

Polymerase chain reaction (PCR) 法によるホルマリン
固定パラフィン包埋標本からの結核菌DNAの検出：
病理組織診断への応用

鳥取大学医学部病理学第一教室 (主任 井藤久雄教授)¹⁾

鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室 (主任 押村光雄教授)²⁾

鳥取大学医療技術短期大学部 (主任 吉田春彦教授)³⁾

尾崎充彦^{1,2)}, 朝倉靖恵³⁾, 岩尾佳子³⁾, 嶋林亜希³⁾,
安達博信¹⁾, 吉田春彦³⁾, 井藤久雄¹⁾

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from
formalin-fixed, paraffin-embedded specimens using
polymerase chain reaction (PCR) method
(Application for histopathological diagnosis)

Mitsuhiro OSAKI^{1, 2)}, Yasue ASAKURA³⁾, Yoshiko IWAO³⁾,
Aki SHIMABAYASHI³⁾, Hironobu ADACHI¹⁾,
Haruhiko YOSHIDA³⁾, Hisao ITO¹⁾

¹⁾First Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Tottori University, Yonago 683, Japan

²⁾Department of Molecular & Cell Genetics, School of Life Science,
Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683, Japan

³⁾College of Medical Care Technology,
Tottori University, Yonago 683, Japan

ABSTRACT

We examined ten cases with granulomatous or necrotizing lymphadenitis analysing by histopathology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction (PCR) using two primers to amplify *Mycobacterium*-common DNA and *M. tuberculosis*-specific DNA. Seven cases with granulomatous inflammation were consisted of 4 cases of tuberculosis, one atypical mycobacteriosis, one sarcoidosis. One case could not be determined the pathogenesis because of unsuccessful DNA extraction. Immunohistochemistry revealed positive finding in three of five cases in which the presence of *Mycobacterium* was confirmed by the PCR. Three cases of necrotizing lymphadenitis showed no immunoreactivity and no amplified DNA by the PCR. These results indicated that the PCR assay is available on DNA extracted from formalin-fixed, paraffin embedded specimen and provides extremely valuable information on the diagnosis of granulomatous inflammation such as tuberculosis or sarcoidosis.

(Accepted on July 3, 1995)

Key words : PCR, formalin-fixed paraffin-embedded specimens, tuberculosis, atypical mycobacteriosis, sarcoidosis.

はじめに

結核は世界中で年間約1,000万人の患者が発生し、100万から300万人が死亡していると推定されている⁸⁾。わが国においては生活水準の向上や化学治療薬の開発により患者数は激減したが、最近になってその減少傾向に翳りがみえてきた。その背景として若年者層における既感染率の低下や、外国人労働者の激増などがあげられている。また米国においては多剤耐性結核菌の出現が報告されており⁹⁾、今後の結核対策は必ずしも楽観視できない。

結核菌の同定には塗抹法と培養法が用いられているが⁶⁾、それぞれに問題点がある。前者は迅速であるが、通常10000個以上の菌数が必要でありその検出感度は必ずしも高くなく、菌種の同定ができない。他方、後者の培養法は検出感度が高いが、抗酸菌の増殖速度が遅いため、その培養に4-8週間が必要である。しかも、結核菌と非定型抗酸菌をニアシントで鑑別、生化学的に同定するには更に1-2週間の期間が必要である。組織学的に結核は特徴的な肉芽腫を形成するが、非定型抗酸菌症やサルコイドーシス症(「サ症」)との鑑別が困難であり、Ziehl-Neelsen法などの抗酸菌染色でもその検出率は低い⁷⁾。これら諸問題の解決のため、結核菌迅速診断法の開発が望まれており、その重要性は高まりつつある。近年では、液体培地を用いる方法⁴⁾、免疫組織化学染色法⁷⁾およびDNAプローブ法¹²⁾などが検討されているが、検査期間、感度およびラジオアイソトープ使用等の点で必ずしも満足できるものではない。

Polymerase chain reaction(PCR)法を用い患者の喀痰、気管支洗浄液あるいは胃液などからえられたDNAを検体として、結核菌の同定が試みられている¹⁴⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。本法は微量検体からの菌DNAの検出が可能であるばかりでなく、結果が数日以内に得られる利点が大い。そこで、肉芽腫性炎症と診断されていたリンパ節のホルマリン固定、パラフィン包埋標本を用い、PCR法による結核菌の有無を検索した。得られた結果は抗酸菌染色

