

2) 生化学的検査^{7)~10)}

表3に結核菌群のおもな生化学的検査結果を示す。ナイアシン試験、硝酸塩還元試験、TCH含有培地の発育試験は必ず行う。MPB70産生試験は、*M. tuberculosis*と*M. bovis*の鑑別同定に有用な方法であるが、MPB70のモノクローナル抗体を必要とするので、省略することもできる。

a) ナイアシン試験

結核菌の大多数は、薬剤耐性や毒力にかかわらず、多量のナイアシンを産出する。中等大集落50個以上、あるいは培地の1/3以上を覆う程度に発育した小川培地上6~8週間培養菌に沸騰水1.5mlを加え、全集落が浸るように培地を水平に約5分間静地し、ナイアシンを抽出する。

①試験管法

抽出液の0.2mlずつを2本の小試験管に移し、それぞれに4%アニリン・エタノール0.1mlずつを加える。1本にはさらに10%臭化シアン水溶液0.1mlを加えて軽くふる。臭化シアンを入れない方は対照である。5分後に発色を見てカナリア黄色の発色を認められたものを陽性とする。

注意：本試験に用いる臭化シアンは蒸散しやすく猛毒であるので、ドラフト内で過飽和になるように多めに量り、手早く作る。絶対にピペットを口で吸ってはならない。また、反応液を酸性の液に混ぜると、急に分解して多量のシアンが発生する恐れがあるので危険である。

②試験紙法

抽出液1mlをスクリューキャップ付小試験管(13×75mm)に移し、これにナイアシン試験紙(ナイアシントテスト極東、極東製薬工業)をピンセットで先端がとがっている方を下にして入れ、直ちに密栓する。試験管を傾けたりすることなく、立てたまま静地して試験紙の上端まで自然乾燥させる(約2分)。その後、時々試験管を軽く振り、15分間反応させる。

判定：試験に用いたものと同一規格の小試験管に、キットに含まれている陽性コントロール液を10滴入れ、この色調と抽出液の発色色調を比較する。陽性コントロールと同程度以上に着色(黄色)したものを陽性とする。

b) 硝酸塩還元試験

硝酸ナトリウム0.085gをM/45リン酸緩衝液(pH7.0)100mlに溶解し、121℃、15分高压滅菌後、保存した基質液2mlを小試験管にとり、これに1白金耳の菌塊を入れ、37℃の温浴中に2時間保つ。この反応液に次の試薬①を0.1ml、②を0.2ml、③を0.2ml加え、軽く振る。

試薬:

- ① 2 倍希釈塩酸溶液：蒸留水 50ml に濃塩酸 50ml を注意深く加える。
- ② 0.2% Sulfanilamide 水溶液：蒸留水 100ml に Sulfanilamide 0.2g を溶解する。
- ③ 0.1% N-naphthylethylenediamine 水溶液：蒸留水 100ml に N-naphthylethylenediamine-dihydrochloride 0.1g を溶解する。

判定：反応液が直ちに赤色から赤紫色に変化したものを陽性、まったく変化しないか微桃色に変化したものを陰性とする。反応陰性のは少量の亜鉛末を加えて赤色に変化するのを確かめる。

c) TCH (Thiophen-2-carboxylic acid hydrazide) 含有培地の発育試験

TCH 培地：小川培地 99ml に TCH 100 および 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 水溶液 1ml を加え、混和後、スクリューキャップ付き試験管 (18×180mm) へ 7ml 宛分注し、斜面で 90°C、1 時間凝固滅菌する。TCH 濃度は 1 および 10 $\mu\text{g/ml}$ となる。

試験法：菌液 (10^2 mg/ml) を 0.1ml ずつを接種して 37°C で培養する。

判定：結核菌は 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地でも発育するが、ウシ菌では 1 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地でも発育しない。

d) MPB70 産生試験 (概略)

MPB70 に対するマウスのモノクローナル抗体を用いた、高感度蛍光サンドイッチ ELISA 法により、結核菌群から *M. bovis* を鑑別する方法である。

96 穴 ELISA プレートに 1 次抗体 (MPB70 に対する単クローン抗体—Bov.1 またはポリクローナル抗体) で 4°C に一夜置きコーティングする。この抗体に、抗原サンプルを結合後、2 次抗体として、ビオチン化した MPB70 に対するポリクローナル抗体又は Bov.1 抗体をサンドイッチ状に結合させる。さらに、Streptavidin β -D-galactosidase を結合させる。最後に、基質として 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside を加え、生じた 4-methylumbelliferon の蛍光量を 96 穴マイクロプレート用蛍光光度計にて測定する。

