

ストラクトーム解析による結核菌の基礎的形態データとリボソーム定量 Basic Morphological Properties and Ribosome Enumeration Data of Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Obtained from Structome Analysis

山 田 博 之

Hiroyuki Yamada

公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部

要 旨 結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、1882年に Robert Koch により発見された細菌で、かつて世界で最も高い死亡率を記録した感染症、結核の原因菌である。幅約 0.4 μm 、長さ約 4 μm のやや湾曲した普通の桿菌である。1 分裂に要する時間が約 20 時間で、極めて増殖が遅いことが特徴である。これまで、急速凍結置換固定法を用いてより生きた状態に近い結核菌の透過電子顕微鏡像を観察してきたが、今回、細菌を対象としては世界で初めて超薄連続切片観察による「電子顕微鏡レベルにおける実測値に基づく細胞の定量的、三次元的全構造情報」、すなわちストラクトームの解析を試み、興味深いデータを得た。細胞質内のリボソーム密度を既に報告されている真菌のデータと比較するとともに、リボソームを標的とする抗結核薬の耐性機序について考察する。

キーワード：病原性細菌、結核菌、ストラクトーム解析、基礎形態情報、リボソーム密度

1. はじめに

細菌は液体培地では菌液の濁りとして、固形培地ではコロニーとして肉眼で観察できる。しかし、肉眼では当然のことながら、個々の菌を観察することは不可能であり、細菌を特異的に染める様々な染色により、光学顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡観察で個々の菌を可視化することができる。

通常の光学顕微鏡、蛍光顕微鏡観察では、菌を染色して観察することで肉眼で確認できなかった個々の菌の存在を証明できるが、染色時点で全ての菌は死んでおり、単に菌の物理的存在を確認できるだけである。近年、顕微鏡観察手法の発達により、光学・蛍光顕微鏡下で生きた単一菌体を対象にその増殖の過程を微速度撮影での連続観察ならびに顕微鏡下で単一菌体での遺伝子発現を時間軸で検討することが可能になっており、結核菌を含む抗酸菌の分野でも報告されている¹⁻³⁾。それらの研究について若本祐一博士、谷口雄一博士に本特集で解説頂いている。

他方、生きた菌体の細胞壁・細胞膜あるいは細胞質内で起こる現象を詳細に検証するには透過電子顕微鏡での観察が必須であるが、従来の化学固定による標本調製では、細胞質の変性が生じやすいので、急速凍結・凍結置換固定法で標本を調製する必要がある^{4,5)}。本特集でご執筆頂いている山口正

視博士が真菌を対象として急速凍結・凍結置換固定法で調製した樹脂包埋標本の超薄連続切片を透過電子顕微鏡で観察することにより、「電子顕微鏡レベルにおける実測値に基づく定量的、三次元的全構造情報（ストラクトーム）解析」を提唱し^{6,7)}、真菌 2 種のストラクトーム情報が世界で初めて報告された^{7,8)}。

今回の特集では、この手法を結核菌に応用し、液体培地で培養した結核菌の ATCC 標準株を急速凍結・凍結置換固定法で処理し、エポキシ樹脂包埋したサンプルの超薄連続切片を透過電子顕微鏡で観察して得られた菌体のストラクトーム解析結果を紹介する⁹⁾。これまで結核菌の菌体構成成分については生化学的、分子生物学的手法で分析され、標本の菌集団を構成する菌体数の想定に基づいた計算値として報告されている¹⁰⁻¹⁴⁾。今回のストラクトーム解析は急速凍結・凍結置換固定法で調製した単一菌体の超薄連続切片を透過電子顕微鏡で観察、撮影した画像上で直接計測・計数したデータをもとに菌体の全体像を再構築するものである。前者が微分的に全体から単一菌体を計算により想定しているのに対し、後者はまず単一菌体のサイズ、表面積、体積を計測してそこに存在する構成成分を直接定量するものであり、単一菌体の情報から積分的に菌の集団をより正確に推測する手法を提供できると考えられる。この両者のデータの比較を紹介し、既に報告されている山口博士らの真菌のストラクトーム解析データとの比較を紹介する。また、リボソームを標的とする薬剤の濃度と菌体内リボソーム密度についても考察を試みる。今回の結核菌を用いたストラクトーム解析結果は細菌を対象と