および免疫組織化学染色と比較し、その有用性を検討した。

材料および方法

鳥取大学医学部病理学第一講座で組織診断が実施され、肉芽腫性リンパ節炎と診断されていた標本7症例と壊死性リンパ節炎3症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを選んだ。3 μ mの連続切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色(HE染色)標本で組織学的検索をおこなった後、Ziehl-Neelsen法(ZN法)および免疫組織化学染色(immunohistochemistry;IHC)を施行した。HE染色およびZN法には通常のスライドガラスを、IHCにはシランコートスライドガラス(松浪硝子工業、大阪)を使用した。PCRの陽性コントロールとして培養*M. tuberculosis*、*M. avium*より抽出したDNAを用いた。

免疫組織化学染色(IHC)

3 μ mに薄切した連続切片を脱パラフィン後水和水し、2%過酸化水素水加メタノール液で室温、20分間反応させ内因性ペルオキシダーゼをブロックし、流水にて水洗した。抗原を賦活化させるため前処理として10mMクエン酸緩衝液に浸し、電子レンジ(500W)で10分間照射した。非特異的の反応阻止のため10%ヤギ正常血清を反応させ、その後一次抗体として3000倍希釈した抗Bacillus Calmette-Guerin(BCG)抗体(DAKO社)を用い4 $^{\circ}$ C、一晚反応させた。リン酸緩衝液で3回洗浄後、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギIgG抗体を室温、20分間反応させた。可視化には、過酸化水素水加diaminobenzidine(DAB)にて7分間発色させた。メチルグリーンで対比染色した後、脱水、封入し検鏡した。

パラフィンブロックからのDNA抽出

4-10 μ m切片を10-30枚薄切しキシレンで脱パラした後水和水し、常法⁹⁾に従いSDS・Protainase K処理によりDNA抽出をおこなった。また、培養菌も同様の処理によりDNAを抽出した。

プライマー

プライマーは抗酸菌を広く認識するプライマー(TB-1、TB-2)¹¹⁾¹⁶⁾と結核菌群を特異的に認識す

るプライマー (MPB64-1, MPB64-2)¹³⁾を用いた。前者は、抗酸菌の表面抗原をコードする領域を増幅するプライマー (TB-1:5'-GAGATCGAGCTGGAGGATCC-3', TB-2:5'-ACGTGCAGCCCAAAGGTGTT-3')であり、383bpのDNAが増幅された。後者は、結核菌群に特異的なプライマー (MPB64-1:5'-TCCGCTGCCAGTCGTCTTCC-3', MPB64-2:5'-GTCCTCGCGAGTCTAGGCCA-3')であり、240bpのDNAが増幅された。これらのオリゴヌクレオチドは受託合成し、10 μ Mに調整して用いた。また、DNAの保存状態を調べる目的でヒト β -globin遺伝子領域を増幅させるプライマー (GH-21:5'-GGAAAATAGACCAATAGGCAG-3', PCO3:5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGC-3')¹⁰⁾を用いた。これは、250bpのDNAが増幅された。

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR反応液は1サンプル当り、10x Reaction buffer (100mM Tris-HCl pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 5 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTPをそれぞれ2.5mMを含む) 4 μ l, Taq polymerase (5U/ μ l, TaKaRa) 0.2 μ l, センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ0.5 μ l, 蒸留水で1 μ g当量に希釈したサンプルDNA溶液39.8 μ l混ぜ総量50 μ lとなるよう調整した。

DNAの増幅は、PHC-3 Dri-Block Cyclor (Techne社)を用いた。反応条件は、DNA変性94 $^{\circ}$ C 1分、アニーリング55 $^{\circ}$ C (β -globin遺伝子の場合53 $^{\circ}$ C) 2分、DNAの合成72 $^{\circ}$ C 2分を1サイクルとし35-40サイクルおこなった。増幅されたDNAは3%アガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によってバンドを検出した。

