

□ 원 저 □

조직내교잡법을 이용한 결핵균의 검출

전남대학교 의과대학 병리학교실 및 내과학교실¹, 서남대학교 의과대학 병리학교실² 및 기생충학교실³

박창수, 김영철¹, 이지신², 정종재², 김두홍³, 김 진³

= Abstract =

Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* by *In Situ* Hybridization

Chang-Soo Park, M.D., Young Chul Kim, M.D.¹, Jee Shin Lee, M.D.²,
Jong Jae Jung, M.D.², Doo-Hong Kim, M.S.³, and Jin Kim, M.D.³

Department of Pathology and
Department of Internal Medicine¹ Chonnam University Medical School, Kwangju 501-190,
Department of Pathology² and Department of Parasitology³,
College of Medicine, Seonam University, Namwon 590-711, Korea.

Background : A presumptive histopathologic diagnosis of tuberculosis is commonly based on the finding of acid-fast bacilli upon microscopic examination of a diagnostic specimens. Although this traditional histochemical staining method is satisfactory, it is time-consuming and not species-specific. For more specific assessment, *in situ* hybridization assay with oligonucleotide probes is introduced.

Methods : The human surgical specimens were obtained from tuberculosis patients, and experimental specimens were made by injecting cultured *M. tuberculosis* organisms into fresh rat liver. Oligonucleotide probes complementary to ribosomal RNA portion were synthesized and labeled with multiple biotin molecules. For a rapid detection, all procedures were carried out using manual capillary action technology on the Microprobe staining system.

Results : The *in situ* hybridization assay produced a positive reaction in experimental specimens (80-90% sensitivity) after pepsin-HCl pre-treatment for a good permeabilization of probes, but reliable result was not obtained from human surgical specimens.

¹본 연구는 1997년도 교육부 기초의학 학술연구조성비 지원으로 수행되었습니다.

Address for correspondence :

Chang-Soo Park, M.D.

Department of Pathology, Chonnam University Medical School

5 Hak-1-dong, Dong-gu, Kwangju 501-190, Korea.

Phone : 062-220-4300 Fax : 062-227-3429 E-mail : cspark@chonnam.chonnam.ac.kr

Conclusion : It is, therefore, suggested that biotin-labeled oligonucleotide probes have considerable potential for identification and *in situ* detection of *M. tuberculosis* but, there are some barriers to overcome for the diagnostic use of this method. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 699-708)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, *In situ* hybridization, RNA, ribosomal, Mycolic acid, Oligonucleotide probe.

서 론

결핵은 결핵균복합체(*Mycobacterium tuberculosis* complex)로 알려진 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* 및 *M. africanum* 등에 의해서 발생한다고 알려져 있다. 이 중 가장 흔한 원인이 되는 결핵균(*M. tuberculosis*)은 $3 \times 0.5 \mu\text{m}$ 크기의 약간 굵었거나 곧은 간균으로 그람양성의 호기성세균이다. *Mycobacterium* 속의 세균은 세포벽의 높은 지질함량 때문에 투과력이 저하되며 염색 시 항산성(acid fast)을 갖는다. 조직학적으로 결핵을 진단할 때는 Kinyoun 혹은 Ziehl-Neelsen 염색을 수행한 후 조직절편에서 항산성을 갖는 병원체를 검출함으로써 어느 정도 추정해 볼 수 있다. 그러나 이러한 염색법은 시간이 많이 걸리며, 특이성도 낮다고 할 수 있다. 이는 항산성을 나타내는 세균의 종류가 *Mycobacterium* 속의 여러 가지 균을 포함하여 *Norcardia* 속, *Rhodococcus* 속, *Legionella micdadei* 나 일부의 *Corynebacterium* 속 등에 속하는 다양한 균종이 있기 때문이다¹. 따라서 조직학적으로 결핵을 확진하기 위해서는 보다 높은 특이성을 갖는 염색법의 도입이 필요한 실정이다.

조직내교잡법(*in situ* hybridization)은 탐식자(probe)를 이용하여 조직절편이나 슬라이드에 도말된 세포 내에서 원하는 염기서열을 갖는 DNA나 RNA의 위치를 효과적으로 검출할 수 있는 분자병리학적 검사방법으로 특히 감염성 질환의 진단에 많이 이용되고 있다²⁻⁵. 다른 부합법(hybridization technique)과는 달리 세포나 조직의 형태학적 구조가 잘 보존되어 있기 때문에 게놈(genome)의 위치를 현미경으로