〒204-8533 東京都清瀬市松山 3-1-24
TEL: 042-493-5072; FAX: 042-492-4600
E-mail: hyamada@jata.or.jp
2015年3月23日受付

したストラクチャー解析としては世界初のデータであり、将来の結核菌の基礎生物学的研究、生化学的、分子生物学的研究および免疫原性、病原性、薬剤耐性に関する研究に貢献できると考えられる。

2. 結核菌のストラクチャー解析

結核菌のストラクチャー解析には、ATCC 標準株である H37Rv 株 (ATCC 27294) を用いた。具体的には、H37Rv 株をバイオセーフティーレベル 3 の実験室内で ADC (Bovine Serum Albumin, Frac V, Dextrose, Catalase (beef)) enrichment と 0.05% Tween 80 を含む Middlebrook 7H9 液体培地 50 ml を入れたフラスコに接種し、37°C で約 2 週間培養した。十分に発育した菌液約 6 ml を滅菌した微小遠心管に 1 ml ずつ分注し 10,000 g で 1 分遠心して最終的に 2 本のチューブにペレットを集めた。この濃厚なペレット 1 μ l 以下を親水化処理した単孔グリッドに滴下し、もう 1 枚の単孔グリッドを重ねてサンドイッチ法により液体窒素で冷却した液体プロパンで急速凍結し、2%四酸化オスミウム・アセトン液に移して、一般実験室の -80°C 以下の超低温フリーザーで凍結置換固定を行った^{4,5)}。Spurr 樹脂に包埋し、山口博士らの手法になって厚さ 55 nm で超薄連続切片を作製し¹⁵⁾、Maxtaform HF-49 グリッドに拵い、フォルムバル支持膜で裏打ちして日本電子 JEM-1230 で観察、写真撮影した。当初、観察切片数を少なくするために菌体の縦断面を低倍率で探したが、縦断面の

観察では菌体の末端部分を含む切片で菌体が切片から抜け落ちることが多く、正確なストラクチャー解析結果の取得が困難であることが判明した。そのため観察切片数は多くなるが 5 菌体について横断面での観察を行った (図 1)。写真撮影したフィルム画像をスキャナーで TIFF 画像として取り込み、ImageJ/Fiji ソフトウェアで画像解析した^{16,17)}。超薄連続切片の画像から得られたデータに基づいて菌体ごとに菌体サイズ、菌体表面積、菌体体積、リボソーム数を計算した。

2.1 結核菌体の一次元および二次元構造分析結果

細胞壁および細胞膜での平均菌体直径はそれぞれ $0.345 \pm 0.029 \mu\text{m}$ 、 $0.297 \pm 0.22 \mu\text{m}$ 、平均菌体長は $2.71 \pm 1.05 \mu\text{m}$ 、平均 aspect ratio は 8.23 ± 3.6 であった (表 1, 図 2)。また、細胞壁および細胞膜での平均横断面積はそれぞれ $0.116 \pm 0.028 \mu\text{m}^2$ 、 $0.090 \pm 0.026 \mu\text{m}^2$ で、細胞壁および細胞膜の平均表面積は $3.037 \pm 1.333 \mu\text{m}^2$ 、 $2.672 \pm 1.191 \mu\text{m}^2$ であった (表 2, 図 2)。菌体直径は菌体ごとの差が少ない一方、菌体長には $1.32 \sim 3.80 \mu\text{m}$ まで多様性が見られた。今回の解析では先に述べたように菌体の横断面での形態計測を行ったため、菌体の両末端間を欠けること無く観察できる菌体は短い菌体の頻度が高く、菌体長がより長い菌が存在する可能性はある。

