

原 著

# Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法による結核菌DNAの同定

長谷川 秀 浩\* 五十嵐 俊 彦\*

病理組織背景から結核症が疑われた5例に関して、その10%中性ホルマリン固定パラフィン包埋組織から得られたDNAを用いてPCR-RFLP法による結核菌同定について検討を行なった。DNAの抽出については市販のDNA抽出キットを使用することにより所要時間を大幅に短縮することができた。抗酸菌群のDNA検出には抗酸菌群特異的膜蛋白65kDaをコードするプライマーによりnested PCR増幅を行なった。固定用のホルマリンを中性化することによりDNAの受けるダメージを軽減化し、かつ比較的短い領域を増幅するプライマーを設定したことにより、その検出感度および再現性を良好に保つことができた。さらに増幅された抗酸菌群のDNAはそれぞれの塩基配列の違いを利用したRFLP法により解析を行なった結果、検討した全症例に結核菌DNAの存在が認められた。また本法を用いることにより非定形型抗酸菌の同定の可能性についても期待されることから、今後の結核菌症を含む抗酸菌感染症の早期診断に大きく貢献できるものと考えられた。

キーワード：PCR、PCR-RFLP、結核菌、非定形型抗酸菌、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、特異的な組織背景の中にZiehl-Neelsen染色により菌体を証明することにより確定されてきた。しかし、結核菌の染色法として一般に実施されているZiehl-Neelsen染色は結核菌の存在を迅速に確認できる優れた方法であるが、検出された菌が結核菌であるか非定形型抗酸菌であるかの判断はできない。したがって従来より、菌の同定には分離培養法が行なわれてきた。しかし分離同定までには日数がかかることや熟練された技術を要することなど、迅速な診断には不適と判断される。血清免疫学的検出法では、結核菌そのものを確認するのではなく結核菌により反映された抗体価の上昇が判断指標とされるため時間のずれや既往症での継続した抗体の検出などの問題もあり結核菌の存在時期を反映することは困難である。しかし、近年の分子生物学の進歩により病原遺伝子を核酸レベルで検索するPolymerase chain reaction (PCR) 法が用いられるようになり、各種感染症の診断法として応用され始めている。本PCR法は微量の材料からでも目的とする遺伝子を増幅させることができることから、迅速で高感度・高特異性とされている。結核菌を対象とした場合、市販のPCRキットでは液状検体のみを対象としていることから、病理組織標本により結核菌症が推測できた場合においても検体の採取が再度必要とされる。また、通常ホルマリン固定パラフィン包埋された組織から抽出されたDNAを用いてPCRを行なった場合、ホルムアルデヒドの影響によりDNAが断片化されていることから、比較的長い領域を増幅するようなプライマーの設定では検出感度および再現性の面において著しく不安定である。<sup>1)2)</sup>したがって病理材料を対象とした場合には、より検出感度の高いnested PCR法での検出が望ましいとされている。<sup>3)</sup>

今回、我々は結核菌DNAの検出法として、(1)10%中性ホル

Table 1. PCR-RFLP samples of M.tuberculosis detection.

sample	age	sex	organ	Ziehl-Neelsen stain
A	72	M	lung	-
B	79	M	lung	-
C	63	M	lung	+
D	80	M	lung	-
E	85	M	lung	+

+ : confirmed      - : not confirmed

マリン固定材料から抽出されたDNAを用いて、(2)抗酸菌群が特異的にもつ蛋白質をコードするプライマーによりnested PCR法を行ない、次に、(3)その反応産物を制限酵素断片長多型性restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法により解析を行なった結果、結核菌と非定形型抗酸菌の鑑別が可能であったので報告する。

## 材料および方法

### 材 料

本施設において結核菌症が疑われた5症例に関して、その10%中性ホルマリン固定パラフィン包埋組織について検討をおこなった。(Table 1) 対象として、分離培養されたM.tuberculosis, M.avium, M.scrofulaceumのコロニーから直接菌体を採取し、同様に10%中性ホルマリン固定後、核酸抽出を行なったものを用いた。

### 方 法

#### A. パラフィンブロックからのDNA抽出

パラフィン包埋された組織を10 $\mu$ mの厚さに薄切し、その組織片2枚をマイクロチューブに取り、TaKaRa DEXPATを約0.5m $\mu$ 添加、攪拌し、ヒートブロックにて100 $^{\circ}$ C、10分間加熱処理した。その後、4 $^{\circ}$ C、1400rpmで10分間遠心分離を行ない、その分離されたDNA抽出液を材料とした。

#### B. PCR条件とRFLP解析

\*〒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

Table 2. Primer sequences used for mycobacterial DNA amplification.

