고신대학교 의과대학 학술지 제21권 제2호
Kosin Medical Journal
Vol. 21. No. 2, pp. 15~19, 2006

염증성 장질환 환자에서 결핵균의 검출

한서룡[1],. 정민정[2] 장희경[2]

고신대학교 의과대학 내과학교실[1] , 병리학교실[2]

Detection of Mycobacterium in the Patients with Inflammatory Bowel Disease

SeoRyong Han M.D[1], MinJung Jung M.D[2], HeeKyung Chang M.D, Ph.D.[2],

Department of internal Medicine1 and Pathology2 , Kosin University Medical College

Abstract

Background and Purpose: It is difficult to make a precise diagnosis of idiopathic inflammatory bowel disease (IBD) and to differentiate it from intestinal tuberculosis(TB). However, early diagnosis of TB is important for correct medical intervention and prevention of spread of the bacteria. The author explored the feasibility of PCR for detection of atypical and typical mycobacterium in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues where a definite differentiatial diagnosis ofIBD from TB cannot be made.

Material and Methods: DNA was extracted from the paraffin sections of 27 cases of ulcerative colitis, 4 of crohns disease, and 20 of non-specific granulomatous inflammatory lesion(NSGIL) .

Samples were amplified by duplex PCR with Panmycobacterial primers,ITS-F (5-TGGATCCGACGAAGTCGTAACAAGG-3) and Mycom-2(5-ATGCTCHCAACCACTATCCA-3) andMycobacterium tuberculosis (M.tb)-specific primers, TBF(5-TGGTGGGGCGTAGGCCGTGA-3) and mycom- 2(5-TGGATAGTGGTTGCGAGCAT-3).

Results: Mycobacterium tuberculosis were detected in 18 of 27(66.6%) ulcerative colitis, 2 of 4 (50.0%) crohns disease, and 13 of 20 (65.0%) NSGIL. Atypical mycobacterium was not detected in all cases.

Conclusion: These data indicate that PCR is reliable for differential diagnosis of IBD from intestinal TB and can be used to increase diagnostic accuracy in patients who had perplexing diagnostic problems associated with IBD.

Key words : Inflammatory Bowel Disease, Mycobacterium, PCR, Paraffin-Embedded Tissue

서 론

특발성 염증성 장 질환(idiopathic inflammatory bowel disease:IBD)이란 결핵 등의 원인이 분명한 장 질환을 제외한, 원인이 분명치 않고 조직학적 변화가 비특이적인 만성 염증성 질환군을 말하며, 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 크론 병(crohn' s disease)이 포함된다. 이 질환들은 미국과 영국 등에서 빈도가 높고 일본과 우리나라에서는 빈도가 낮았으나, 최근 들어 우리나라에서도 증가하는 추세에 있다.[1] 궤양성 대장염은 대개 첫 병발은 심한 정신적 또는 신체적 스트레스 후에 전격적으로 나타난다. 임상적으로 혈액이 섞인 점액성 설사와 하복부 통증및 경련이 수일에서 수개월 동안 지속되다 완화되기를 반복적으로 거듭한다. 크론병은 간헐적인 경한 설사와 발열및 우하복부 동통이 계속되다 경과에 따라 장 폐색과 주위 장기와의 누공 형성 등을 유발한다.

현재까지 주로 이용되는 확진 방법은 장 내시경을 통한 조직 검사이다.[2] 그러나, 궤양성 대장염은 병리조직

교신저자 : 장 희 경
주소: 602-702, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 내과학교실
TEL. 051-240-6323 FAX. 051-241-7420
E-mail: changhkg@ns.kosinmed.or.kr

· 본 연구는 고신대학교 의과대학 연구비 일부 지원에 의해 이루어짐

학적으로는 장샘와 농양 형성 등이 진단적 의미가 있으나 비특이적인 경우가 많아서 여러 번 생검을 실시해야 하는 경우가 많다.[2] 크론병 역시 병리조직학적으로 비괴사성 육아종 형성이 특징이나 진균증 등의 다른 육아종성 염증질환을 비롯하여 감별해야할 질환이 많을 뿐 아니라, 생검에서 비특이성 염증 소견만이 관찰되는 경우는 확진이 곤란하다.[2]