2.2 結核菌体の三次元構造分析結果

菌体体積は細胞壁および細胞膜より内部の菌体領域で測定した体積に加えて、細胞壁そのもの、細胞壁と細胞膜の間に

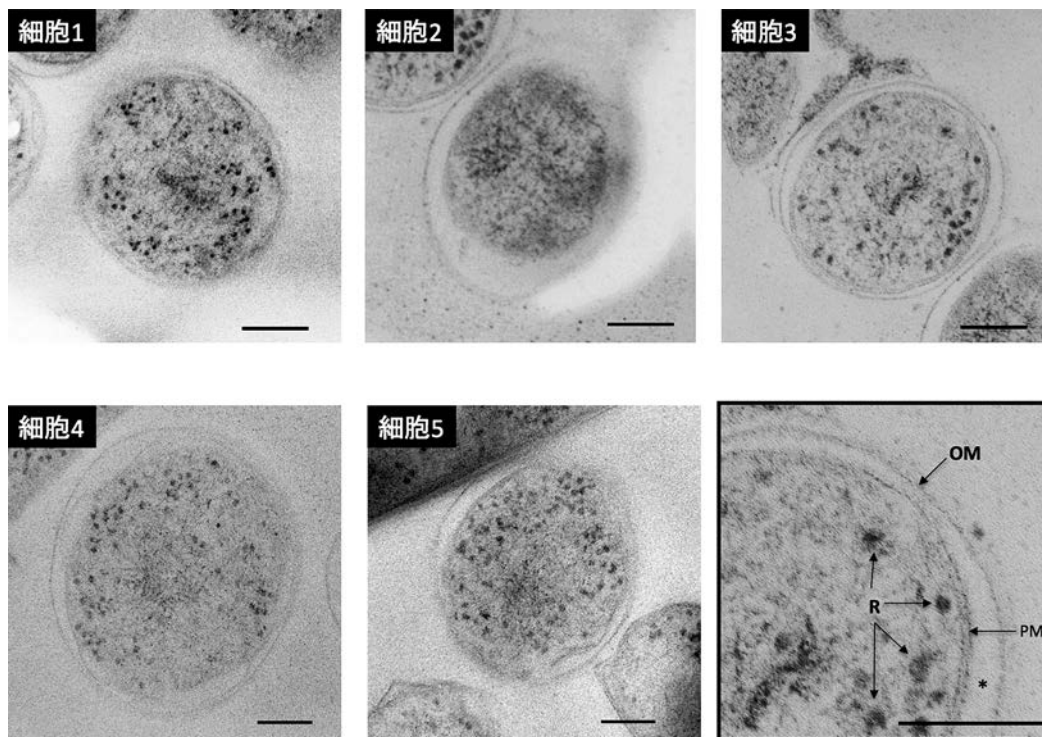


図 1 結核菌 5 菌体横断面の透過電顕像。いずれも菌体のほぼ中央部での切片。細胞壁外膜 (outer membrane, OM), periplasm (asterisk), 細胞膜 (plasma membrane, PM), リボソーム (R) が観察できる (右下細胞 3 の拡大図)。細胞 2 の細胞質は他の 4 菌体と比較して電子密度が高くリボソーム数も少ないことから、自己融解が起きているものと考えられる。細胞 3 が細胞 2 の左上にあるのが見える。スケールバー: 100 nm。

表 1 結核菌菌体の一次元形態情報

細胞 (観察切片数)	菌体 (μm)	平均直径 (μm) (細胞壁)	平均直径 (μm) (細胞膜)	Aspect Ratio
細胞 1 (24)	1.32	0.366	0.326	3.61
細胞 2 (35)	1.93	0.320	0.278	6.01
細胞 3 (69)	3.80	0.293	0.273	13.0
細胞 4 (55)	3.03	0.351	0.306	8.63
細胞 5 (67)	3.47	0.348	0.299	9.96
平均	2.71	0.345	0.297	8.23
標準偏差	1.05	0.029	0.022	3.60

表 2 結核菌菌体の二次元形態情報

細胞 (観察切片数)	面積 (μm ²)			
	平均横断面 (細胞壁)	平均横断面 (細胞膜)	外膜表面	細胞膜表面
細胞 1 (24)	0.134	0.108	1.201	1.095
細胞 2 (35)	0.096	0.057	2.072	1.704
細胞 3 (69)	0.079	0.066	3.773	3.402
細胞 4 (55)	0.124	0.102	3.809	3.383
細胞 5 (67)	0.147	0.116	4.328	3.775
平均	0.116	0.090	3.037	2.672
標準偏差	0.028	0.026	1.333	1.191