직접 확인할 수 있어 특이성이 매우 높은 방법으로 알려져 있다. 올리고뉴클레오타이드 탐식자(oligonucleotide probes)를 이용한 조직내교잡법은 조직절편에서 병원성을 갖는 바이러스², 세균³, 진균⁴ 및 원충⁵ 등을 검출하는데 있어 좋은 성과를 보이고 있으나, 그람양성균을 포함한 일부의 세균에 있어서는 세포벽의 낮은 투과성 때문에 사용에 제한을 받기도 한다⁶⁻⁷. 특히 결핵균의 세포벽은 30 내지 90개의 탄소 원자를 갖는 고분자량의 미콜산(mycolic acid, 3-hydroxy 2-alkyl branch-chain fatty acid)을 다량 포함하고 있다⁸. 세포벽에 많은 양의 미콜산을 포함하고 있는 미생물은 그렇지 않은 것에 비해서 소수성이 훨씬 크다고 알려지고 있어⁹, 친수성을 갖는 탐식자가 세포벽을 투과하는 데 어려움이 있다. 그러나 미콜산이 강산에 약하다는 점을 이용하여, 염산 등을 이용한 전처리(acid hydrolysis) 과정을 거치는 경우 세포벽의 투과성을 향상시킬 수 있다고 보고되고 있다¹⁰. 따라서 본 연구에서는 탐식자의 침투력을 높일 수 있는 적합한 전처리 조건을 찾아봄으로써 올리고뉴클레오타이드 탐식자를 이용한 조직내교잡법이 결핵균을 검출하기 위한 조직학적 진단법으로 이용될 수 있을 지에 대한 가능성을 확인해 보고자 하였다.

대상 및 방법

조직절편 제작 :

생검과 세균배양검사를 통하여 결핵으로 진단된 환자 20례의 인체조직 표본과 적출된 흰쥐의 간 조직 내에 배양된 결핵균을 인위적으로 주입하여 제작한 11례의 실험조직 표본의 파라핀 포매괴를 이용하였다.

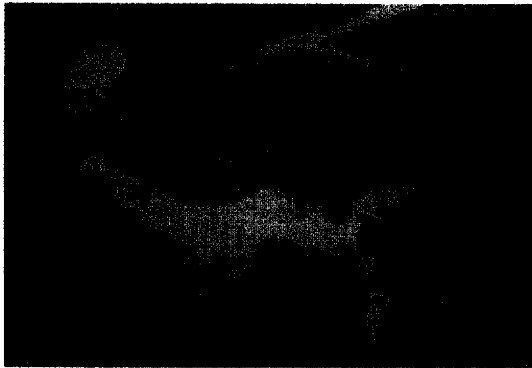


Fig. 1. The injected substance containing culture media for *M. tuberculosis* is located at right edge of the lacerated lesion (arrow), caused by needle invasion into rat liver tissue. (Hematoxylin-eosin stain, $\times 40$).

인체조직절편은 1996년부터 1998년 사이에 전남 대학교병원과 서남대학교병원에 내원한 환자로부터 얻어진 것으로 생검부위는 폐 14례, 늑막 3례 및 림프절 3례로 구성되어 있다. 배양된 결핵균이 포함된 실험조직 절편을 제작할 때는 조직검사용 절편과 최대한 유사하게 만들기 위하여 다음과 같은 방법을 이용하였다. 먼저 250 g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 희생시킨 후 간을 조심스럽게 적출하여 약 $10 \times 10 \times 5$ mm 크기의 여러 조각으로 절단하였다. 환자의 객담에서 얻은 10례와 구입한 *M. tuberculosis* 균주(ATCC27294) 1례를 BACTEC 460 배지에 충분히 배양한 후 얻어진 배양액을 무균 주사기에 취하였다. 이 배양액을 적출한 간 조직 내에 약 0.2 cc 씩 주입한 후 신속히 고정하였고, 이후에는 통상적인 과정을 거쳐 파라핀 포매괴를 제작하였다.

인체조직 혹은 실험조직의 파라핀 포매괴로부터 5 μ m 두께의 조직절편을 만들어 Probe-on 슬라이드(Fisher Scientific, USA)에 부착시킨 후 충분히 건조하여 사용하였다. 제작된 조직절편에 대하여 헤마톡실린-에오신 염색(Fig. 1)을 수행하여 주입된 배양액의 위치를 알 수 있었고, 결핵균의 존재여부는 Ziehl-Neelsen 염색(Fig. 2)을 수행하여 확인하였다.

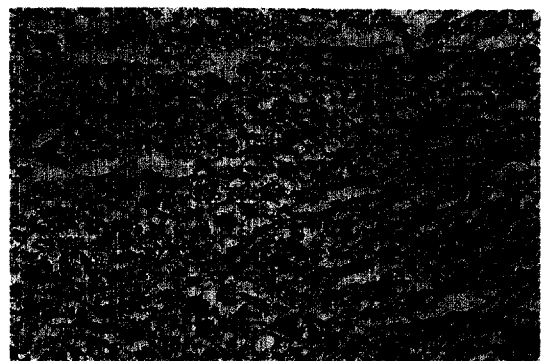


Fig. 2. Acid-fast staining reactions are observed in bacterial organisms suspected as *M. tuberculosis* (A : rat liver tissue injected with culture media, B : human lung tissue, Ziehl-Neelsen stain, $\times 200$).

