—臨床・実験報告—

PCR 法による結核菌 DNA 検索の試み

荻原 英子¹⁾・尾見 徳彌¹⁾・川並 汪一¹⁾・中田 朋子²⁾
野村 信夫²⁾・石崎良太郎³⁾・大網 弘⁴⁾

¹⁾ 日本医科大学付属第二病院病理部

²⁾ 日本医科大学老人病研究所分子生物学部門

³⁾ 日本獣医畜産大学分子腫瘍学研究室

⁴⁾ 日本医科大学老人病研究所病理部門

Diagnosis with polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*

Eiko Ogiwara¹⁾, Tokuya Omi¹⁾, Oichi Kawanami¹⁾, Tomoko Nakata²⁾
Nobuo Nomura²⁾, Ryotaro Ishizaki³⁾ and Hiroshi Ooami⁴⁾

¹⁾Pathology and Clinical Research Laboratory, Nippon Medical School Second Hospital

²⁾Laboratory of Molecular Biology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School

³⁾Laboratory of Molecular Oncology, Nippon Veterinary and Zootechnical College

⁴⁾Division of Pathology, Institute of Gerontology Nippon Medical School

はじめに

近年、全国的に結核の発症が増えつつある。また、外国人による結核の持ち込みや、AIDS 患者における日和見感染も社会問題化している。

結核の確定診断のための菌の培養には最低でも 4～8 週間という長期間を要する。また、生検組織による病理学的な診断は可能であるが、採取される組織片の大きさには制限があり、結核に特徴的とされる肉芽腫病変でも、サルコイドーシスなどと鑑別できないことも少なくない。

最近、標的とする一部分の DNA を増幅して、その存在を確認する polymerase chain reaction (PCR)法が診断学分野でも試みられつつある。本邦でも実用化されつつあるが、未だ日が浅く色々な問題点も報告されている⁴⁻⁹⁾。

今回われわれは、結核菌や BCG を陽性対照として PCR 法¹⁻³⁾を試み、喀痰、気管支肺胞洗浄 (BAL)液、新鮮組織、さらにはパラフィン包埋組織などに応用した。その結果十分実用に供し得るレベルにこぎつけた。

研究対象および方法

(1) 研究対象

陽性対照材料として *Mycobacterium tuberculosis* (青山 B 株結核菌) および *M. bovis* (乾燥 BCG ワクチン)を用いた。臨床検体としては結核もしくはサルコイドーシスなどと診断されたホルマリン固定・パラフィン包埋切片標本 21 例と、結核などが疑われた BAL 液 4 例、喀痰 4 例、生検新鮮組織 2 例の計 10 例を用いた。

(2) 研究方法

1) DNA の抽出法

陽性対照の結核菌は白金耳 1 さじを、BCG は 12 mg を 99.5%エタノールに混じ 12,000 rpm で 10 分間遠心後、エタノールを取り除き吸引乾燥した。100 μ l の PCR extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA, 0.45% Tween 20, 0.45% NP-40, 300 μ g/ml proteinase K) を加えて再浮遊させ 37°C で一晩インキュベートした。phenol/chloroform による DNA の抽出後、エタノール沈澱した。沈澱物を pH 8.3 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.1 mM EDTA)

で結核菌は $50\ \mu\text{l}$ に、BCG は $400\ \mu\text{l}$ に溶解し、PCR の検体とした。

ホルマリン固定・パラフィン包埋組織から DNA を抽出^{10,11)}するため、厚さ $5\ \mu\text{m}$ の切片を4枚作成し、 $1.5\ \text{ml}$ のエッペンドルフチューブに入れた。キシロール $400\ \mu\text{l}$ を加え10分間室温で放置して脱パラフィンし、 $12,000\ \text{rpm}$ で10分間遠心後、沈澱物を95%エタノールで1回洗浄し、エタノールを取り除き吸引乾燥した。以下、菌体と同様にインキュベートし、沸騰、遠心の後、上清を検体とした。

BAL 液、喀痰、生検新鮮組織に界面活性剤としてそれぞれ $1\ \text{g}$ 当たり cell lysis NP-40 buffer ($0.14\ \text{M}$ NaCl, $1.5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $10\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 8.5) $5\ \text{ml}$ と cell lysis SDS buffer (1% SDS, $10\ \text{mM}$ EDTA, $0.1\ \text{M}$ NaCl) $33.8\ \text{ml}$ に $10\ \text{mg/ml}$ proteinase K $200\ \mu\text{l}$ を加え再浮遊させ 37°C で一晩インキュベートし、以下、菌体と同様に操作し検体とした。