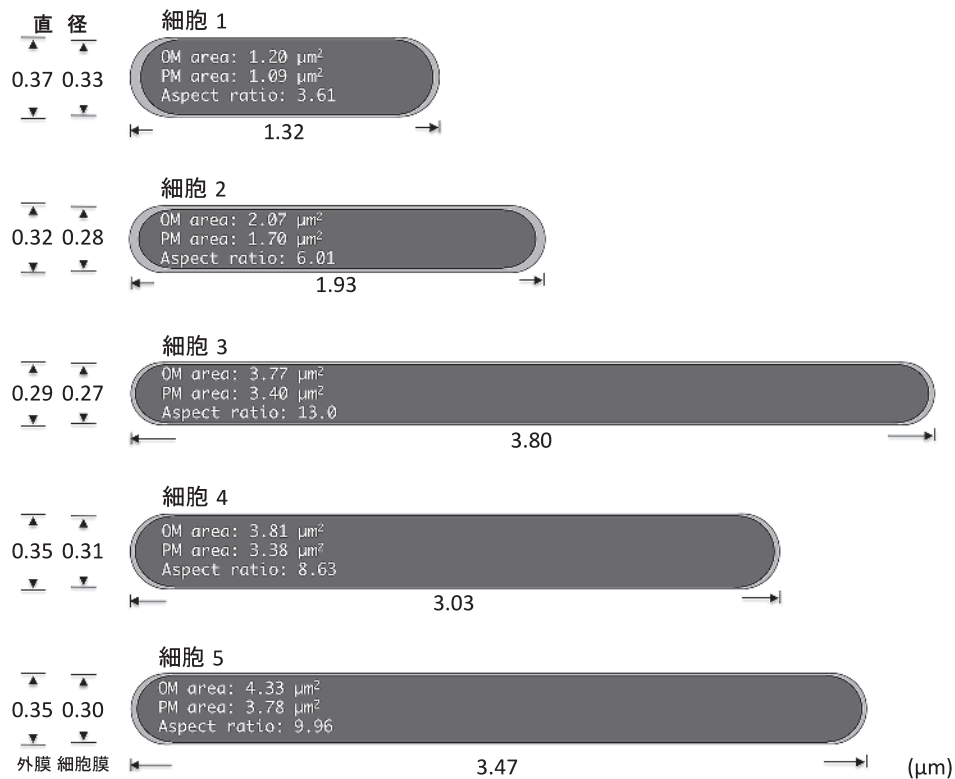


図 2 超薄連続切片の TEM 観察から得られた結核菌 5 菌体の一次元および二次元形態情報。図中の個々の菌体のサイズは実際のサイズの相対比で示してある。直径、菌体長 aspect ratio、外膜 (OM) 表面積、細胞膜 (PM) 表面積を示す。

表3 結核菌菌体の三次元形態情報

細胞 (観察切片数)	体積 (fl)				
	菌体	外膜	Periplasm	細胞膜	細胞質
細胞 1 (24)	0.177	0.002	0.031	0.008	0.135
細胞 2 (35)	0.185	0.004	0.075	0.012	0.110
細胞 3 (69)	0.300	0.008	0.050	0.024	0.218
細胞 4 (55)	0.376	0.008	0.062	0.024	0.284
細胞 5 (67)	0.429	0.009	0.088	0.027	0.306
平均	0.293	0.006	0.060	0.019	0.210
標準偏差	0.113	0.003	0.021	0.008	0.091

存在する periplasm, 細胞膜自体の体積も計算した. 細胞壁および細胞膜での平均菌体体積はそれぞれ 0.293 ± 0.113 fl (μm^3), 0.210 ± 0.091 fl であった. また, 細胞壁, periplasm, 細胞膜の平均体積はそれぞれ 0.006 ± 0.003 fl, 0.060 ± 0.021 fl, 0.019 ± 0.008 fl であった (表 3, 図 3).

2.3 菌体内リボソーム数

菌体内リボソーム数は菌体ごとに様々で 49 ~ 2,122 までの幅があった (図 1, 図 3, 表 4). このうち細胞 2 は細胞質内リボソーム数が 49 個で, この菌体の細胞質は他の菌体の

細胞質と比較して電子密度が高かった. これは, この菌体が急速凍結・凍結置換時に既に死菌であり, 細胞質内の自己融解によりリボソームの分解が起こったものと思われる. この菌体は細胞 3 の極めて近傍に存在し (図 1), この菌体のみが試料調製過程で何らかのアーティファクトにより変性したことは考えにくいからである. この菌体を除いて菌体内総リボソーム数, 細胞質 0.1 fl あたりのリボソーム密度を計算するとそれぞれ $1,672 \pm 568/\text{cell}$, $716.5 \pm 171.4/0.1$ fl cytoplasm になる (図 3, 表 4).