Probe의 제작 :

결핵균복합체의 rRNA에 상보적인 염기서열을 갖는 일차탐식자(primary probe ; Bioneer, Korea)와 바이오틴(biotin)을 부착시킨 이차탐식자(universal secondary probe ; Research Genetics, USA)를 함께 부합시키는 sandwich *in situ* hybridization (SISH) 방법을 이용하였다. 일차 탐식자로는 결핵균 복합체의 16S rRNA의 일부에 상보적인 배열을 갖는 2개의 탐식자(MT16-1, MT16-2)와 5S rRNA에 일부에 상보적인 1개의 탐식자(MT5S-1)를 제작하였으며, 이들 탐식자들의 염기서열은 BLAST¹¹ 검색에서 결핵균복합체에 100%의 상보성을 갖는 것으로 확인되었다. 음성대조군용으로 나균(*Mycobac-*

Table 1. Sequences of primary and biotin-labeled secondary oligonucleotide probes

| Probe | Nucleotide sequence | Position | Length |
|-----------|--|----------|--------|
| MT5S-1 | 5' >CCCGGAGGGGCAGTATCATCGGC(TAG) ₅ <3' | 5S | 38-mer |
| MT16-1 | 5' >CTCATCCCACACCGCTAAAGCGCTTT(TAG) ₅ <3' | 16S | 41-mer |
| MT16-2 | 5' >CCGGCTTTTAAGGATTCGCTTAACC(TAG) ₅ <3' | 16S | 40-mer |
| ML16-1 | 5' >CATCCTGCACCGCAAAAAGATT(TAG) ₅ <3' | 16S | 37-mer |
| Secondary | 5' >(CTACTACTACTACTA) ₂ CTACTA(Biotin) ₃ <3' | | 39-mer |

Table 2. Procedure of *in situ* hybridization for detecting *M. tuberculosis*

| Reagents | Time (minute) | Temperature (°C) |
|--|---------------|------------------|
| AutoDewaxer | 1 (2 times) | 110 |
| AutoDewaxer | 1 (2 times) | RT ^{a)} |
| Absolute alcohol | 0.1 (6 times) | RT |
| Pepsin-HCl | 5 | 110 |
| Probe | | |
| heating | 1 | 110 |
| cooling | 0.5 | RT |
| heating | 2 | 105 |
| cooling | 1 | RT |
| heating | 0.5 | 105 |
| cooling | 1 | RT |
| heating | 0.5 | 95 |
| cooling | 2 | RT |
| heating | 0.5 | 85 |
| cooling | 3 | RT |
| heating | 0.5 | 85 |
| cooling | 10 | RT |
| 2X SSC | 0.1 (3 times) | RT |
| Streptavidine-alkaline phosphatase | 10 | 45 |
| Enhancer | 0.1 | RT |
| Fast Red TR and Naphthol AS-MX phosphate | 10 (2 times) | 45 |
| Distilled Water | 0.1 | RT |
| Hematoxylin | 5 | RT |
| Distilled Water | 0.1 (2 times) | RT |

^{a)} RT : Room temperature

terium leprae)의 16S rRNA에만 특이적으로 결합한다고 보고된 염기서열¹² 이용한 탐식자(ML16-1)를 주문 제작하였다. 일차탐식자의 5' 말단은 검출하고자 하는 rRNA에 상보적인 염기서열을 갖도록

하였으며, 3' 말단에는 반복시킨 T-A-G 꼬리로 갖도록 제작하였다¹³. 이차탐식자의 5' 말단은 일차탐식자의 3' 말단에 상보적인 C-T-A 염기서열이 수회 반복되도록 하였으며, 3' 말단에는 3개의 바이오틴을

부착시킨 올리고뉴클레오타이드가 되도록 하였다 (Table 1).

냉동동결 건조된 상태로 구입된 탐식자는 Tris-EDTA buffer에 1 ug/ul 농도로 녹인 후 10 ul 씩 분주하여 사용할 때까지 -70℃에 보관하였다. 조직내 교잡법을 시행할 때 탐식자는 그 농도가 1-10 ng/ul 범위가 되도록 비 formamide 계열의 Brigati Probe diluent (Research Genetics)에 희석하여 사용하였으며 일차 및 이차탐식자는 같은 농도로 사용하였다. 조직내교잡법의 수행과정: 조직내교잡법의 전과정은 Probe-on slide를 맞대어 생기는 모세관현상(capillary action gap)의 원리를 이용한 Microprobe immuno/DNA 염색기(Fisher Scientific)를 사용하였다. 제작된 조직절편은 Auto Dewaxer(Research Genetics)를 이용하여 파라핀을 제거한 후, 결핵균의 rRNA가 잘 노출될 수 있도록 하기 위한 전처리 과정으로 0.1M, 0.5M 및 1M 염산 용액에 2 mg/ml 농도가 되도록 펩신을 가한 펩신-염산 혼합액에 4 내지 10 분간 처리하였다. 조직내교잡법의 수행과정에서 염색기의 온도 설정과 부치시간(incubation time)은 Table 2에 나타난 바와 같다. 부합 후 비특이적인 결합을 한 탐식자를 제거하기 위하여 2X SSC에 세척하였으며, 검출제인 avidin-alkaline phosphatase (DAKO, USA)에 10분간 작용시켰다. 발색은 Fast Red TR salt와 naphthol AS-MX phosphate (Research Genetics)를 이용하여 적색으로 나타나도록 하였으며 hematoxylin으로 대조 염색한 후 Universal mount(Research Genetics)로 봉입하였다. 음성 대조군으로는 ML16-1 탐식자 또는 이차탐식자만을 사용하여 조직내교잡법을 수행하였다.