2) 結核菌プライマー

IS 6110 因子^{2,3,12)}由来のプライマーで、 $317\ \text{bp}$ を増幅する Research Genetics 社製 (U.S.A.) の IS-41 ($5'$ -CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG- $3'$) と IS-43 ($5'$ -TCAGCCGCGTCCACGCCGCCA- $3'$) とを使用した。検出感度を上げる目的でプライマー NN-442 ($5'$ -CCCGCAAAGTGTGGCTAACC- $3'$)、NN-443 ($5'$ -GAAGCGGCGCTGGACGAG-AT- $3'$) を作成し nested PCR^{4,7)}を行った。これにより IS-41、IS-43 の増幅産物中の $173\ \text{bp}$ の領域を再増幅した。

3) PCR 法

PCR 用の陽性対照として $2 \times 10^{-5}\ \mu\text{g}$ から $2 \times 10^{-9}\ \mu\text{g}$ までの結核菌 DNA を、また陰性対照として $2 \times 10^{-3}\ \mu\text{g}$ の胎盤 DNA、TE buffer のみのものそれぞれ含む $50\ \mu\text{l}$ の系 (第1次 PCR: サンプル $2\ \mu\text{l}$, $10 \times \text{TTH buffer}$ $5\ \mu\text{l}$, $5\ \text{mM}$ d-NTP $2\ \mu\text{l}$, IS-41, 43 プライマー $50\ \text{pmol}/\mu\text{l}$ 各 $0.75\ \mu\text{l}$, $6\ \text{u}/\mu\text{l}$ TTH $0.2\ \mu\text{l}$, H_2O $39.3\ \mu\text{l}$., nested PCR: サンプル $2\ \mu\text{l}$, $10 \times \text{TTH buffer}$ $5\ \mu\text{l}$, $5\ \text{mM}$

Fig. 1 対照結核菌に対する PCR の感度

(a) レーン2-6は、TB 陽性コントロール希釈系列、7は胎盤 DNA $2 \times 10^{-3}\ \mu\text{g}$ 、8は TE buffer である。(b) レーン2-7は、(a)のレーン2-7の PCR 産物である。8は TB 陽性コントロール $2 \times 10^{-6}\ \mu\text{g}$ 、9は胎盤 DNA $2 \times 10^{-3}\ \mu\text{g}$ 、10は TE buffer である。

d-NTP 2 μ l, NN-442, 443 プライマー 50 pmol/ μ l 各 1 μ l, 6 u/ μ l TTH 0.2 μ l, H₂O 38.8 μ l.) で行い, IWAKI 社製 THERMAL SEQUENCER TSR-300 を用いて PCR を実施した. 反応条件は, 第 1 次 PCR では denature 94°C 2 分間, annealing, polymerization 72°C 4 分間の 2 step cycle で 40 回, nested PCR では第 1 次 PCR と同一の温度, step 条件で 30 回実施した. PCR 反応物は 20 μ l を 2 % アガロース電気泳動 (150 V/75 min) 後, エチジウムブロマイド染色により検出した.

4) パラフィン包埋標本, 新鮮標本からの β -グロビン DNA 増幅の検索

標本中の DNA の保存状態を知る目安としてヒト β -グロビンの遺伝子プライマー (宝酒造株式会社) KM 29 (5'-GGTTGGCCAATCTACTCCC-AGG-3'), KM 38 (5'-TGGTCTCCTTAAACCT-GTCTTG-3') で挟まれた 262 bp を PCR にて増幅した.