結 果

病理組織学的検索において症例1~7は肉芽腫性、症例8~10は壊死性リンパ節炎と診断されていた (表1)。ZN染色では何れにおいても抗酸菌を見いだすことが出来なかった。免疫組織化学染色では肉芽腫性リンパ節炎7例中3例において散在性に免疫活性が見いだされた (症例1, 5, 6)。

PCRによる検索では増幅されたDNAが明瞭なバンドとして見いだされ、判定は容易であった (図1)。なお、症例2ではコントロールとして増幅した β -globinのバンドが検出されず、PCRによる検討が出来なかった。肉芽腫性リンパ節炎7例では*Mycobacterium*に共通なDNAが5例、結核菌特異的DNAが4例に見いだされ、後者は何れも結核症と診断された。なお、4例中2例では免疫染色にて抗酸菌が見いだされていた。症例1は光

Table 1. Analysis by immunohistochemistry (IHC) and polymerase chain reaction (PCR) on 10 lymph nodes with granulomatous and necrotizing lymphadenitis

Case	Clinical Diagnosis	IHC		PCR		Final Diagnosis	
		+	-	Mb ¹⁾	Tb ²⁾		β -globin
1.	Tuberculosis	+	+	-	-	+	Atypical mycobacteriosis
2.	Tuberculosis	-	-	-	-	-	not determined
3.	Tuberculosis	-	+	+	+	+	Tuberculosis
4.	Tuberculosis	-	+	+	+	+	Tuberculosis
5.	Sarcoidosis	+	+	+	+	+	Tuberculosis
6.	Sarcoidosis	+	+	+	+	+	Tuberculosis
7.	Sarcoidosis	-	-	-	-	+	Sarcoidosis
8.	N. Lymphadenitis ³⁾	-	-	-	-	+	N. Lymphadenitis
9.	N. Lymphadenitis	-	-	-	-	+	N. Lymphadenitis
10.	N. Lymphadenitis	-	-	-	-	+	N. Lymphadenitis

1) Mb, *Mycobacterium*-common primer (TB-1, TB-2)

2) Tb, *M. tuberculosis*-specific primer (MPB64-1, MPB64-2)

3) N. Lymphadenitis, Necrotizing Lymphadenitis



Figure 1. Results by PCR analysis

- a) PCR products of *Mycobacterium*-common DNA.
 b) PCR products of *M. tuberculosis* complex specific DNA.
 c) PCR products of human β -globin DNA.

Lane M, DNA molecular weight standard (123bp DNA ladder). Lane 1~10, samples corresponded to No. of table 1. Lane 11, *M. tuberculosis* DNA.

Lane 12, *M. avium* DNA. Lane 13, absence of target DNA. Lane 14, human genomic DNA.

顕的に典型的な乾酪壊死を伴った大小種々の肉芽腫が形成されており (図 2), 断定はされていなかったが結核症として治療が進められていた. しかしながら, *Mycobacterium* 共通 DNA 陽性, 結核菌特異的 DNA 陰性所見から非定型的抗酸菌症が示唆され, その後の培養結果から確認された.

サルコイドーシス (「サ」症) が疑われていた 3 例中 2 例では免疫染色陽性, 加えて *Mycobacterium* 共通および結核菌特異的 DNA とも見いだされ, 結核症と診断された. 症例 6 は右縦隔リンパ節であり, 顕的には乾酪壊死を伴わない比較的小型の肉芽腫が形成されており, 免疫染色陰性, *Mycobacterium* 共通, 結核菌特異的 DNA の何れも陰性であり, これらの所見を総合して「サ」症と診断された.

壊死性リンパ節炎 3 例では免疫染色, *Mycobacterium* 共通, 結核菌特異的 DNA の何れも陰性であった.

考 察

肉芽腫性炎症は特異炎症とも呼称され, その組

織形態学的特徴からその成因を推定できるとされている. しかしながら, 結核型肉芽腫は結核菌のみならず多種の非定型的抗酸菌によっても形成され, 時には「サ」症の肉芽腫と類似することがある. これらは互いに治療法が異なり, その鑑別は重要である.