1st PCR	
forward :	5'-Agg cgt tgg ttc gog Agg g-3' (#bp 538-556)
reverse :	5'-tgA tgA ogo cct cgt tgc c-3' (#bp 771-753)
-----	
nested PCR	
forward :	5'-ooA Acc ogo tog gtc toA A-3' (#bp 580-598)
reverse :	5'-cog Atg gAc tgg toA ccc-3' (#bp 721-704)

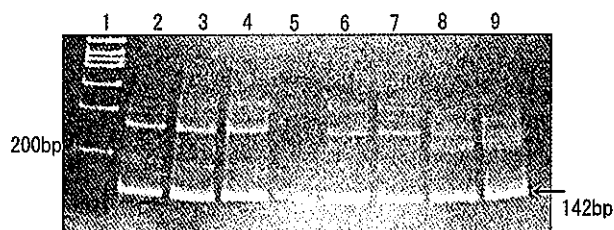
Table 3. PCR protocol and cycle condition for mucobacterial DNA amplification.

PCR protocol	PCR condition
(1) 1st PCR ×10 buffer with in MgCl <sub>2</sub> : 2.0 μl MgCl <sub>2</sub> fin 1.5mM	Initial incubation 95°C 1 cycle
2mM dNTP : 2.0 μl	Denaturing 95°C Annealing 58°C Extention 72°C } 1st PCR 30 cycles 2nd PCR 27 cycles
20pM primer (P5) : 0.5 μl	
20pM primer (P8) : 0.5 μl	
dH <sub>2</sub> O : 13.8 μl	Final extention 72°C 1 cycle
Taq : 0.2 μl	
Sample : 1.0 μl	Hold 4°C
Total : 20 μl	
(2) 2nd PCR primer mix : P7 and P8 Sample : 1st PCR product	Thermal cycler : Astec PG701

Popper等<sup>4)</sup>の報告に従い抗酸菌特異的膜蛋白65kDaの塩基の一部をコードするプライマーを用いて、1次PCR (1stPCR)を行なった。この1次PCR反応液より1 μlを採取し、これらを鋳型とする内側のプライマーにより2次PCR (nested PCR)を行なった。nested PCRの反応液3 μlを用いて12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動、エチジウムブロマイド (EtBr) 染色を行ない紫外線 (UV) イルミネーターにより増幅された好酸菌群のDNAの検出を行なった。FRLP法による解析にはnested PCR法により増幅された反応産物10 μlを、制限酵素Acc II (TaKaRa) 10Uにて37°C、2時間反応後、12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動、EtBr染色を施し、UVイルミネーターによりそれぞれの泳動パターンを観察した。使用したプライマーをTable 2、反応液の組成と反応条件をTable 3に示す。装置はプログラムテンプレートシステムPC701 (Astec, Japan)を使用した。

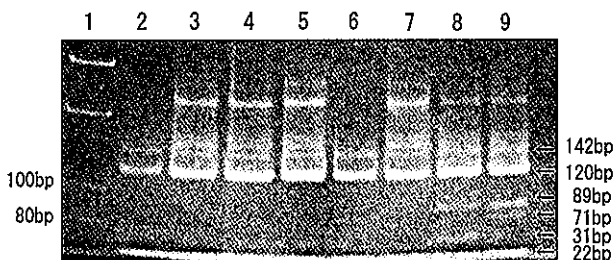
### 結果

nested PCRの反応液を12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動した結果をFig. 1に示す。Zhiel-Neelsen染色により抗酸菌が認められた2例を含め結核菌症が疑われた全例に、陽性対象と同一の142bpの位置にバンドが検出された。nested PCR反応液を制限酵素Acc IIにより切断後12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動した結果をFig. 2に示す。検討した全症例について陽性対象としたM. tuberculosisの泳動パターンと同様の142bp、120bp、22bpの位置にバンドが検出された。同様に対象としたM. aviumでは142bp、120bp、89bp、31bp、22bpにM. scrofulaceumでは142bp、120bp、89bp、71bp、22bpの位置にバンドが検出されそれぞれ菌により特異的な泳動パターンを示した。なお、これらのバンドの位置はDNAシーケンス上で理論的に予想された制限酵素の切断処理によるバンドの位置と一致するものであった。



1:DNA Ladder 2:Sample A 3:Sample B 4:Sample C  
5:Sample D 6:Sample E 7:M. tuberculosis  
8:M. avium 9:M. scrofulaceum

Fig 1. Amplification of the mycobacterial genes coding for the 65kDa antigen by PCR (not digested by Acc II)



1:DNA Ladder 2:Sample A 3:Sample B 4:Sample C  
5:Sample D 6:Sample E 7:M. tuberculosis  
8:M. avium 9:M. scrofulaceum

Fig 2. Analysis of the mycobacterial DNA by PCR-RFLPs method (digested by Acc II)