결 과

1. 조직절편 내 결핵균의 확인

결핵환자의 조직절편과 인위적으로 배양된 결핵균을 주입한 흰쥐의 간 조직절편에서 결핵균을 확인하기 위

하여 Ziehl-Neelsen 염색을 시행한 결과 실험에 사용한 20례의 인체조직과 11례의 흰쥐조직 모두에서 항산성을 나타내는 세균을 확인하였다(Fig. 2). 배양액이 인위적으로 주입된 흰쥐의 간 조직절편 내에서는 많은 수의 결핵균이 함께 모여 있는 모습으로 관찰되었다.

2. 전처리 과정의 최적 조건

조직내교잡법을 수행할 때 탐식자의 효과적인 침투를 돕고, 결핵균에 있는 rRNA가 탐식자에 잘 노출될 수 있도록 하기 위해서는 적합한 전처리과정이 필요하다. 따라서 전처리 방법 중 가장 적합한 조건을 알아보기 위하여, 본 실험에서는 결핵균을 주입하여 만든 11례의 실험조직을 대상으로 전처리용액의 염산 농도 및 처리 시간을 달리 한 후 조직내교잡법을 시행하여 염색결과를 비교하였다. 먼저 염산의 농도를 0.1M로 하여 전처리를 시행한 경우에 실험조직의 절편 내에서 결핵균을 성공적으로 검출할 수 있었으나, 염산의 농도를 0.5M이나 1M로 증가시킨 경우에는 주변조직의 심한 손상과 결핵균이 탈락되는 현상이 자주 발생하여 조직내교잡법을 수행하기가 어려웠다. 따라서 0.1M 염산용액에 2 mg/ml의 농도가 되도록 펩신을 가한 펩신-염산 혼합액을 전처리 용액으로 선택한 후 실험 조직에 4분에서 10분간 처리한 결과, 5분 이상 전처리를 한 경우에 결핵균에서 양성반응을 얻을 수 있었다. 그러나 전처리 시간이 7분 이상이 되면 역시 조직에 손상이 심해지면서 위음성이 나타나는 경우가 많았다. 따라서 조직 내 결핵균에 대한 효과적인 전처리 과정은 펩신-염산(2 mg/ml, 0.1M)용액을 사용하여 5 내지 6분간 수행하는 것이 가장 적합한 조건임을 알 수 있었다.

3. 조직내교잡법의 수행결과

펩신-염산 전처리와 함께 일차탐식자의 농도 변화도 염색 결과에 영향을 주었다. 탐식자 농도 1 ng/ul에

Table 3. Reactivity of four different oligonucleotide probes to ribosomal RNA of *M. tuberculosis* injected artificially into rat liver tissue.

| Probe | Positive(%) | Negative(%) |
|--------|-------------|-------------|
| MT5S-1 | 0(0) | 11(100) |
| MT16-1 | 10(91) | 1(1) |
| MT16-2 | 9(82) | 2(18) |
| ML16-1 | 0(0) | 11(100) |

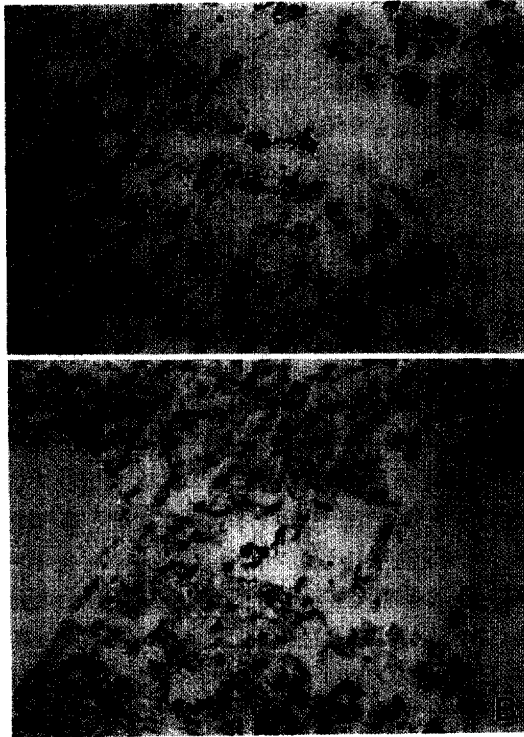


Fig. 3. Some positive signals are observed as red-stained dots and rods aggregated irregularly in the lacerated legion of rat liver sections containing cultured *M. tuberculosis*. (A : *In situ* hybridization with MT16-1 probe, B : *In situ* hybridization with MT16-2 probe. $\times 150$).