抗原サンプルは、1% 小川培地 3 から 4 週目の菌体 2 エーゼを 3ml の PBS-Tween20 に浮遊させ熱処理 (121°C、20 分) 後、12,000×g 10 分間遠心分離を行い上清を使用する。

参考文献

- 1) ワクチンハンドブック：国立予防衛生研究所学友会編、1994. p49-58
- 2) Sjöbring, U., et al : J. Clin. Microbiol, 28: 2200-2204, 1990
- 3) Portillo, P. D., et al : J. Clin. Microbiol, 29: 2163-2168, 1991
- 4) Li , H., et al : Infec. Immun., 61:1730-1734,1993
- 5) Scorpio, A., et al : Nature Med. , 2: 662-667, 1996
- 6) Magdalena, J., et al.: J. Clin. Microbiol, 36: 2471-2476, 1998
- 7) 室橋豊穂、他：結核菌検査指針、1979年版. 東京：日本公衆衛生協会、1979. p31-47
- 8) 工藤祐是、他：結核菌. 微生物検査必携、細菌・真菌検査、第3版、厚生省監修. 東京：日本公衆衛生協会、1987. pF90～133
- 9) 芳賀伸治、他：高感度傾向サンドイッチ ELISA による MPB70 陽性菌株の同定とその意義、第12回臨床抗酸菌研究会講演内容、17-24、1990
- 10) 阿部千代治、他：新結核菌検査指針 2000：日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編、東京：財団法人結核予防会、2000. p43-77

担当 山崎利雄

作成日 平成13年3月1日

表1 結核菌群鑑別同定用プライマー

名前	標的抗原 遺伝子	塩基配列	塩基数 (mer)	アニーリング 温度 (°C)	増幅DNAの 大きさ (bp)
MT-1	<i>pab</i>	5' ACCACCGAGCGGTTCGCCTGA 3'	21	55	419
MT-2		5' GATCTGCGGGTTCGTCCCAGGT 3'	21		
PT-1	<i>mtp40</i>	5' CAACGCGCCGTCGGTGG 3'	17	68	396
PT-2		5' CCCCCACGGCACC GC 3'	16		
MPB64-T2	<i>MPB64</i>	5' TCCGCTGCCAGTCGTCTTCC 3'	20	55	241
MPB64-T6		5' GTCCTCGCGAGTCTAGGCCA 3'	20		
pncA-7	<i>pncA</i>	5' ATGCGGGCGTTGATCATCGTC 3'	21	68	185
pncA-10		5' GGTGTGCCGGAGAAGTG 3'	17		
pncA-7	<i>pncA</i>	5' ATGCGGGCGTTGATCATCGTC 3'	21	68	186
pncA-11C		5' CGGTGTGCCGGAGAAGCC 3'	18		
C5	<i>senX3-</i>	5' GCGCGAGAGCCCCGAAGTGC 3'	19	68	
C3	<i>regX3 IR</i>	5' GCGCAGCAGAAACGTCAGC 3'	19		

表2 各種プライマーによる結核菌群DNAのPCR増幅パターン

菌種名	PCR結果				
	MT-1,2 (419bp)	PT-1,2 (396bp)	MPB64-T2,T6 (241bp)	pncA-7,10 (185bp)	pncA-7,11C (186bp)
<i>M. tuberculosis</i>	+	+ ¹⁾	+	+ ²⁾	-
<i>M. africanum</i>	+	+	+	+	-
<i>M. bovis</i>	+	-	+	-	+
<i>M. bovis</i> BCG-Tokyo	+	-	+	-	+
<i>M. bovis</i> BCG-Pasteur	+	-	-	-	+
<i>M. microti</i>	+	-	+	+	-

