6110をプローブとしたRestriction fragment length polymorphism (RFLP)法が世界的に標準化されている¹⁾²⁾。しかし，IS6110コピー数が1～5本以下の菌株では識別能が低いことと，煩雑な手技と大量のDNAが必要となる欠点から，より簡便かつ短時間で解析可能な別の遺伝子マーカーによる二次的型別が必要になってくる。Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping)法はRFLP法の二次的解析のひとつとして³⁾，アジアを中心として広汎に分布し強い感染伝播力を有したBeijing familyの鑑別が可能であり，広範囲の感染状況の解明に有益である。これらRFLP法とSpoligotyping法を用いて結核菌を分子疫学的に解明した報告は多いが^{4)~8)}，結核菌を多剤耐性結核菌（MDR-TB）群と全剤感受性結核菌（S-TB）群とに分類した比較検討は報告されておらず，単独薬剤耐性菌〔isoniazid (INH)，

streptomycin (SM)]についての検討がなされているのみである⁹⁾。また従来感染伝播力が低いといわれてきたMDR-TBによる集団感染事例が近年報告されている¹⁰⁾。したがって今回，RFLP法，Spoligotyping法を用いて，当センターにおいて分離，同定された結核菌を対象に，薬剤感受性の違いによるクラスター形成率とBeijing familyの割合の比較を試みた。

方 法

〔対象〕

2001年1月1日から2005年12月31日の期間，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離，同定された結核菌2827株中，下記の方法で示した2種類の薬剤感受性試験で少なくともINHとrifampicin (RFP)に対して耐性を示した多剤耐性結核菌109株をMDR-TB群とした（3.9%）。そのうちINH，RFPのみに耐性を示した株は4株（すべてのMDR-TBに占める割合は3.7%）であった。またethambutol (EB)を加えた3薬剤に耐性を示した株は61株（56%），pyrazinamide (PZA)を加えた4薬剤に耐性を示した株は1株（0.9%），SM

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター，²内科

連絡先：吉田志緒美，独立行政法人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，〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
(Received 16 Nov. 2006/Accepted 28 Feb. 2007)

を加えた5薬剤に耐性を示した株は2株(1.8%)であり、残りの41株(37.6%)は上記5薬剤に加えて二次抗結核薬のいずれかに対しても耐性を示していた。また世界保健機関(WHO)は2006年11月に招集した Extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) 専門委員会において INHとRFPだけでなく特定の Second-line drugs (少なくとも fluoroquinolone の中の1種と、注射薬の capreomycin, kanamycin, amikacin の中の1種)にも耐性をもつ結核菌を XDR-TB と定義しているが¹¹⁾、今回35株(MDR-TBの32.1%)に認められた。

MDR-TB群と比較するために必要な相当数の全剤感受性結核菌として2003年1月1日から8月31日の一定期間、当センターにて分離、同定された226株をS-TB群とした。

性別はMDR-TB群では男性81名(74.3%)、女性28名(25.7%)であり、S-TB群では男性163名(72.1%)、女性63名(27.9%)であった。平均年齢は、MDR-TB群では55.5±15.6歳、S-TB群では57.2±19.2歳であった。

治療歴は、MDR-TB群では初回治療37名(33.9%)、再治療72名(66.1%)であり、またXDR-TB患者のうち7名(XDR-TBの20%)は初回治療例であった。S-TB群では初回治療190名(84.1%)、再治療36名(15.9%)であった。

当センターは大阪府堺市に属しており、今回対象とした335菌株由来の患者の居住地は当センター周辺の堺市を中心とした大阪湾沿岸の泉州地域から和歌山県北部までの比較的広範囲にまたがる地域であった。また結核罹患率の高い大阪市西成区および浪速区からの患者はMDR-TB群で1名(0.9%)、S-TB群で22名(9.7%)であった。外国籍をもつ患者はMDR-TBで4名(3.7%)認められ、すべて中国籍であったが、S-TB群に外国籍をもつ患者は認められなかった。すべての患者の疫学調査は初診時の聞き取り調査用紙に基づいて行った。発症状況から明らかに家族内感染と思われる事例はMDR-TB群では認められず、S-TB群で4事例(構成員各2名)認められた。集団感染と思われる事例はMDR-TB群で3事例(構成員5名、3名、2名)認められたが、S-TB群での事例はなかった。すべての患者間での地域内感染と見られる事例は認められなかった。