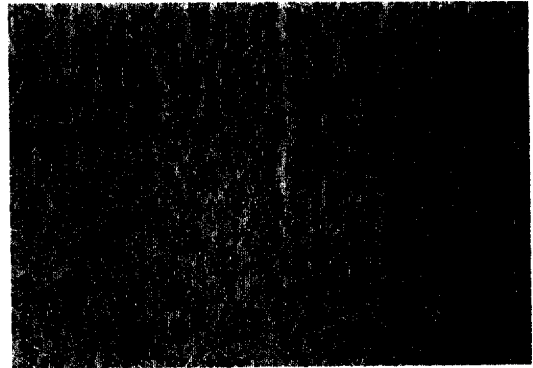


Fig. 4. No positive signal is observed in human tissue of pulmonary tuberculosis patient (*In situ* hybridization. $\times 150$).

서부터 미약한 양성반응을 관찰할 수 있었으나, 확실한 양성반응이 관찰되는 농도는 약 5 ng/ul 이상이었으며, 농도가 증가됨에 따라 간 조직에서도 비특이적인 양성반응이 관찰되었다. 따라서 가장 적합하다고 생각되는 일차탐식자의 농도 5 ng/ul에서 조직내교잡법을 시행한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. MT5S-1을 일차탐식자로 사용하여 조직내교잡법을 시행한 결과 11례의 실험조직 모두에서 전혀 양성 반응을 관찰할 수 없었다. 결핵균의 16S rRNA에 상보적인 염기서열을 갖는 MT16-1 탐식자는 10례에서 결핵균을 검출하여 91%의 민감도를 나타내었고, MT16-2 탐식자는 9례를 검출하여 82%의 민감도를 보였다. 양성반응은 간 조직이 주사바늘에 의해 기계적으로 손상된 부위를 따라 군데 군데 위치하고 있는 배양액 내에서 적색으로 염색된 점상 혹은 간상의 형태가 불규칙하게 모여 있는 모습으로 관찰되었다(Fig. 3). 한편 나균에 특이성을 갖는 ML16-1 탐식자를 사용하거나 혹은 일차탐식자 없이 이차탐식자만을 사용하여 시행한 음성대조군 염색에서는 모든 예에서 양성반응을 관찰할 수 없었다. 인체 조직절편 20례에 대하여 수행한 조직내교잡법에서는 간혹 미약한 양성반응으로 추정되는

경우도 관찰할 수 있었으나, 이는 탐식자의 농도를 10 ng/ul 이상으로 하여 12시간 이상 탐식자를 부치(overnight incubation)한 경우이다. 그러나 주변 조직에서도 양성반응이 관찰되었기 때문에 비특이적인 반응으로 간주하였다. 따라서 바이오틴이 부착된 올리고뉴클레오타이드 탐식자를 이용한 조직내교잡법으로는 인체 조직절편에서 결핵균을 검출하기 어려웠다(Fig. 4).

고 찰

조직내교잡법은 생검이나 수술 후 통상적으로 제작된 조직절편에서 감염성 병원체를 효과적으로 검출할 수 있는 방법이다²⁻⁵. 조직내교잡법을 제외한 일반적인 핵산부착법은 검체의 DNA나 RNA를 추출한 후 부합(hybridization)을 수행하기 때문에 세포의 형태를 유지시킬 수 없는 반면 조직내교잡법은 세포나 조직의 형태가 유지된 상태에서 양성반응을 확인할 수 있기 때문에 특이성이 높다. 또한 조직내교잡법은 면역학적 염색법과 비교하여 다양한 장점을 가지고 있다. 즉 면역조직화학적 염색법(immunohistochemistry)을 수행할 때 검출하려고 하는 항원은 단백질로 구성되어 있으므로 조직의 고정, 단백분해효소의 처리 등에 의하여 변성이 되기 쉽고 항원간의 교차반응, 비특이적인 염색상 등이 문제가 될 수 있으나, DNA는 여러 가지 조건에 노출되어도 상당한 안정성을 갖으며 탐식자와 DNA 혹은 탐식자와 RNA와의 결합은 항원항체 결합에 비하여 선택적이고 강한 결합을 이루기 때문이다.

