

原 著

PCR(polymerase chain reaction)法を用いたホルマリン固定 パラフィン包埋組織からの結核菌DNAの検出

長谷川 秀 浩* 五十嵐 俊 彦*

当施設における1995年から2000年の間において結核菌症と臨床的かつ病理学的に診断された6症例に関して、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出された結核菌DNAをPCR法により同定するためプライマーの検討を行い、その検出条件を確立した。すなわち、好酸菌特異的膜蛋白65K Daをコードするプライマーと、結核菌に対し特異性の高い内側のを組み合わせることににより、PCR法での結核菌DNAの検出を可能にした。本法は病理検査材料からのPCR法を用いた結核菌DNAの検出方法として、検出感度、特異性、再現性ともに優れており、今後の結核菌症の早期診断に有効と考えられる。

キーワード：PCR、結核菌、ホルマリン固定パラフィン包埋組織

緒 言

結核菌症の病理診断は、従来、組織での類上皮性肉芽腫、乾酪壊死、Langhans型巨細胞を伴った特異性炎を同定し、更に、Ziehl-Neelsen染色による結核菌の存在を確認する事により行われてきた。しかし結核菌症が強く疑われる特異的な組織背景であっても、必ずしも結核菌が証明されるわけではなく、確定診断に1~2ヶ月以上を要する結核菌培養検査の結果を待つことに委ねられてきた。しかし近年、迅速でかつ高感度の同定法として、Polymerase Chain Reaction (PCR)法による増幅後の結核菌DNAを材料とした結核菌群核酸増幅同定検査が普及しつつある。が、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から得られた結核菌DNAは、ホルムアルデヒド固定液の強酸性の影響により、DNAの断裂・断片化が生じる為、生標本材料を対象とする市販のPCRキットのような増幅領域が比較的長いプライマーの設定では検出率が極めて低く、現在、国内でのホルマリン固定材料による結核菌DNAの同定は諦められていた。

今回、我々は、ホルマリン固定材料の結核菌DNAのPCR増幅方法として、プライマーについて検討した。すなわち、好酸菌特異的膜蛋白65KDaをコードするプライマーと、結核菌に対し特異性の高い内側のを組み合わせることににより、固定剤により断裂・短縮

したDNAのPCR法による検出を検討した。

材料および方法

A. 材料

Table 1 に示すように本施設において1996年から2000年の間に結核菌症と診断された6症例につき検討を行った。陰性対象として正常肺組織を含む肺の腺癌組織、陽性対象として小川分離培地より直接菌体を採取しDNA抽出を行ったものを用いた。

sample	sampling years	fixd time	part	zichl-Neelsen stain
A	1999	5 days	lung	+
B	1999	3 days	lung	+
C	1996	3 days	lung	+
D	1998	2 days	lung	±
E	2000	10 days	lymph node	-
F	2000	10 days	lung	+

Table 1. PCR sample of M.tuberculosis detection.

B. 方法

1. パラフィンブロックからのDNAの抽出

パラフィン包埋された対象標本を10μmの厚さに薄切し、組織片2枚をマイクロチューブに移しTaKaRa DEXPATを約0.5mlを添加、攪拌、ヒートブロックにて100℃、10分間加熱処理後、4℃、1200rpmで10分間遠心分離を行い分離されたDNA抽出液を材料と

*〒940-0864 新潟県長岡市川崎1丁目2520番地1
厚生連病理センター

した。

2. プライマーの設定とPCR条件

Popperらの報告¹⁾に従い、好酸菌特異的膜蛋白65kDaをコードし、143bp領域を増幅するプライマーを用いて、1次PCRを行った。この1次PCRの反応液より1μl採取し、これらの反応物を鋳型とし、結核菌に特異性のある内側のプライマーを新たにデザインしSemi-nested PCRを行った。使用したプライマーをFig. 1、反応液の組成と反応条件をFig. 2に示す。試薬はAmpli Taq Gold (Perkin Elmer)、装置はプログラムテンプコントロールシステム PC701(Astec)を使用した。Semi-nested PCR終了後、反応液の5μlを2%アガロースゲルで電気泳動し、増幅される119bpのバンドをエチジウムプロマイド染色により検出した。

Fig. 1 M. tuberculosis DNA amplification using the primers.

1st PCR	
forward :	5'-CCA ACC CGC TCG GTC TCA A-3' (nt 580-598 , P7)
reverse :	5'-CCG ATG GAC TGG TCA CCC -3' (nt 721-704 , P8)
Semi-nested PCR	
forward :	5'-CGG CAT CGA AAA GGC CGT G-3' (nt 602-620 , TB602)
reverse :	same 1st reverse primer

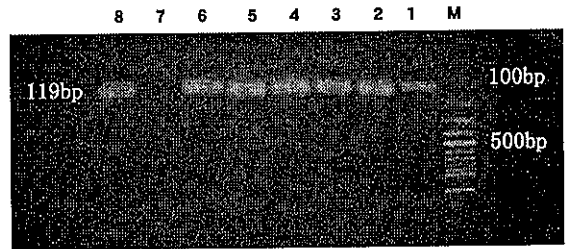
結 果

Semi-nested PCRの反応液を2%アガロースゲルにて電気泳動した結果をFig.3に示す。組織背景より結核菌症が疑われ、Ziehl-Neelsen染色の結果、結核菌の存在が認められた4例を含め結核菌の存在が明らか

Fig. 2 PCR protocol and cycle condition for M. tuberculosis detection.