〔方法〕

同定

菌株の同定は結核菌群同定用アキュプロープ結核菌群同定キット(極東製薬)と結核菌群同定試薬キャピリアTB(日本ベクトン・ディッキンソン)で行った。

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験にはバクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズ(MGIT-AST法:日本ベ

クトン・ディッキンソン)と結核菌感受性ピットスペクトル-SR法(極東製薬)を用いた。PZAの薬剤感受性試験は結核菌感受性試験PZA液体培地法(極東製薬)を用いた。耐性の判定基準濃度はMGIT-AST法でINH 0.1 µg/ml, RFP 1.0 µg/ml, EB 5.0 µg/ml, SM 1.0 µg/mlとし、ピットスペクトル-SR法でINH 0.2 µg/ml, RFP 40 µg/ml, EB 2.5 µg/ml, SM 10 µg/mlとした。PZAは400 µg/mlとした。

RFLP法

van Embdenらの方法²⁾に準拠して行った。結核菌からのDNA抽出には0.1 mmのガラスビーズを用いて、Beads-beaterによるフェノールクロロホルム・イソプロパノール処理を行った。得られたゲノムを制限酵素Pvu II (TAKARA BIO)で消化、電気泳動後サザンブロッティングを行い、IS6110をプローブとして、ハイブリダイゼーションさせ、ジゴキシゲニン発色でIS6110のバンドを検出した。バンドの解析にはMolecular Analyst Software (Bio-Rad)のDouble gel analysis法を用い、各々のレーンごとの補正として、λ/Hind IIIとφX174/Hae IIIの2種類のマーカーを使用した。メンブレン間の補正はH37Rvを標準株として用いた。

Spoligotyping法

結核菌DNAのSpacer配列を、directly repeated sequence (DR)のもとにデザインされた2種類のプライマー(ピオチン標識)を用いてpolymerase chain reaction (PCR)にて増幅し、43の合成オリゴヌクレオチドを固相化したメンブレン(Isogen Bioscience BV)に、Immunitics社のMiniblotter 45を用いてハイブリダイゼーションさせた³⁾。パターンを検出にはECL発色システムを用いて個々のSpacer配列の有無を解析した。

結 果

RFLP法

IS6110コピー数は全対象結核菌335株において1~25本の分布を示し、11本にピークを認めた。そのうちMDR-TB群では9~25本のコピー数が認められ、10本にピークを認めた。一方S-TB群では1~20本の間に分布し、ピークは13本に認められ、両群ともに多型性が認められた。またコピー数5本以下の菌株はS-TB群にのみ3株(コピー数1, 3, 4本)認められた(Fig. 1, 2)。同一のバンドパターンを示すクラスターはMDR-TB群では12種類(47株)、S-TB群では20種類(99株)が認められた。クラスターの大きさ(構成員数)はMDR-TB群で2~11を示し、構成員11名のクラスターaグループと、構成員7名のクラスターeグループには両グループ内での患者の間に疫学的関連はなかった。一方S-TB群では2~16を示し、構成員6名が2つ、8名が2つ、