조직내교잡법의 유용성에 제한을 주고 있는 요소도 있다. 이는 사용되는 탐식자가 세균의 세포벽을 통과하는 데 있어, 특히 그람양성 세균에서는 상당한 장애를 받는다는 점이다⁶⁻⁷. 이를 보완하기 위해서는 검출 대상이 되는 세균의 DNA나 RNA가 탐식자에 잘 노출될 수 있도록 하는 적합한 전처리 과정이 필요하며, 이러한 조건을 찾는 연구가 계속되고 있다^{12,14-15}. 결핵균은 특히 지방성분이 많은 세포벽 때문에 탐식자가 침투하는 과정에서 더욱 제한을 받게 된다. 즉 세균의 세포벽에 함유되어 있는 단백질, lipooligosacchar-

ides 및 peptidolipid 등의 양에 따라 다소의 차이는 있지만, 세포벽에 존재하는 미콜산이 증가함에 따라 소수성이 증가되는 경향을 보인다고 알려져 있기 때문에⁹ 결핵균도 다른 세균에 비해 비교적 소수성이 크다고 할 수 있다. 따라서 이런 지방성분을 제거함으로써 탐식자의 침투력을 향상시키기 위한 다양한 시도가 있었다. 먼저 세포벽의 지방성분을 제거하거나 감소시키는 방법을 이용한 경우로는, 조직내교잡법으로 나균을 검출하는 과정에서 세포벽의 지질층을 제거하기 위해 유기용매인 자일렌(xylene)을 사용하여 성공한 예가 있다¹². 또한 미콜산이 강산에 약하다는 점을 이용하여¹⁰ 조직절편에 염산을 가함으로써 세포벽의 미콜산을 가수분해시키는 전처리과정을 통해 탐식자의 침투력을 증가시킨 경우도 있다. 즉, 세포벽에 미콜산을 함유하는 여러 가지 세균의 도말표본에 대하여 염산으로 처리한 후 EUB338 탐식자를 이용하여 성공적으로 검출하였다고 보고하였다¹⁴. 또 다른 방법으로는 결핵균의 세포벽이 비교적 큰 소수성을 갖는 점을 고려하여 탐식자 자체의 친수성을 감소시키는 방법을 선택하기도 한다¹⁵. Peptide nucleic acid(PNA)는 상보적인 염기서열을 갖는 DNA와 결합할 수 있는 pseudopeptides이다. DNA나 RNA의 당과 인산을 아미노산으로 대체한 PNA는 상대적으로 소수성이 증가되었고¹⁶⁻¹⁷, 이러한 형태로 제작된 PNA 탐식자가 결핵균의 세포벽을 잘 통과할 수 있도록 한 것이다.

검출의 민감도를 높이는 또 다른 전처리 과정으로 결핵균의 rRNA가 탐식자에 잘 노출될 수 있도록 조직절편에는 흔히 단백질을 분해할 수 있는 효소를 작용시킨다. 자주 이용되는 효소로는 트립신과 펩신 그리고 단백분해효소(protease)인 proteinase-K 혹은 pronase 등이 사용되고 있다¹⁸. 이들 효소의 농도와 처리 시간은 조직의 종류나 두께에 따라 다양하게 변화시킬 수 있으며, 실험실마다 적절한 조건을 결정해야 한다. 효소에 의한 전처리가 탐식자의 침투력을 향상시키는 점은 바람직하나 너무 과다하게 되면 조직의 형태가 잘 유지되지 않는 단점이 있다. 본 연구에서는 이러한 전처리 과정을 수행하는 데 있어서, 핵산의 노출을 위해서는 펩신을 선택하였고, 세포벽의 침투력을

높이는 과정에는 염산을 이용하였다. 다른 효소에 비해 펩신은 통상적으로 염산과 함께 사용할 수 있다는 장점이 있다. 즉 전처리과정을 동시에 수행함으로써 효소와 강산에 의한 조직의 손상 및 결핵균의 탈락을 최소화시킬 수 있기 때문이다. 본 실험에서도 이러한 전처리 과정을 생략하거나, 혹은 펩신이나 염산만을 단독으로 사용한 경우에는 결핵균을 검출하는 데 성공하지 못하였으나, 펩신과 염산 혼합액으로 전처리를 수행한 후에는 비교적 높은 검출율을 보여 주었다.

대부분의 원핵 혹은 진핵생물은 필수적으로 다량의 rRNA를 가지고 있다. 따라서 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR) 등의 방법을 이용하여 rRNA 양을 증폭하지 않아도 충분히 조직 내교잡법을 수행할 수가 있기 때문에 탐식자의 제작 부위로 매우 유용하게 이용되고 있다. 예를 들어 결핵균과 함께 *Mycobacterium* 속에 포함되는 세균의 하나인 나균에도 마리 당 수천 개의 rRNA가 있다고 알려졌다¹⁹. 또한 rRNA는 염기서열에 변화가 많은 가변부위(variable portion)와 변화가 거의 없는 보존부위(conserved portion)가 모자이크 형태로 배열되어 있어, 결핵균에만 특이적으로 나타나는 분절을 선택하기에 적합한 조건을 갖추고 있다. 따라서 본 연구에서도 탐식자를 제작할 때 rRNA의 염기서열에 상보성을 갖는 올리고뉴클레오타이드 탐식자를 제작하였다. 결핵균의 rRNA 중 5S 부위 혹은 16S 부위에 상보성을 갖도록 제작된 탐식자들은 결핵균을 검출하는 데 있어 각각 다른 정도의 민감도를 나타내었는데, 이들 중 MT16-1가 가장 높은 검출율을 보여 주었다. 따라서 결핵균에서도 16S rRNA 부위가 탐식자의 제작을 위한 가장 적합한 부위임을 알 수 있었다.