結核菌体内のリボソーム数に関する過去の報告では, 結核菌集団から抽出した総 RNA 中に存在するリボソーム RNA (rRNA) の割合やリボソームに結合するヌクレオチド量を生化学的, 分子生物学的に計算して単一菌体内のリボソーム数として 690 ~ 4,400 であることが報告されている¹⁰⁻¹⁴. これらの報告のうち Cox は菌体の乾燥重量, 菌体内の水分量, 菌体の浮遊密度, 蛋白質量などに基づいて 1 菌体の体積を計算し, 約 0.96 fl とし, リボソーム数を 4,400 としている^{7,8}. この値は今回の我々のストラクチャーデータと比較して菌体体積は 4 ~ 5 倍, リボソーム数は約 2.5 倍で, 細胞質 0.1 fl 当りの密度は約 450 になり, 我々の計測値よりさらに少なくなる. これらのデータは菌体集団のデータに基づいて微分的に単一菌体内のリボソーム数を計算しているが, 基本になる

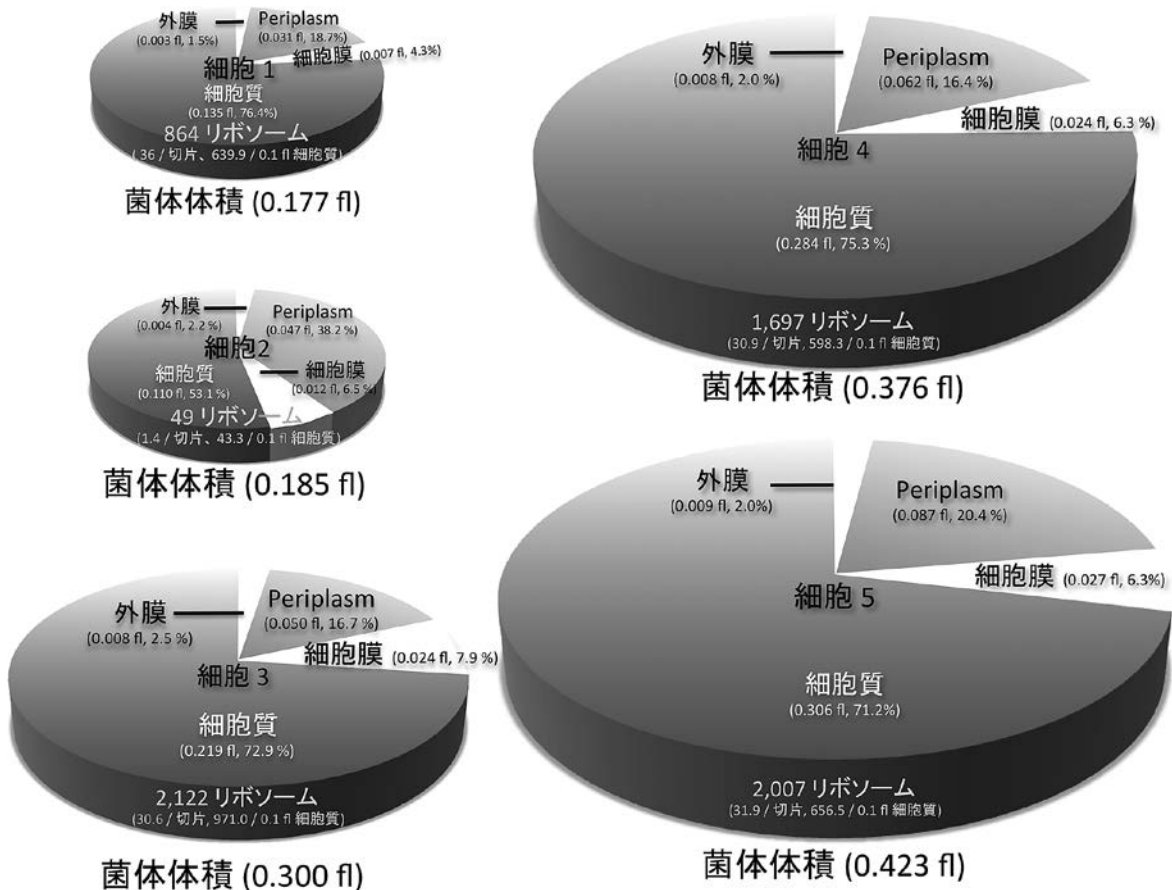


図3 結核菌 5 菌体の細胞区画の体積比を示すパイグラフ. 個々のパイの大きさは各細胞の相対的な体積比を示している. 各細胞の菌体体積, 外膜体積, periplasm 体積, 細胞膜体積, 細胞質体積, 総リボソーム数, リボソーム密度を示す.

表4 リボソーム定量結果

細胞 (観察切片数)	1切片当りの平均 リボソーム数 (range)	リボソーム密度 (/0.1 fl)	総リボソーム数
細胞1 (24)	36.0 (0-94)	640.2	864
細胞2 (35)	1.4 (0-7)	43.3	49
細胞3 (69)	29.8 (0-70)	971.0	2,122
細胞4 (55)	30.9 (0-89)	598.3	1,697
細胞5 (67)	31.9 (0-72)	656.5	2,007
平均	32.2 [26.0] ^a (0-94)	716.5 [583.2] ^a	1,672 [1,347] ^a
標準偏差	3.7 [18.6] ^a	171.4 [333.0] ^a	568 [877] ^a

^a細胞2のデータを含めた計算値。

集団内に存在する菌体数自体が推測に基づいており、1菌体当たりの体積も上記のように間接的な生化学的データに基づいているため、最終的な計算値も大きく変動することになる。また、これらの集団の中には死菌に加え、程なく死滅する菌と、間もなく分裂しようとする代謝が盛んな菌が混在しており、それらを計算に基づく菌数で平均する手法では正確なリボソーム密度を得ることは困難である。