### 考察

結核菌症の確定診断において、迅速な結核菌の検出が不可欠であると同時に、近年増加傾向にあり菌種の多様化がみられる非定形型抗酸菌症との鑑別も重要である。そこで迅速かつ高感度の診断方法としてPCR法による結核菌DNAの検出が行なわれている。しかしながら、組織背景から結核菌症が推測されても、病理組織材料からの結核菌DNAは市販のPCRキットでは検出はできない。通常の10%ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出されたDNAはホルムアルデヒドの影響により断片化されていることより検出感度および再現性の面で極めて不安定である。したがって、増幅領域の短いプライマーを設定<sup>5)</sup>するか、固定液として用いられているホルマリンのpHを調節した中性ホルマリン等を使用しDNAへのダメージを最小限に抑える必要がある。PCR法による結核菌同定にはさまざまなプライマーがデザインされ報告<sup>6)</sup>されているが、いずれも生標本を対象としたPCR産物150bp以上であることよりホルマリン固定材料には不向きである。我々は固定用のホルマリンを比較的調整しやすい中性ホルマリン (pH6.0) に変更することと、PCR法による増幅領域が142bpと比較的短いプライマーを用いることにより、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抗酸菌群のDNAの検出を可能にした。同時に、その検出感度および再現性は極めて高いものと判断された。さらに検出された菌の同定には抗酸菌特異的膜蛋白65kDaをコードするプライマーを使用し抗酸菌群全体のDNAを増幅していることから、そのDNAシーケンスより結核菌と他の抗酸菌群間で

塩基配列が異なる部分を制限酵素で切断することにより非定形型抗酸菌との鑑別が可能であった。また、結核菌のみならず、諸種の制限酵素を組み合わせることにより、検出された抗酸菌の同定も可能<sup>7)</sup>であると判断され、その診断範囲はさらに発展する余地があると考えられた。抗酸菌感染症での原因菌の同定については個々の症例で病態にかかわる有益な情報を提供してくれるものと考えられた。

本法でのDNA抽出法は市販のDNA抽出キットを使用することにより抽出に要する時間が大幅に短縮され、極めて短時間のうちに依頼者側への報告が可能とされた。これは迅速性が要求される結核菌診断において本キットの活用による利点は大きいものと考えられた。<sup>8)</sup>

臨床的に結核症の診断は菌の検出同定をもって行なうことが望ましいことから、今後ますます迅速で高感度であるPCR法の有用性は高くなるものと考えられ、特に臨床像が複雑化している近年の結核症や菌種の多様化が見られる抗酸菌感染症において、本法が効率的かつ適切に活用されることは結核症および鑑別すべき他疾患の管理に大きく貢献できるものと期待できる。

#### — 結 語

組織背景より結核菌症が疑われた5例の10%ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出されたDNAを用いて抗酸菌特異的膜蛋白65kDaに対するNestedPCRをおこなった。そのPCR産物をRFLP法で解析した結果、全例に結核菌DNAの陽性所見が検出された。同時にその検出感度、再現性ともに良好であり、非定形型抗酸菌の同定の可能性も含め、本法は今後の結核菌症を含む抗酸菌感染症の診断に対し極めて有効な手段であると判断された。

#### 参考文献

- 1) 宮路勇人, 布施川久恵: 腸結核のアプローチ—遺伝子検査による診断. 診断の進歩と対策. Medical Practice 1997; 14: 1123-1127.
- 2) 日本臨床検査技師会: 臨床検査遺伝子・染色体教本 3: p31, 1999.
- 3) 森田幹太, 小泉宏隆, 高桑俊文: PCR法を用いたホルマリン固定パラフィン包埋材料からの結核菌DNAの検出. 病理と臨床 1997; 15: 433-437.
- 4) Popper HH, Winter E, and Hofler G: DNA of mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. Clin Microbiol Infect Dis 1994; 101: 738-741.
- 5) 長谷川秀浩, 五十嵐俊彦: 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. 新潟県厚生連医誌 2000; 10(1): 21-24.
- 6) 三浦宏明, 江崎孝行: PCR法による結核菌の検出. 病理と臨床 1994; 42: 162-164.
- 7) Cook, S. M., Bartos, R. E., Person, C. L. et al: Detection and characterization of atypical mycobacteria by the polymerase chain reaction. Diagn Mol Pathol 1994; 3: 53-58.
- 8) Ikarashi T, Hasegawa H. Detection of monoclonality in B-cell lymphoma by polymerase chain reaction (PCR) with the use of DNA extraction kit (TaKaRa DEX-PAT) for formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Niigata-ken kouseiren Med J 2000; 10(1): 16-20.

Original article

## Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP)

Hidehiro Hasegawa\* and Toshihiko Ikarashi\*

This study was conducted to establish the conditions for an identification of mycobacterium tuberculosis DNA by the polymerase chain reaction and restriction length polymorphism(PCR-RFLP). The examined tissues were routinely processed paraffin | embedded sections. Those have been pathologically diagnosed as having tuberculosis. Mycobacterial gene for PCR encoded 65kDa mycobacterial surface protein. Amplification of mycobacterial gene was conducted by both the first routine PCR and the nested PCR method. The PCR products were digested with the restriction enzyme (Acc II) . As a result, We were able to not only distinguish M. tuberculosis and atypical mycobacteria but also discriminate the subtypes of atypical mycobacteria by PCR-RFLP. This technique appears to be very useful to confirm the M. tuberculosis DNA from pathological specimens.

Key words : polymerase chain reaction (PCR), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), M. tuberculosis, formalin-fixed and paraffin-embedded tissue —

---

\*Kouseiren Byouri Center  
Kawasaki 2520-1, Nagaoka, Niigata 940-0864