배양된 결핵균을 이용한 환자의 실험조직과는 달리 인체생검 조직표본에서는 동일한 방법으로 조직내교잡법을 수행했음에도 불구하고 결핵균을 검출하는데 성공하지 못 하였다. 이처럼 위음성이 나타날 수 있는 이유로는, 먼저 사용한 올리고뉴클레오타이드 탐식자가 포르말린에 고정된 결핵균의 세포벽을 침투하지 못하

는 경우이거나, 혹은 탐식자가 결합할 수 있는 rRNA의 절대량이 너무 적어서 조직내교잡법의 민감도를 벗어난 경우로 생각할 수 있다. 본 실험에서는 결핵환자의 인체 조직절편과 환자의 실험조직에 대해 동일한 전처리과정을 수행하였으므로 전자의 경우는 어느 정도 배제될 수 있다. 그러나 배양된 결핵균과 인체 내에 감염된 결핵균 내에 존재하는 rRNA의 양에는 차이가 있을 것으로 생각되며, 특히 느리게 증식하는 세균들에서 이는 매우 중요한 요소가 되고 있다. 즉, 세균 내에 존재하는 rRNA의 양은 개체의 성장속도에 비례하여 상당한 차이를 보인다고 알려져 있다²⁰⁻²¹. 일반적으로는 세포 내에는 10^3 내지 10^4 개의 rRNA가 존재한다고 알려져 있고²², 신속하게 증식하는 세균의 경우에는 이보다 더 많은 양의 rRNA를 갖는다고 한다. 그러나 느리게 분열하는 결핵균은 그 성장속도에 따라 차이는 있으나 10^2 내지 10^3 개 정도의 rRNA가 존재한다고 알려져 있다²³. 이는 바이오틴이 부착된 올리고뉴클레오타이드 탐식자의 일반적인 민감도가 10^2 내지 8×10^2 개의 반복서열 이상인 점을 고려할 때 빠르게 증식하는 배양액 내의 결핵균은 검출 가능한 범위에 들어갈 정도의 rRNA 양을 가지고 있다고 볼 수 있다. 그러나 적출된 환자의 간조직에 주입된 결핵균이 왕성하게 분열 증식하는 중인 반면, 환자의 생검 조직 내의 결핵균은 인체의 면역기능 혹은 항결핵 약제의 사용 등으로 인해 잠복상태 혹은 느린 증식상태에 있었을 것으로 추정된다. 따라서 인체의 조직 내에서 느리게 증식하던 결핵균에 존재하는 rRNA의 양은 배양액 내의 결핵균에 비해 현저히 감소할 것으로 생각된다. 고로 생검이나 수술에 의한 적출과정을 통하여 얻어진 조직절편 내에서 바이오틴이 부착된 탐식자를 이용한 조직내교잡법으로 결핵균을 검출하기 어려웠던 이유 중의 하나로 생각된다.

따라서 향후 인체 조직절편에서 조직내교잡법으로 결핵균을 진단하기 위해서는 결핵균 내의 rRNA의 양을 일차 증폭시킨 후 조직내교잡법을 수행하는 제자리 중합효소연쇄반응(*in situ* polymerase chain reaction; *in situ* PCR)법을 도입하거나, 혹은 바이오

틴에 비해 더 높은 민감도를 갖는 검출제인 동위원소를 부착시킨 탐식자의 사용이 필요하다고 생각되는 바이다.

요 약

배 경 :

올리고뉴클레오타이드 탐식자를 이용한 조직내교잡법은 감염성 질환의 진단에 이용되고 있는 분자병리학적 검사방법이다. 그러나 결핵균의 세포벽에는 다량의 지방 성분이 포함되어 있어 탐식자의 침투에 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 탐식자의 침투력을 높일 수 있는 조건을 알아보고, 결핵의 조직학적 진단법으로써 조직내교잡법의 이용 가능성을 확인해 보고자 한다.

방 법 :

결핵으로 진단된 환자의 인체조직 절편과 배양된 결핵균을 현취의 간 조직 내에 인위적으로 주입하여 제작한 실험조직 절편을 실험대상으로 하고, 바이오틴을 부착시킨 올리고뉴클레오타이드 탐식자를 이용하여 조직내교잡법을 시행하였으며, 탐식자의 효과적인 침투를 위해 전처리를 시도하였다.