抗酸菌の組織学的な同定には ZN 法や免疫染色が用いられてきたが, 何れも感度において必ずしも満足できるものではない. 今回の検索では ZN 法では菌体検出が出来ず, また免疫染色では *Mycobacterium* 感染症 5 例中 3 例のみに免疫活性が見いだされている. しかも, 非定型抗酸菌症と結核症との鑑別は出来ない. 病理組織検査と同時に迅速かつ感度の高い検査法が望まれ, 現在 PCR 法を用いた方法が応用されつつある²⁾⁵⁾¹¹⁾.

本研究で用いたプライマーはすべての抗酸菌に共通した DNA 配列と結核菌特異的 DNA (MPB 64) を増幅するものであり, 両者を用いることにより結核症の診断のみならず, 非定型抗酸菌症あるいは「サ」症との鑑別が可能であった. 事実, 症例 1 では非定型抗酸菌症が示唆され, その後の培

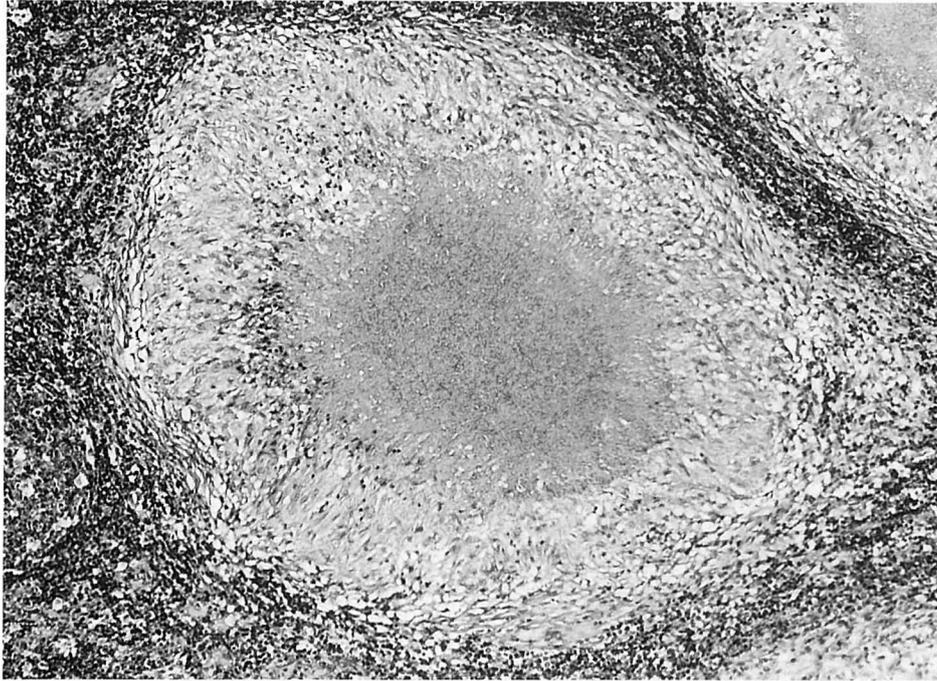


Figure 2. Granulomatous lesion with caseous necrosis in atypical mycobacteriosis (HE staining, x70)

養結果から菌の同定がなされていた。又、臨床的に「サ」症が疑診されていた3例では、2例（症例5, 6）が組織学的に乾酪壊死を伴ってはいなかったがPCR解析により結核と診断された。PCRの迅速性も大きな利点である。結果は3日以内に得られ、病理組織診断と同時に報告することが可能である。現在、*M. avium* complexなどの非定型抗酸菌に特異的なプライマーを用いたり¹⁹⁾、あるいはPCR産物を制限酵素消化により得られたバンドの大きさの違いから菌種を同定するPCR-RFLP法¹⁵⁾が開発されており、喀痰等の臨床検体の検査に応用されつつある。今後、パラフィン包埋ブロックからのDNAを用いて組織診断と同時に迅速な菌種の同定が可能であると考えられる。

症例2ではヒト β -globin遺伝子の増幅が出来なかった。不適切な固定操作（ホルマリン固定）により、DNAに断片化等が生じた可能性がある。改良する方法として非酸性の固定液、例えばアルコール固定液を用いることで、核酸の保存を良好にすることができると考えられる。

結 語

リンパ節標本10症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックからDNAを抽出し、抗酸菌およ

び結核菌の同定をPCR法によって行い、病理組織所見および抗*Mycobacterium*抗体を用いた免疫組織化学的検索の結果と比較した。結果は以下の如く要約される。