특히 우리나라에서는 이 질환들을 진단할 때 반드시 감별해야 하는 질환으로는 임상및 병리학적으로 매우 유사한 형태를 보이나 치료방법이 다른 장결핵이 있다.[2] 결핵은 임상적으로 매우 다양한 증상을 보여 IBD와는 감별이 불가능한 경우가 많을 뿐 아니라, 감염초기에는 건락성 괴사가 생검에서 관찰되지 않는 경우도 많고, 진행된 경우라도 조직검사 위치에 따라 비건락성 육아종이나 궤양, 또는 비특이성 만성 염증만이 생검되는 경우가 많고, 이때는 IBD와의 감별이 극히 어렵게 된다.[3-5]

본 연구는 임상적으로 IBD로 의심되어 치료를 받았으나, 병리조직학적으로는 IBD의 확진이 곤란하다는 판정을 받았던 IBD환자의 파라핀 포매조직을 대상으로 분자생물학적인 방법으로 결핵균 검사를 시행하여 결핵균을 검출해낼 수 있는지를 조사하여 추후 염증성 장 질환 환자의 감별 진단시 결핵균에 대한 PCR 검사의 필요성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 : 임상적으로 궤양성 대장염이 의심되고, 병리학적으로 궤양성 염증 소견이 관찰된 27례와 임상적으로 크론병이 의심되고, 병리 조직검사에서 비특이성 육아종성 병변이 관찰되었던 24예의 내시경 검사 조직의 파라핀 포매 조직을 이용하였다. 파라핀 포매 조직은 1990년부터 2000년까지 만들어진 것으로 현미경 소견을 재검사하여 가장 특징적인 소견을 보인다고 판단된 박절편을 취하였다. 증례들은 모두 AFB염색에서 음성 반응을 보였으며 환자는 결핵 치료는 받지 않았다. 양성 대조로는 결핵균주를 이용하였다.

방법:

1. DNA 추출: 표본의 크기에 따라서 8m 두께의 1-6절편의 파라핀 포매 조직을 eppendorf tube에 넣고 절편당 100mM Tris-HCL(pH8.0)에 0.1% Tween 20와 2mg/ml proteinase K 가 함유된DNA extraction buffer 200 l (50 cells/ l)을 가한 후 52°C에서 1-2일간 방치하였다. proteinase K를 불활성화 시키기 위해서 10분간 가열하고 1 l를 취하여 template로 사용하여 PCR을 진행하였다.

2. Duplex PCR: *Mycobacterium tuberculosis* 검출: 마이코박테리아 속과 종(Mycobacterium-genus and species)에 특이한 16S와 23S rRNA 유전자 사이의 internal transcribed spacer region(ITS)[7]를 표적으로 하는 probe(270-360bp)를 primer[7](Table.1; BioBasic Inc. Co., Canada 제작)로 하여 nested PCR을 시행하였다.

Table.1.: Primers for Mycobacterium

Primers	DNA sequences
Panmycobacterial	
ITS-F	5' -TGGATCCGACGAAGTCGTAACAAGG-3'
Mycom-2	5' -ATGCTCGCAACCACTATCCA-3'
Mycobacterium tuberculosis-specific primers	
TBF	5' -TGGTGGGGCGTAGGCCGTGA-3'
Mycom- 2	5' -TGGATAGTGGTTGCGAGCAT-3'

1. PCR 조건: 500 mM KCl 100mM Tris HCl (pH 9.0), 1% Triton X-100, 0.2mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 1.5mM MgCl2, 10M tetramethylammonium chloride (TMAC)로 구성된 반응 혼합액을 primer당 10pmol을 넣고 1U Taq DNA polymerase(Takara, Japan)를 가한 후, 94°C에서 5분, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분간 30cycles, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분의 조건으로 PCR을 하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였다.

3. 판정: 각각 274bp와 183bp크기의 두개의 amplicon이 나오는 경우는 결핵으로 판정하고, 270-400bp 크기의 하나의 amplicon이 나오면 비정형성 결핵(NTM: nontuberculous mycobacteria)으로 판정하였다. 또한, 183bp 크기의 amplicon이 1개만 증폭된 경우는 DNA 직접 염기 서열 결정법을 실시한 후의 염기서열 결과를 참조하여 결핵으로 판정하였다.

