



PCR、TMA と結核菌の遺伝子診断

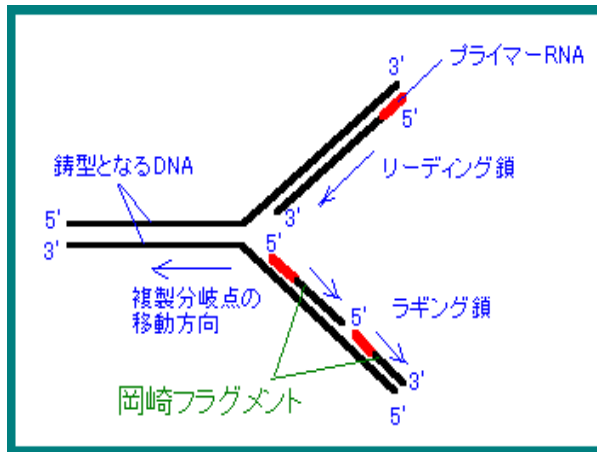
<https://l-hospitalier.github.io>

2016.8

感染対策の基礎知識

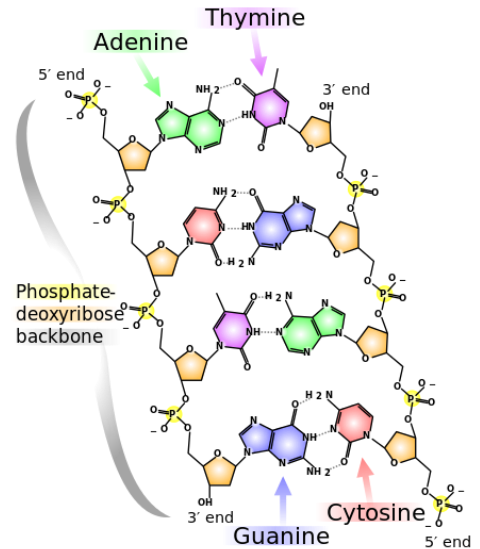
#55

結核菌の検出は①喀痰の培養（ミジット法：MGIT）②培養結核菌の特異的蛋白 PB64 の検出（キャピリア TB）など結核菌発育に依存した方法（表現形）を使う限り最短 7 日が必要。塗抹検鏡は迅速だが、標本作成時の 2 次感染問題や非結核性抗酸菌の判別ができず感度も低い。シータス社のマリスが PCR* を発明後プライマーやプローブのデザインで結核菌の検出と同定を同時に行うことができる。③血中リンパ球の結核菌に対する γ インターフェロン産生を検出するクオンティフェロン、T-SPOT などは感染の診断に有力。DNA ポリメラーゼは 5'→3' の方向への鎖の延長（図の左列の上から下へ）しかできない。



鎖の延長

ではなく鎖そのものの合成開始には **プライマー** が必要。DNA 二重鎖（三重や四重もある）の複製時は 5'→3'（リーディング鎖）は二重鎖を開きながらコピーできるが、反対側（ラギング鎖：左図下方）は開いた DNA 鎖を逆方向に短く複製しては開き、を繰り返して DNA リガーゼによって一本の DNA に合成する。この **岡崎フラグメント****の合成開始にも RNA



プライマーゼという酵素が作る 20 塩基ほどの RNA（**プライマー**）が必要。この RNA は完成後除去される。結核菌の遺伝子診断には **DNA-DNA Hybridization 法（DDH マイコバクテリア 岐阜大、極東）** が理解容易。各種結核菌、抗酸菌の一本鎖 DNA 標本を用意しておき被検菌の 1 本鎖 DNA と 2 本鎖形成の有無を検査、非定型抗酸菌種決定に威力を発揮する（但し小川培地で 8 週、数 mg の培養菌を得た後）。数時間の **核酸増幅法**：
① **RT-PCR**（DNA のリアルタイム PCR、TaqMan 等）② **TMA*****（Transcription Mediated Amplification、**MTD2 法:Mycobacterium Tuberculosis Direct:ダイレクト TB**）など結核菌の **16s rRNA** の増幅同定法*** ③結核菌特異蛋白 **Pab**（Protein antigen b）をコードする DNA をリガーゼ連鎖反応（**Ligase Chain Reaction**）で検出。④ **LAMP 法**。

リボゾームの小サブユニットの RNA（**rRNA**、約 1600bp）は微生物の系統分類に有効で古細菌もこれで分類。結核菌も固有の **16s rRNA 塩基配列** を持つ（真核生物は 18s rRNA）。本来の遺伝子 DNA の解析ではないが、早期結核診断の有用性は PCR と変わらない***。全生物が持つ塩基配列が 3 か所にあり、ユニバーサルプライマーとして使用可能。**血液、heparin による PCR 阻害注意**。培養の併用も必要だが、**核酸増幅法**で TB の診断は**結核病棟に転院**。培養は転院後で OK。

*PCR（Polymerase Chain Reaction）の特許はロッシュに売却、ロッシュ・ダイアグノスティックの商品名はアンプリコア（現在 PCR 特許は期限切れ）。**岡崎フラグメント（岡崎玲治 1967、名大）。***感度 100%，特異度 99.6%