- 1) DNAの抽出は1例を除き可能であり、PCRにて明瞭なバンドが得られた。
- 2) 肉芽腫性リンパ節炎7例中4例は結核症、1例は非定型抗酸菌症、1例は「サ」症と診断された。
- 3) 免疫染色ではPCRにて抗酸菌が証明された5例中3例で菌体が見いだされた。
- 4) 壊死性リンパ節炎では免疫染色陰性であり、PCRにてバンドは得られなかった。

以上より、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを応用したPCRは肉芽腫性病変の組織診断に精度の高い情報を迅速に提供するのみならず、確定診断も可能であることが示唆された。

文 献

- 1) Brisson-Noel, A., Gicquel, B., Lecossier, D., Levy-Frevault, V., Nassif, X. and Hance, A.J. (1989). Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* Nov. 4, 1069-1071.

- 2) Cook, S.M., Bartos, R.E., Pierson, C. L. and Frank, T.S. (1994). Detection and characterization of atypical mycobacteria by the polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 3, 53-58.
- 3) Culliton, B.J. (1992). Drug-resistant TB may bring epidemic. *Nature* 356, 473
- 4) D'amat, R.F., Isenberg, H.D., Hochstein, L., Mastellone, A.J. and Alperstein, P. (1991). Evaluation of the Roche Septi-Chek AFB system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 29, 2906-2908.
- 5) Ghossein, R.A., Ross, D.G., Salomon, R.N. and Rabson, A.R. (1992). Rapid detection and species identification of mycobacteria in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1, 185-191.
- 6) 金井 泉, 金井正光. (1979). 臨床検査法提要. XXI-42-53. 金原出版株式会社. 東京.
- 7) 川井健司, 堤 寛. (1984). 酵素抗体法による抗酸菌同定の試み. *病理と臨床* 2, 862-867.
- 8) Murray, C.J.L. and Lopez, A.D. (1994). Global and regional cause of death patterns in 1990. *WHO Bulletin OMS* 72, 447-480.
- 9) Perosio, P.M. and Frank, T.S. (1993). Detection and species identification of mycobacteria in paraffin sections of lung biopsy specimens by the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 100, 643-647.
- 10) Popper, H.H., Winter, E. and Hofler, G. (1994). DNA of mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 101, 738-741.
- 11) Richter, E., Schluter, C., Duchrow, M., Hahn, M., Rusch-Gerdes, S., Galle, J., Flad, H. and Gerdes, J. (1995). An improved method for the species-specific assessment of mycobacteria in routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Pathol* 175, 85-92.
- 12) Saito, H., Tomioka, H., Sato, K., Tasaka, H. and Dawson, D.J. (1990). Identification of various serover strains of mycobacterium avium complex by using DNA probes specific for mycobacterium avium and mycobacterium intracellulare. *J Clin Microbiol* 28, 1694-1697.
- 13) Shanker, P., Manjunath, N., Lakshmi, R., Aditi, B., Seth, P. and Shriniwas (1990). Identification of mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction. *Lancet* 335, 423.
- 14) 竹脇俊一, 奥住捷子, 永井良三, 大久保昭行 (1992). 感染症のDNA診断. *臨床科学* 28, 455-462.
- 15) Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E.C. and Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31, 175-178.
- 16) Shinnick, T.M. (1987). The 65-kilodalton antigen of mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol* 169, 1080-1088.
- 17) Totsch, M., Schmid, K.W., Brommelkamp, E., Stucker, A., Puelacher, C., Sidoroff, G., Mikuz, G., Bocker, W. and Dockhorn-Dworniczak, B. (1994). Rapid detection of mycobacterial DNA in clinical samples by multiplex PCR. *Diagn Mol Pathol* 3, 260-264.
- 18) 植松香星, 佐多徹太郎, 佐藤由子, 前田義治, 若林とも, 倉田 毅, 三木礼子, 千葉直彦, 石川晃一 (1993). PCR法による喀痰中およびAIDS関連材料の抗酸菌DNA検出および菌種同定. *感染症学雑誌* 67, 421-428.
- 19) Wilton, S. and Cousins, D. (1992) Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl* 1, 269-273.