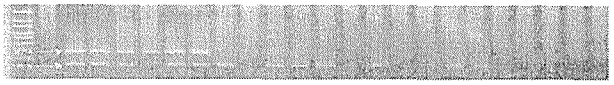
4. 염기서열 결정에 의한 PCR 산물의 확인

Duplex PCR에서 183bp 크기의 amplicon이 하나만 나왔을 경우는 증폭 산물을 직접 염기서열 결정법으로 결핵인지를 확인하였다. PCR 증폭 산물을 전기영동시켜 분리한 후 증폭 산물이 위치한 띠 부분을 잘라내어 PCR purification kit (QIAGEN, 미국)을 이용하여 정제하고 ABI prism 377 sequencer DNA 자동염기서열분석기 (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

관찰 결과

1. 궤양성 대장염 의진하에 실시된 내시경 생검 27례중 결핵균이 검출된 예는 18례(66.7%) 였다.
2. 크론병으로 의진하에 실시된 내시경 생검 24례중에서 결핵균이 검출된 예는 15예(62.5%)였다.
3. 상기의 결과 중 결핵으로 판정된 예는 모두 속특이적 증폭산물은 관찰되지 않았고, 183bp 크기의 *M. tuberculosis* 종 특이적 증폭 산물만 관찰되었다. 이 183bp의 증폭 산물이 결핵균 유래인지를 확인하기 위하여 임의로 선택된 5개의 검체의 증폭 산물의 염기 서열을 확인한 결과 발표된 염기 서열인 *M. tuberculosis* H37Rv와 동일하여 모두 결핵임을 확인할 수 있었다.

Fig. 1 Duplex PCR amplification of target DNAs of Panmycobacteria and Mycobacterium tuberculosis.



Left lanes 1st to 6th were positive Control standard bacteria. 183bp PCR products means Mycobacterium tuberculosis. 274bp PCR products means panmycobacteria

고 찰

장의 염증성 질환은 크게 감염 원인균이 증명되는 감염성 질환과 비특이성인 염증 질환으로 감염 원인균이 없거나 밝혀지지 않은 질환으로 나눌 수 있다.[1] 최근에는 비특이성 염증 질환으로 분류되었던 질환중 일부에서 원인 미생물이 밝혀짐에 따라 전자의 범주에 해당하는 질환이 늘고 있다.[1] 비특이성인 염증성 장질환중 대표적인 특발성 염증성 장질환(idiopathic inflammatory disease, IBD)은 만성 병변이 주병변이며 원인을 알 수 없는 질환들인데 궤양성 대장염과 크론병이 여기에 속한다.

크론병은 궤양, 불연속적인 분절성 병변, 누공 형성등을 특징으로하며, 병리조직학적으로 비건락성 유상피세포 육아종성 염증이 진단적으로 가장 의미있는 병리학적 소견이다.[2]

만성 궤양성 대장염은 다양한 수의 장샘농양이 점막하로 확산되면서 수많은 궤양을 형성하고, 위폴립(pseudopolyps) 형성을 특징으로하며, 병리 조직학적으로는 육아종 형성이 없으며, 장샘농양(crypt abscess)을 동반한 궤양이 다소 진단적 가치가 있다.[2] 이 두 질환을 감별하는 데 도움이 되는 여러가지 소견에 대한 많은 보고가 있으나 20% 정도는 현재의 감별 진단법으로도 구별할 수 없다고 한다.[2,3,8] 또한 병의 진행 초기에는 임상적으로 장결핵과의 감별이 용이치 않을 뿐 아니라, 조직검사에서조차 진단적으로 감별에 도움이 되는 현미경 소견이 관찰되는 경우는 드물다. 그러나 염증성 장질환과 장결핵의 치료 방법은 서로 다르고 적절한 치료 시기를 놓치는 경우는 심각한 합병증을 초래할 수 있으므로 이들을 확진하거나 감별에 도움이 되는 새로운 진단 방법이 요구되고 있다.