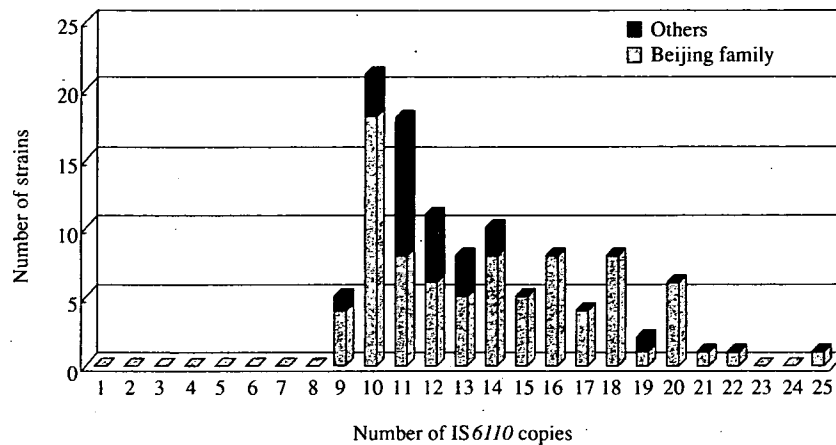


Fig. 1 Distribution by number of IS6110 copies: multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains

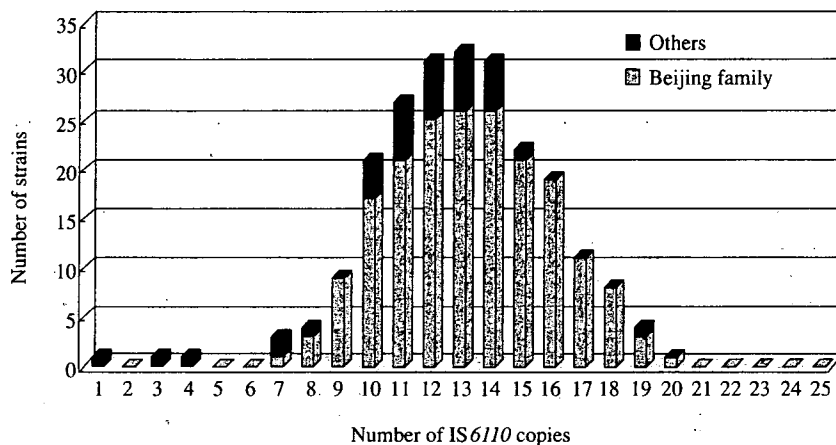


Fig. 2 Distribution by number of IS6110 copies: susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains

9名が1つ、14名、16名が各1つであった。家族内感染は構成員3名のtグループで2名、6名のaグループで2名、14名のcグループで2名、16名のfグループで2名に認められた (Table 2)。

クラスター形成率はMDR-TB群で43.1%、S-TB群は43.8%、全体で43.6%を示した (Table 1)。そのうち、MDR-TB群クラスターのパターンaはS-TB群クラスターのパターンaと同じパターンを示し、MDR-TB群クラスターのパターンiはS-TB群クラスターのパターンiと同じパターンを示した (Table 2)。

西成区および浪速区に居住地をもつ患者由来の22株 (S-TB群) のうち6株が5種類のクラスターに属し、残り16株はクラスターを形成しなかった。

外国籍をもつ患者由来のMDR-TB群に属する4株はクラスターを形成しなかった。

Spoligotyping法

今回われわれは、Spacer配列1~34の発色を認めない Beijing familyの占める割合を求めるにあたって、35~

43配列を有する典型的な Beijing型に加え、Mokrousovaら¹²⁾の定義による Beijing型のパターンに類似した Beijing-likeも Beijing familyとして全株を分類した。その結果、Beijing familyはMDR-TB群で84株 (77.1%)、S-TB群では191株 (84.5%)、全体で275株 (82.1%)を占めた。一方 Beijing family以外の遺伝子型をもつ株で International Spoligotyping database SpolDB3分類¹³⁾に示される familyに分類された株はMDR-TB群の25株中13株と、S-TB群35株中の24株と判定された。それ以外の24株 (MDR-TB群12株、S-TB群12株)は SpolDB3の family definitionに分類されない Unique株と判定された (Table 1)。また Uniqueパターンを示した株の中に IS6110コピー数5本以下を示した S-TB群の3株が含まれていた (Table 3)。