결 과 :

웹신-염산(2 mg/ml, 0.1M) 혼합액을 이용한 전처리 과정(5-6분) 후 조직내교잡법을 수행한 결과 배양된 결핵균을 주입한 실험조직에서 결핵균의 검출에 성공할 수 있었다. 간 조직이 주사바늘에 의해 기계적으로 손상된 자리를 따라 군데군데 위치하고 있는 배양액 내에서 불규칙하게 모여있는 점상 혹은 간상의 양성반응을 관찰할 수 있었으며, 민감도는 80-90% 수준이었다. 그러나 결핵환자의 조직절편에서는 조직내교잡법을 이용하여 결핵균을 검출할 수 없었다.

결 론 :

이는 배양액 내에서 빠르게 증식하는 결핵균과는 달리 인체에 감염된 결핵균에서는 rRNA의 양이 적어, 바이오틴이 부착된 탐식자를 이용한 조직내교잡법의 민감도를 벗어났을 것으로 추정된다. 따라서 향후 조직내교잡법으로 인체조직 내의 결핵균을 진단하기 위해서는 제자리 중합효소연쇄반응(*in situ* PCR) 법의

도입이나, 보다 높은 민감도를 갖는 동위원소를 부착시킨 탐식자의 사용이 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. *Mycobacterium*. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of clinical microbiology, Vol 1. 7th ed. Washington, DC : American Society for Microbiology;1999. p. 399-437.
2. Montone KT. *In situ* hybridization for ribosomal RNA sequences : A rapid sensitive method for diagnosis of infectious pathogens in anatomic pathology substrates. Acta Histochem Cytochem 1994;27:601-6.
3. Park CS, Kim J. Rapid and easy detection of *Helicobacter pylori* by *in situ* hybridization. J Kor Med Sci 1999;14:15-20.
4. Park CS, Kim J, Montone KT. Detection of *Aspergillus* ribosomal RNA using biotinylated oligonucleotide probes. Diagn Mol Pathol 1997;6: 255-60.
5. Kim J, Yu JR, Hong ST, Park CS. Detection of *Pneumocystis carinii* by *in situ* hybridization in the lungs of immunosuppressed rats. Korean J Parasitol 1996;34:177-84.
6. Braun-Howland EB, Danielson SA, Nierzwicki-Bauer SA. Development of a rapid method for detecting bacterial cells *in situ* using 16S rRNA targeted probes. Biotechniques 1993;13:928-33.
7. Zarda B, Amann R, Wallner G, Schleifer KH. Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides. J Gen Microbiol 1991;137:2823-30.
8. Minnikin DE, Minnikin SM, Hutchinson IG, Goodfellow M, Grange JM. Mycolic acid patterns of representative strains of *Mycobacterium*

- fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*' and *Mycobacterium smegmatis*. J Gen Microbiol 1984;130:363-7.
9. Bendinger B, Rijnaarts HHM, Altendorf K, Zehnder AJB. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. Appl Environ Microbiol 1993;59:3973-88.
10. Minnikin DE, Hutchinson IG, Caldicott AB. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria J Chromatogr 1980;188:221-33.
11. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215:403-10.
12. Arnoldi J, Schluter C, Duchrow M, Hubner L, Ernst M, Teske A, et al. Species-specific assessment of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies by *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. Lab Invest 1992;66:618-23.
13. Montone KT, Friedman H, Hodinka RL, Hicks DG, Kant JA, Tomaszewski JE. *In situ* hybridization for Epstein-Barr virus *Not I* repeats in posttransplant lymphoproliferative disorder. Mod Pathol 1992;5:292-302.
14. Macnaughton SJ, O'Donnell AG, Embley TM. Permeabilization of mycolic-acid-containing actinomycetes for *in situ* hybridization with fluorescently labelled oligonucleotide probes. Microbiology 1994; 140:2859-65.
15. Stender H, Lund K, Petersen KH, Rasmussen OF, Hongmanee P, Miorner H, et al. Fluorescence *in situ* hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species in smears of *Mycobacterium* cultures. J Clin Microbiol 1999;37:2760-5.
16. Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. Nature 1993;365:566-8.
17. Nielson PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. Science 1991;254:1497-500.
18. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In : Wilkinson DG, editors. *In situ* hybridization, a practical approach. 1st ed. Oxford : Oxford University Press;1992. p. 1-13.
19. Estrada IC, Lamb FI, Colston MJ, Cox RA. Partial nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA isolated from Armadillo-grown *Mycobacterium leprae*. J Gen Microbiol 1988;134:1449-53.
20. Bremer H, Dennis PP. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In : Neidhardt FC, editors. Cellular and molecular biology. Washington, DC : American Society for Microbiology;1987. p. 1527-42.
21. Delong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains : Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science 1989;243: 1360-3.
22. Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts GD. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1988;26:2120-3.
23. Winder FG. Mode of action of the anti-mycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of mycobacteria. In : Ratledge C, Stanford J, editors. The biology of the mycobacteria, vol. 1. New York : Academic Press, Inc.;1982. p.353-438.