1st PCR	Initial incubation 95 °C 10min. 1cycle .
× 10 Buffer with in MgCl ₂ : 2.0μl (MgCl ₂ fin 1.5mM)	Denaturing 95 °C 30sec } 30cycles
2mM dNTP : 2.0μl	Annealing 61 °C 1min. }
10pM primer (F) P7 : 0.5 μl	Extension 72 °C 1min. }
10pM primer (R) P8 : 0.5 μl	Final incubation 72 °C 10min 1cycle
dH ₂ O : 13.8μl	Hold 4 °C ∞
Taq : 0.2 μl	
Sample : 1.0 μl	
Total : 20 μl	Thermal cycler : Astec PC701
2nd PCR	
Primer mix : TB602 and P8	
Sample : 1st PCR product	

Fig. 3 Amplification of the M. tuberculosis genes coding for the 65 kDa antigen by PCR.



M : size maker 1 : sample A 2 : sample B 3 : sample C
4 : sample D 5 : sample E 6 : sample F 7 : negative control
8 : positive control

かでなかった2例についても陽性対象と同一の119bpの位置にバンドが検出され、結核菌の存在が同定された。

また、いずれのサンプルにも、ホルマリン固定による著しい影響や長期間のパラフィン包埋による、悪影響は確認できなかった。

陰性対象とした正常組織を含む肺腺癌の症例には、増幅されたバンドを検出することはなく、本法で用いたプライマーの組み合わせによるヒトDNAとの交差反応が無いことが確認された。

考 察

迅速で、かつ高感度の診断方法としてPCR法が普及しつつあるが、ホルマリンにより比較的長期に固定された病理材料からのDNAの検出には、従来、固定条件を厳格に行わない限りその応用は不向きとされてきた。^{2),3)} また、結核菌の同定にはさまざまなプライマーがデザインされ報告⁴⁾ されているが、いずれもが生標本を対象とする150bp以上であるため、過固定された病理材料からの検出感度、および再現性の面では不安定である。当施設はその性格上、提出材料が通常のホルマリン固定材料に限定されており、それらのプライマーの使用にはホルマリン固定の時間的問題により、感度および再現性が著しく不安定なため不可能と考えられ、増幅領域の短い独自のプライマーのデザインが望まれた。

Popperら¹⁾がMycobacterium属同定のために使用したプライマーの中で、Nested PCRに用いた内側のプライマーで1st PCRを行った。更に、その後、新たにデザインした結核菌に特異性のある内側のプライマーを用いてSemi-nested PCRにて増幅することにより、高い検出感度を得ることができた。その再現性も良好

なことから、本PCR法を用いることにより、通常のホルマリン固定パラフィン包埋病理標本からの結核菌DNA診断を可能にした。

また、検討の結果、パラフィン包埋から数年経過した材料からでも結核菌DNAの検出が可能であると判断された。このことは、患者病歴を振り返り再検討するうえで、パラフィン包埋された組織は、その内部に格納している貴重な情報を提供してくれる情報源と成りうることを意味するものであり、その臨床的利用価値が期待できる。

DNA抽出法に2～3日を要する従来法に比べ、市販のキットを使用することにより大幅にDNA抽出にかかる時間を短縮することができた。これにより依頼者側に対し、極めて短時間で結果報告が可能となり、本キット使用の利点は大きいものとする。

今回の、ホルマリン固定検体よりの結核菌DNA同定法の確立により、取り扱い時における感染の被曝危険がなく、この手技により、結核菌症の病理組織診断が極めて迅速で確実なことから、培養検査室での陰性症例の培養検体数の低減と、臨床側の迅速かつ適切な対応が期待できる。

ま と め

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から結核菌DNAの抽出を行い好酸菌膜蛋白抗原65KDaのなかで結核菌に特異性を示すプライマーをデザインし、同抗原を認識するプライマーと組み合わせSemi-nested PCR

法を行い結核菌DNAの検出を行った。その結果、本法が迅速で高感度、再現性が極めて良好な事から、今後の結核菌症の早期診断に有効であると判断された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本法の確立に技術的御指導を賜りました福島県立医大第二病理学教室 福田剛明助教授、防衛医科大学校法医学講座 高田雄三先生、聖隷浜松病院 病理科 小林寛部長、浅野技師、更に、情報提供を賜りました結核予防会結核研究所に対しまして厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Popper HH, Winter E, and Höfler G: DNA of mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. Clin Microbiol Infect Dis, 101:738-41, 1994.
- 2) 宮地勇人、布施川久恵：腸結核のアプローチ：遺伝子検査による診断、Medical Practice, p1123～p1127, 1997.
- 3) 日本臨床検査技師会：臨床検査遺伝子・染色体検査教本3:P31, 1999.
- 4) 三浦宏明、江崎孝行：PCR法による結核菌の検出：臨床病理, 42; 162-4, 1994.

Original article

Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue by the polymerase chain reaction

Hidehiro Hasegawa* and Toshihiko Igarashi*

This study was conducted to establish the conditions for identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA by the polymerase chain reaction (PCR). Tissue samples were collected from 6 patients in our center who had been clinically or pathologically diagnosed as having tuberculosis since 1995. We assessed primers to identify *M. tuberculosis* DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and established the detection conditions. As a result we were able to detect *M. tuberculosis* DNA by PCR by combining the primer encoding the 65kDa protein specific to anaerobic bacteria and the primer for an internal portion that is highly specific for *M. tuberculosis*. This technique appears to be useful in the PCR identification of *M. tuberculosis* DNA from pathological specimens in terms of sensitivity, specificity, and reproducibility. It will contribute to the early diagnosis of tuberculosis.

Key words : polymerase chain reaction (PCR), *Mycobacterium tuberculosis*, formalin-fixed and paraffin-embedded tissue

*Kouseiren Byori Center
Kawasaki2520-1, Nagaoka, Niigata940-0864