RFLP法でクラスター形成を認めた Beijing familyはMDR-TB群で35株 (32.1%)、S-TB群で86株 (38.1%)であった。一方 Beijing family以外のクラスター形成グループとしてMDR-TB群ではLAMI (Latin American and Mediterranean) familyのbグループ (7株)、T2 family

Table 1 Comparison of MDR-TB and S-TB by RFLP and Spoligotyping

		Cluster	Others	Total	Cluster %
RFLP	MDR-TB	47	62	109	43.1
	S-TB	99	127	226	43.8
	Total	146	189	335	43.6
<hr/>					
		Beijing family*	Others	Total	Beijing %
Spoligotyping	MDR-TB	84	25	109	77.1
	S-TB	191	35	226	84.5
	Total	275	60	335	82.1
<hr/>					
		Class**	Unique	Total	
Non-Beijing family	MDR-TB	13	12	25	
	S-TB	24	12	35	
	Total	37	24	60	

*ancient Beijing strains and Beijing-like spoligoprofiles

major classes of *M. tuberculosis* in SpolDB3Table 2** DNA fingerprinting results for MDR-TB and S-TB isolates by RFLP and Spoligotyping

MDR-TB				S-TB					
Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster
1010016	a*	2011505	f*	3070599	a*	3080908	e ^{T1}	3080070	g*
1011097	a*	1100583	f*	3030861	a*	3070182	e ^{T1}	3081137	g*
1051148	a*	3040439	f*	3110253	a*	3070919	e ^{T1}	3030853	g*
1020193	a*	2050419	g*	3020215	a*	3080723	e ^{T1}	3020287	g*
2070344	a*	3060933	g*	3010525	a*	3010626	e ^{T1}	3070708	g*
2010894	a*	1012035	g*	3010925	a*	3010007	e ^{T1}	3011132	g*
3070308	a*	1040969	h*	3071163	b*	3030100	e ^{T1}	3010820	g*
2100456	a*	2020438	h*	3080532	b*	3030834	e ^{T1}	3020779	g*
1010518	a*	1070653	i*	3070045	c*	3020017	e ^{T1}	2100603	h*
1060866	a*	3060032	i*	3070400	c*	2120831	f*	2100985	h*
2071004	a*	2100509	j ^{T2}	3070543	c*	2060904	f*	3070421	h*
2101128	b**	3071249	j ^{T2}	3080792	c*	3071093	f*	3070878	h*
3020418	b**	2011515	j ^{T2}	3022013	c*	3090992	f*	3080597	h*
2060497	b**	1011111	k ^{T1}	3022069	c*	3070512	f*	3080475	h*
3030886	b**	2020473	k ^{T1}	3030607	c*	3070215	f*	3030726	h*
3020454	b**	2011505	l*	3071172	c*	3080936	f*	3030794	h*
3010929	b**	2060287	l*	3070737	c*	3030206	f*	2110964	i*
2011514	b**			3031018	c*	3040093	f*	3070025	i*
3050944	c*			3030796	c*	3040033	f*	3071118	i*
3020288	c*			3020810	c*	3030165	f*	3070116	j*
2091054	c*			3031022	c*	3020391	f*	3010231	j*
1070018	d*			3030837	c*	3010178	f*	3030083	k*
1080214	d*			3030316	d*	3020757	f*	3030553	k*
2060548	e*			3070021	d*	3010746	f*	3090365	l*
2060510	e*					4011101	f*	3030634	l*
2060423	e*							3070977	l*
3060080	e*							3081099	l*
3060868	e*							3030156	l*
3060247	e*							3020920	l*
1030685	e*								

*Beijing family

**LAM1 family

^{T1}T1 family^{T2}T2 familySuperscript letters: classes of *Mycobacterium tuberculosis* excerpted from SpolDB3

The a pattern in MDR-TB was similar of the a pattern in S-TB by RFLP.

The i pattern in MDR-TB was also similar of the i pattern in S-TB by RFLP.