+ : PCRバンド陽性を示す。

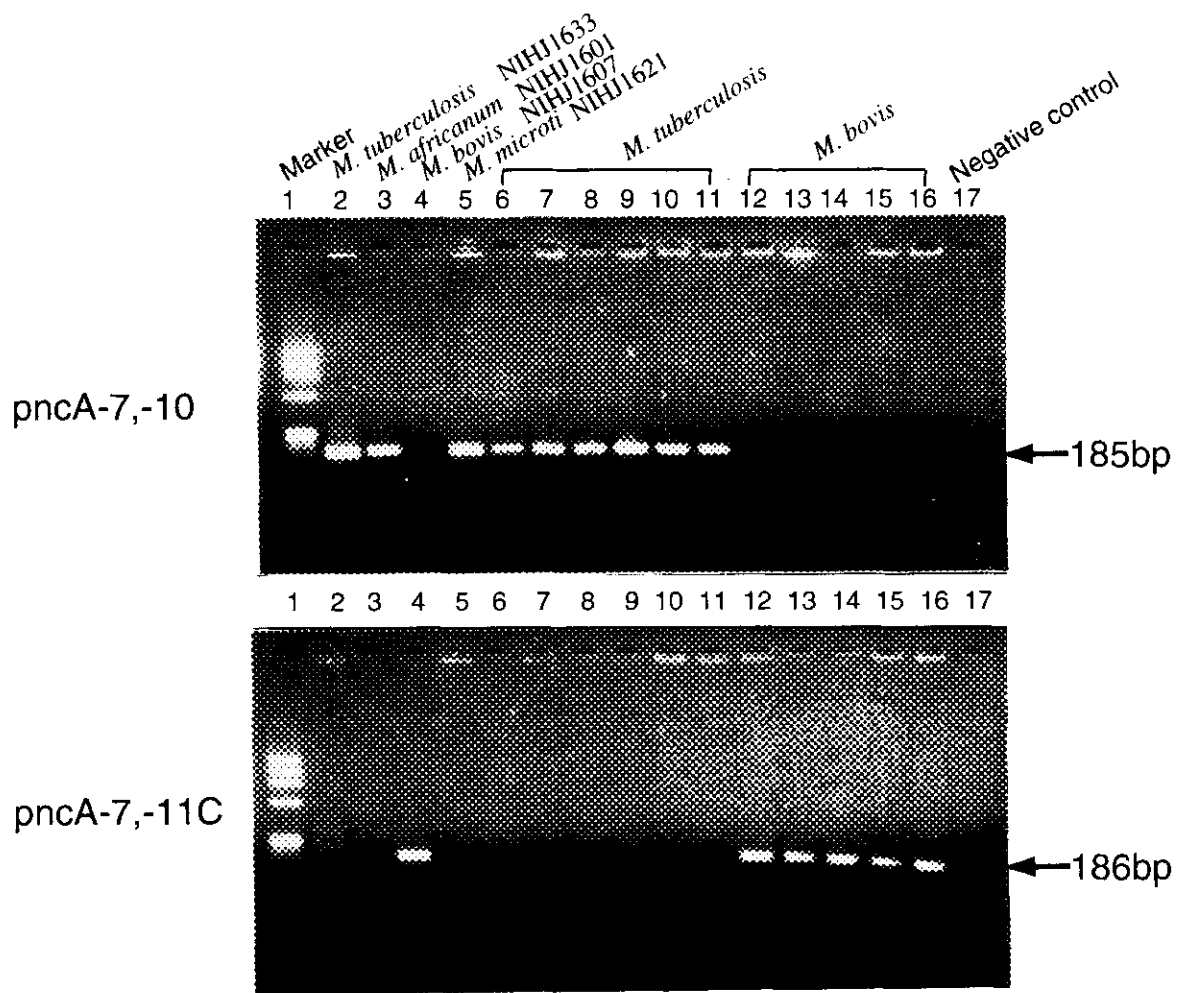
- : PCRバンド陰性を示す。

1) : *M. tuberculosis* でも20%は増幅されない。

2) : pncA遺伝子の169番目に変異を持つ*M. tuberculosis* は増幅されない。

表3 結核菌群のおもな生化学的同定検査成績

	ナイアシン 産生	硝酸塩 還元試験	TCH含有培地の 発育 (10 µg/ml)	MPB70 産生
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-
<i>M. africanum</i>	+	-	-	-
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+
<i>M. bovis</i> BCG-Tokyo	+	-	-	+
<i>M. bovis</i> BCG-Pasteur	-	-	-	+
<i>M. microti</i>	+	-	-	-



94°C	1min	X30cycle
68°C	2min	
72°C	1min	

図3 結核菌群のpncA遺伝子をコードするプライマーを用いたPCR

20000534

以降のページ(2/2 冊)は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。