Table 1 パラフィン包埋標本からの β -グロビン, 結核菌 DNA の増幅

		PCR	
		β -グロビン	TB
TB 症例	14	5	0
その他	7	4	0
総 数	21	43%	0%

結果および考察

第 1 次 PCR の結果, Fig. 1 (a, レーン 6) にみるように $2 \times 10^{-5} \mu$ g までの対照結核菌と BCG の DNA を増幅し検出できた. Nested PCR により結核菌の検出感度を 10^4 倍上昇させることが出来た (Fig. 1, b, レーン 2). この方法によりパラフィン包埋標本からの結核菌 DNA の検出を試みた. その結果組織学的に Ziehl-Neelsen 染色や, BCG 抗体に陽性を示した標本を含むすべての検体で増幅産物を確認することはできなかった

Fig. 2 対象新鮮標本における PCR の結果

(a) レーン 2-4 は, BAL 液, 5 は肺組織, 6 は TB 陽性コントロール $2 \times 10^{-5} \mu$ g, 7 は胎盤 DNA $2 \times 10^{-3} \mu$ g, 8 は TE buffer である. (b) レーン 2-7 は, (a) のレーン 2-7 の PCR 産物である, 8 は TB 陽性コントロール $2 \times 10^{-6} \mu$ g, 9 は胎盤 DNA $2 \times 10^{-3} \mu$ g, 10 は TE buffer である.

Table 2 新鮮標本における PCR の結果

症例	年齢	性別	臨床診断	ツ反	材料	Gaffky	培養	BAL 所見	第1次 PCR	nested PCR
1	30	女	TB	強陽性	BAL	0号	—	TB C	—	—
2	62	男	TB	N.D.	BAL	2号	+	TB C	—	陽性
3	47	男	Asp	N.D.	BAL	0号	—	TB S	—	—
4	36	男	TB	強陽性	BAL	0号	—	TB C	—	—
5	86	男	old TB	N.D.	喀痰	0号	—		—	—
6	22	男	CB	N.D.	喀痰	N.D.	N.D.		—	—
7	36	男	TB	強陽性	喀痰	0号	—		—	—
8	43	男	old TB	N.D.	喀痰	0号	—		—	—
9	49	男	TB	陽性	肺	4号	+		陽性	陽性
10	51	女	GM	陽性	皮膚	N.D.	—		—	—

TB C: TB compatible TB S:TB speculative Asp: Aspergillosis CB: chronic bronchitis GM: granulomatous lesion N.D.: not done

(Table 1). そこでパラフィン包埋標本における DNA の保存の有無を知るため、 β -グロビンのプライマーにて PCR を実施した。その結果、全標本の 43% に増幅を確認した (Table 1)。これはパラフィン包埋標本の半数以上で DNA の保存状態が不適切であることを示している。パラフィン包埋切片からの結核菌に対する PCR についての報告は未だ限られている。Victor ら¹⁴⁾は、papulonecrotic tuberculoid において切片 10 μ m の厚さで結核菌 DNA 増幅に成功している。また、Degitz ら¹⁵⁾はパラフィン包埋切片約 100 μ m の厚さの lupus vulgaris 病変から培養結果に匹敵する PCR の結果を得ている。増幅するプライマー塩基の長さはそれぞれ 123 bp と 383 bp であり、われわれの 317 bp と大差はない。共同研究者の小山ら¹³⁾は胎盤 DNA を用いホルマリンに対する保存性を検討した結果、中性緩衝ホルマリンの短時間固定が通常ホルマリン、パラホルムアルデヒドより優れていることを示している。

また、パラフィン包埋標本を用いた際の問題点⁸⁾の解決法として、病変部を非病変部から選別すること、結核菌遺伝子の他の部位 (19 KDa⁴⁾, 38 KDa⁷⁾, 65 KDa^{1,9)}, dnaJ⁴⁾など) をターゲットとするプライマーを試みることで、壊死や死後変化の強い部分は除いておくこと¹¹⁾などが肝要であると思われる。パラフィン包埋切片の検索が可能になり病理部の検体を利用できることは大きなメリットとなる。その意味からも近い内に解決されるべき

課題である。

一方、BAL 液、喀痰、組織片など計 10 例の新鮮標本においては、 β -グロビン DNA の増幅は全例で可能であった。また、結核菌も、Table 2 にあるように症例 9 が第 1 次 PCR で陽性を、さらに nested PCR により症例 2 が追加陽性を示した。これら 2 例は培養の結果結核菌陽性であり、しかも、臨床病理学的にも結核で一致していた。その他のツベルクリン反応強陽性の症例 1, 4 の BAL 液中の細胞構成¹⁶⁾は結核で矛盾しなかった。また、症例 4 の BAL 液と症例 7 の喀痰は同一患者由来であるが、ともに培養は陰性であった。これらには肺結核の感染がなかったか、あるいは感染があっても、病変の被包化など個体反応により肺腔内への結核菌の浸潤がないとみなされる。結核菌の動態を操る上で極めて興味深く、フォローアップ中である。症例 10 は、組織学的に結核かサルコイドーシスか未解決であった。PCR 陰性の結果が最終診断に大きな根拠を提供することになった。今回用いた IS 因子のプライマーは、M. tuberculosis, M. bovis, M. microti, M. africanus に共通している。しかし、本邦における感染症の頻度や実態からすると、本法での陽性結果を結核感染症とみなし、治療法を選択して矛盾しないと思われる。