これらの点から、今回のストラクトーム解析データは個々の菌の全体像を電子顕微鏡レベルでの実測に基づいた定量的、三次元的に構造解析して得られたもので、個々の菌の間に多様性が存在しても、それらを勘案して積分的に菌の母集団をより正確に推測することが可能であると考えられる。

3. 結核菌と真菌のリボソームデータ比較

先に述べたようにストラクトーム解析は山口博士が提唱した電子顕微鏡データに基づく解析法であり、既に真菌の *Exophiala dermatitidis* と *Saccharomyces cerevisiae* で解析が行われ、報告されている^{7,8)}。それらの報告によると、1菌体当たり平均総リボソーム数は *E. dermatitidis*, *S. cerevisiae* でいずれも約195,000であったが、平均菌体体積がそれぞれ約36 fl, 約15 fl, 平均細胞質体積がそれぞれ約17 fl, 約10 flと前者の方が大きいため、細胞質0.1 flあたりのリボソーム密度はそれぞれ約1,100, 約1,950であった。これは今回の結核菌の平均リボソーム密度と比較するとそれぞれ約1.5倍と2.8倍に相当し、結核菌の増殖速度が極めて遅いことを支持するものである(表5)。

4. 抗生物質の標的としてのリボソーム密度に関する考察

ストレプトマイシン ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$; MW: 581.57 Da, STR) は結核菌に対する抗生物質として1943年に発見された。この薬剤は結核菌の30Sリボソームサブユニット内に存在する

表5 真菌と結核菌の総リボソーム数とリボソーム密度の比較

菌名 (観察細胞数)	リボソーム密度 (/0.1 fl) (range)	平均総リボソーム数 (range)
<i>M. tuberculosis</i> (5)	716.5 [597.9] ^a (640 ~ 971)	1,672 [1,347] ^a (864 ~ 2,122)
<i>E. dermatitidis</i> (5) ^b	1,100 (970 ~ 1,340)	195,000 (112,000 ~ 336,000)
<i>S. cerevisiae</i> (6) ^c	1,950 (1,770 ~ 2,060)	195,000 (115,000 ~ 272,000)