국내외에서 임상 및 병리학적으로 염증성 장질환으로 진단되어 치료를 받았으나, 재발하거나 오히려 악화되어, 결국은 장 결핵으로 판명된 경우가 간헐적으로 임상에서 보고 되고 있다.[1,3,5]

결핵균은 균배양에서 증명이 가능하지만 배양기간이 길고 장관 검체는 장내 상재균에 의해 오염이 많이 되어 있으므로 배양이 어렵다. 또한 Acid-fast-bacilli (AFB)염색은 다량의 결핵균이 존재할 때만 양성으로 나오므로 위음성이 많다.[9] 이에 저자는 민감도가 높은 PCR 을 이용하여 기존에 보관되어 있던 궤양성 대장염과 크론병 조직의 파라핀 포매괴에서 결핵균이 검출될 수 있는 지를 조사하여 임상적으로 염증성 장질환의 감별 진단에 도움을 얻고자 하였다. 최근에 Mycobacterial DNA를 파라핀 포매 조직에서 검출한 연구들[10-4] 은 긍정적인 보고들로써, 이 중에는 Duplex[11]또는 Multiplex[14] PCR을 이용한 보고가 검출율이 다소 높았다. 본 연구에 사용한 PCR은 Chang 등[7]이 고안한 primer를 이용한 duplex PCR 로써, 274와 183 bp의 두 amplicon이 나오면 결핵이고, 속

특이적인 amplicon이 하나가 나타나면 비정형성 결핵이라고 판독할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 대상 질환군에서 결핵균이 발견되는지 여부와 함께 비정형성 결핵이 발견되는지도 아울러 규명하고자 하였다. 본 연구에서 궤양성 대장염으로 의심된 27례중 결핵균이 검출된 예는 18례(66.7%)이였고, 크론병으로 진단된 24례중 15례(62.5%)에서 결핵균이 검출되었다. 외국에서는 결핵의 발생빈도가 희귀하여, 이에 대한 증례 수집을 통한 통계적인 보고는 없으나, 궤양성 대장염으로 진단하여 치료하는 중 결핵으로 진단된 예가 보고 되고 있다.[5] 또한 일본의 한 보고에서는 궤양성 대장염의 60%, 크론병의 100%, 정상대조군의 16%이상에서Mycobacteria가 검출되었다는 보고도 있다.[3] 이런 연구 결과의 차이는 사용한 primer, DNA 추출법, 파라핀의 보관 기간에 따라 가능하다고 추측할 수 있어 앞으로 이에 대한 객관적인 표준화가 필요하리라고 생각된다.

비건락괴사성 육아종을 특징으로 하는 크론병에서 결핵균이 62.5% 검출되었는 데, 이는 우리나라에서는 원인이 뚜렷하지 않은 육아종이 장의 생검에서 관찰되면 반드시 결핵을 감별 진단해야하고 방법면에서는 민감한 PCR 방법이 좋을 것이라는 것을 시사한다. 장 결핵은 크론병과 임상 및 병리학적으로 매우 유사하여 결핵의 빈도가 적은 유럽이나 미국에서는 크론병으로 치료하다가 나중에 장결핵으로 판명되었다는 보고가 종종 있다.[4,5] 크론병은 최근까지 NTM중에 하나인 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 가 PCR에서 검출된다는 보고[16,17]와 검출되지 않는다는 상반된 보고[18,19]가 있다. NTM 감염은 결핵균과 관계가 있으나 그 분포와 병원성에는 유의한 차이가 있다. NTM은 토양, 식물, 물 및 동물 배설물에 널리 퍼져있으나 매우 낮은 독성을 가지고 있어 일반적으로 면역능이 떨어진 사람에게 기회 감염으로서 주로 발생하며 결핵과는 달리 사람과 사람사이의 전파의 증거는 없다. 이들 중 어떤 종류는 인체에 기회감염을 일으켰을 때는 항 결핵제나 항생제에 미약하게 반응하거나 또는 전혀 반응하지 않는 수가 많아 정확한 치료를 위해서는 결핵과 감별이 필요하다.[20] 본 실험에서는 그러나duplex PCR을 실시한 결과에서 M. tuberculosis의 종특이적인 증폭 산물이 나옴에도 불구하고 속 특이적인 증폭 산물은 관찰되지 않아서, 본 연구에서는 NTM은 크론병에서 검출되지 않았다고 판정하였다.