おわりに

結核菌は Mycobacterium 属の tuberculosis

complex^{1,3-5,12)}に含まれ、多くの非定型抗酸菌などと遺伝子学的には近縁関係にあり詳細な鑑別が望まれる。そのためより良いプライマーの選択、blot hybridizationの採用などについて現在検討中である。以上の結果を踏まえ、本法により臨床現場に対応しつつ試行錯誤を続けたい。

平成4年6月のDNA診断研究班設立以来、human papilloma virusのPCRをはじめとし、迅速な臨床診断の確立を目指して共同研究を施行中である。本研究班設立ならびにその後の運営に多大なアドバイスと御援助を賜りました第二病院院長大川共一教授、老人病研究所所長中島信治教授および同免疫部門大國寿士教授、留目優子講師に感謝致します。

文 献

- Hance, A.J., Grandchamp, B., Levy-Frebault, V., Lecossier, D., Rauzier, J., Bocart, D., and Gicquel, B.: Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.*, 3, 843~849, 1989.
- Brisson-Noel, A., Aznar, C., Chureau, C., Nguyen, S., Pierre, C., Bartoli, M., Bonete, R., Pialoux, G., Gicquel, B., and Garrigue, G.: Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet*, 338, 364~366, 1991.
- Plikaytis, B.B., Eisenach, K.D., Crawford, J.T., and Shinnick, T.M.: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction assay. *Mol. Cell Probes*, 5, 215~219, 1991.
- 竹脇俊一, 永井良三: PCR法による抗酸菌のDNA診断. *医学のあゆみ*, 158, 773~778, 1991.
- Kikuchi, Y., Oka, S., Kimura, S., Mitamura, K., and Shimada, K.: Clinical application of the polymerase chain reaction for a rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Internal Med.*, 31, 1016~1022, 1992.
- 三浦宏明: PCR法による喀痰中抗酸菌の高度検出法; 感染症遺伝子診断と分子疫学, 日本臨床, 50, 315~319, 1992.
- Miyazaki, Y., Koga, H., Kohno, S., and Karu, M.: Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 2228~2232, 1993.
- 三浦克敏, 松本美幸, 鈴木春見: PCR法を用いた結核菌の検出. 第82回日本病理学会総会(東京), 1993.
- 岸本伸人, 沈 海, 大谷信夫: Polymerase chain reaction (PCR)を用いた抗酸菌のDNA診断. *日胸疾会誌*, 31, 186~191, 1993.
- Goelz, S.E., Hamilton, S.R., and Vogelstein, B.: Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130, 118~126, 1985.
- Dubeau, L., Chandler, L.A., Gralow, J.R., Nichols, P. W., and Jones, P.A.: Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res.*, 46, 2964~2969, 1986.
- Thierry, D., Cave, M.D., Eisenach, K.D., Crawford, J.T., Bates, J.H., Gicquel, B., and Guesdon, J.L.: IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.*, 18, 188, 1990.
- 小山美弥, 細根 勝, 大網 弘, 野村信夫: 各種ホルマリン固定のDNAに対する影響. 1991.(未発表データ)
- Victor, T., Jordaan, H.F., Van Niekerk, D.J.T., Louw, M., Jordaan, A., and Van Helden, P.D.: Papulonecrotic tuberculid identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA by polymerase chain reaction. *Am. J. Dermatopathol.*, 14, 491~495, 1992.
- Degitz, K., Steidl, M., Neubert, U., Plewig, G., and Volkenandt, M.: Detection of mycobacterial DNA in paraffin-embedded specimens of lupus vulgaris by polymerase chain reaction. *Arch. Dermatol. Res.*, 285, 168~170, 1993.
- 松田 潔, 佐藤雅史, 川並汪一: 気管支肺胞洗浄法によるびまん性肺炎患における気道系と肺胞系炎症の分析とその意義. *日胸疾会誌*, 30, 827~834, 1992.

(受付: 1993年11月5日)