^a細胞2のデータを含めた計算値。

^b文献8より。

^c文献7より。

16S rRNAの結合部位に入り込んで蛋白質合成を阻害すると考えられている。STRに耐性を示す耐性菌の出現が1959年に報告されている¹⁸⁾。STR耐性機序が全て解明されているわけではないが、16S rRNA遺伝子をコードする *rrs* 遺伝子、リボソーム蛋白質 S12 をコードする *rpsL* 遺伝子、rRNAに特異的なメチルトランスフェラーゼ7-メチルグアノシン (m7G) をコードする *gidB* の突然変異が耐性の表現系を与えることが明らかになっている¹⁹⁻²²⁾。しかし、全てのSTR耐性をこれらの遺伝子の突然変異で説明できるわけではない。

バクtonディッキンソン社の結核菌薬剤耐性検査MGIT 960に用いられるSTRの薬剤濃度は1.0 µg/mlである²³⁾。これを上記のSTRの分子量とアボガドロ数をもとに計算すると、この薬剤濃度のSTR溶液中には0.1 flあたり約100個の薬剤分子が存在することになる。もし結核菌がこの濃度のSTRが存在する環境に置かれ、全てのSTR分子が自由に結核菌の細胞質に入出力できると、菌体内には0.1 flあたり約700個の標的分子リボソームが存在するので、約1/7のリボソームと結合できることになる。この結合により結核菌

が蛋白質合成を阻害されて殺菌されるのか、あるいは時間経過とともにより多くの STR 分子が菌体内に入り込んでより多くのリボソームと結合して殺菌されるのか、あるいはまた、より少数のリボソームと STR の結合により、迅速に殺菌されるのかについてはどこにも述べられていない。これは、これまで1菌体当たりの細胞質内リボソーム密度が不明であったため、菌体内に存在する標的の何%が薬剤と結合すると殺菌されるのかが不明であるためである。一般に病原細菌の抗生物質耐性獲得は突然変異による標的分子や修飾分子の構造変化や欠損により説明されることが多いが、薬剤分子と標的分子の数的な割合の変化により耐性が生じる可能性についても考察される必要があると思われる。また、上記の STR 耐性と関連した突然変異が STR 分子と標的分子の結合を阻害するのではなく、標的分子の正常な代謝を阻害して、細胞質内に標的分子が蓄積され、最終的に有効な薬剤濃度に対する標的分子数が過剰になるため完全な殺菌ができず耐性という表現型を呈する可能性が無いのかという考察も必要と考える。何れにせよ、将来、抗生物質と標的分子の相互作用の場を可視化することができれば、薬剤の作用機序と耐性獲得に関する正確かつ詳細な検討が可能になると考えられる。

5. ストラクチャー解析の必要性

近年、単一細胞に注目した遺伝子解析、蛋白質分析などが注目を集めつつある。また、同一の遺伝的背景を持った細胞集団中に遺伝子発現のゆらぎにより epigenetic に異なる表現系を示す現象の解析も行われている¹⁻³⁾。これらの表現系の変化は形態学的な変化として現れる可能性もあるだろう。その表現系の変化は細胞を標識して光学顕微鏡・蛍光顕微鏡で調べることも可能だが、より詳細に検討するには透過電子顕微鏡による観察が必要だろう。従来の透過電子顕微鏡観察は、細胞に特異的な構造を調べる高度に定性的な分析であるのに対し、1細胞に着目してその全構造情報を定量的、三次元的に解析するストラクチャー解析は、電子顕微鏡による解析に新たな領域を提供するだけでなく、これまで生化学的、分子生物学的データをもとに集団から構成要素である単一細胞を単純な計算で微分的に想像していた方向性を、単一細胞の詳細な分析を根拠にしてより高度な母集団を科学的に積分的に推測する方向性へ逆転するための強力な手段を提供することも可能である。今後、生化学的、分子生物学的手法と連携した研究で新たな展開も期待される。

近年、連続スライス SEM による生物試料の三次元構築が注目を集めている²⁴⁻²⁸⁾。超薄連続切片作製による透過電子顕微鏡観察と比較すると、多くの面で自動化され三次元構築も容易になっている。将来、細菌を対象にした細胞壁、細胞膜、リボソーム等の微細構造の詳細な定量的な分析にも応用が可能になれば、ストラクチャー解析にも強力な味方になりうる可能性がある。今後の試料調製法の改良により、微生物の分野での応用が期待される。

- 1) Taniguchi, Y., Choi, P.J., Li, G-W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A. and Xie, X.S.: *Science*, **329**, 533-538 (2010)
- 2) Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S. and McKinney, J.D.: *Science*, **339**, 91-95 (2013)
- 3) Santi, I., Dhar, N., Bousbaïne, D., Wakamoto, Y. and McKinney, J.D.: *Nat. Commun.*, **4**, 2470 (2013)
- 4) Yamada, H., Mitarai, S., Chikamatsu, K., Mizuno, K. and Yamaguchi, M.: *J. Microbiol. Methods*, **80**, 14-18 (2010)
- 5) Yamada, H., Chikamatsu, K., Aono, A. and Mitarai, S.: *J. Microbiol. Methods*, **96**, 50-55 (2014)
- 6) Yamaguchi, M.: *Curr. Trends Microbiol.*, **2**, 1-12 (2006)
- 7) Yamaguchi, M., Namiki, Y., Okada, H., Mori, Y., Furukawa, H., Wang, J., Ohkusu, M. and Kawamoto, S.: *J. Electron Microsc.*, **60**, 321-335 (2011)
- 8) Biswas, S.K., Yamaguchi, M., Naoy, N., Takashima, T. and Takeo, K.: *J. Electron Microsc.*, **52**, 133-143 (2003)
- 9) Yamada, H., Yamaguchi, M., Chikamatsu, K., Aono, A. and Mitarai, S.: *PLoS ONE*, **10**, e0117109 (2015)
- 10) Cox, R.A.: *Microbiology*, **149**, 729-737 (2003)
- 11) Cox, R.A.: *Microbiology*, **150**, 1413-1426 (2004)
- 12) Beste, D.J., Peters, J., Hooper, T., Avignone-Rossa, C., Bushell, M.E. and McFadden, J.: *J. Bacteriol.*, **187**, 1677-1684 (2005)
- 13) Cox, R.A.: *Microbiology*, **153**, 3337-3349 (2007)
- 14) Cox, R.A. and Garcia, M.J.: *PLoS One*, **8**, e59883 (2013)
- 15) Yamaguchi, M., Okada, H. and Namiki, Y.: *J. Electron Microsc.*, **58**, 261-266 (2009)
- 16) Rasband, W.S.: ImageJ. U S National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA (1997-2014)
- 17) Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A.: *Nat. Methods*, **9**, 676-682 (2012)
- 18) Walsh, C.: *Antibiotics: actions, origins, resistance*. ASM Press, Washington, D.C. (2003)
- 19) Pelchovich, G., Zhuravlev, A. and Gophna, U.: *Int. J. Antimicrob. Agents*, **42**, 129-132 (2013)
- 20) Tekwu, E.M., Sidze, L.K., Assam, J.P., Tedom, J.C., Tchatchouang, S., Makafe, G.G., Wetewale, A-L.T., Kuaban, C., Eyangoh, S., Ntouni, F., Beng, V.N.P. and Frank, M.: *BMC Microbiol.*, **14**, 113 (2014)
- 21) Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y. and Ochi, K.: *Mol. Microbiol.*, **63**, 1096-1106 (2007)
- 22) Jagielski, T., Ignatowska, H., Bakula, Z., Dziewit, L., Napiorkowska, A., Augustynowicz-Kopec, E., Zwolska, Z. and Bielecki, J.: *PLoS One*, **9**, e100078 (2014)
- 23) Ardito, F., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Zanetti, S. and Fadda, G.: *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 4440-4444 (2001)
- 24) 村田和義：顕微鏡，**49**，160 (2014)
- 25) 太田啓介，金澤知之進，中村桂一郎：顕微鏡，**49**，161-165 (2014)
- 26) 大野伸彦，齋藤 成，齋藤百合花，大野伸一：顕微鏡，**49**，166-170 (2014)
- 27) 甲賀大輔，久住 聡，牛木辰男：顕微鏡，**49**，171-175 (2014)
- 28) 岩崎広英：顕微鏡，**49**，176-180 (2014)