이상의 결과는 본 연구의 primer가 파라핀 포매 조직에서의 PCR을 이용한 결핵균의 검출은 염증성 장잘환과 장결핵의 감별에 도움이 될 수 있음을 보여주며, 우리나라 염증성 장질환의 일부가 장결핵으로 재분류되어져야함을 보여준다고 할 수 있다. 이전에 primer자체의 신뢰성을 검증하기 위한 추후 연구와 본 연구 결과를 검증하기 위한 보다 많은 염증성 장질환를 포함한 큰 규모의 연구가 필요하다고 하겠으나, 임상적으로 염증성 장질환이 의심되어 실시되는 장내시경의 조직 검사시에는 PCR방법으로 결핵균의 검사를 병행하는 것이 반드시 필요하다고 하겠다.

국문 요약

배경: 특발성 염증성 장질환인 궤양성 대장염과 크론병은 임상및 병리 조직학적으로 장 결핵과 감별 진단이 매우 힘들다. 특히 장결핵은 치료를 조기에 시작하여야 박테리아의 확산을 막을 수 있기 때문에 임상적으로 유용한 감별 진단법이 필요하다. 목적: 특발성 염증성 장 질환으로 임상적으로 진단받고 장내시경을 실시한 환자의 파라핀 포매에서 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)을 이용하여 결핵균과 비결핵성 마이코박테리아 (Nontuberculous mycobacterium:NTM)을 검출할 수 있는지를 조사하여 추후 염증성 장질환 환자의 진단 및 치료에 지표로 삼고자 하였다. **재료 및 방법:** 1990년부터 2000년까지 고신대학교 복음병원에서 궤양성 대장염으로 진단된 27예와 크론병으로 진단된 24예 조직의 파라핀 절편을 이용하였다. 파라핀 박절편에서 DNA를 추출한 후 마이코박테리아를 광범위하게 검출할 수 있는 primers인 ITS-F (5' -TGGATCCGACGAAGTCGTAACAAGG-3'), Mycom-2 (5' -ATGCTCGCAACCACTATCCA-3') 와 결핵균(Mycobacterium tuberculosis) 만을 검출 할 수 있는 primers인 TBF (5' -TGGTGGGGCGTAGGCCGTGA-3'), mycom- 2 (5' -TGGATAGTGGTTGCGAGCAT-3')을 이용하여 duplex PCR을 시행하였다. **결과:** 궤양성 대장염 27예중 18예(66.7%), 크론병 24예중 15예(62.5%)에서 결핵균이 검출되었다. 비정형 마이코박테리아는 검출되지 않았다. **결론:** 본 연구 결과는 우리나라의 특발성 염

증성 장질환의 많은 예가 결핵균에 대한 PCR 검사후 장결핵으로 재분류되어져야 함을 시사한다. 따라서 염증성 장질환이 의심되거나, 장의 생검 조직에서 전형적인 결핵 의 병리 소견인 건락괴사성 육아종 소견이 관찰되지 않는 경우라도 결핵균에 대한 PCR 검사가 반드시 필요하며 감별 진단에 매우 유용하리라고 생각된다.

(감사의 말씀:
본 논문을 위하여 primer를 제공해주신 고신대학교병원 진단검사의학과 정석훈교수와 부산대학교병원 장철원교수께 깊이 감사드립니다.)

참고문헌

1. Sim KS, Kim KH, park YH. A clinical analysis of the ulcerative colitis. K J Colorectal. Ds. 1993;13: 435-42.
2. Goldman H.,Colonic mucosal biopsy in inflammatory bowel disease. Surg. Pathol 1991;4:3-24.
3. Suenaga K, Yokoyama Y, Okazaki K, Yamamoto Y. Mycobacteria in the intestine of Japanese patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 1995;90:76-80.
4. Lavy A, Militianu D, Eidelman S. Diseases of the intestine mimicking Crohn's disease. J Clin Gastroenterol 1992;15: 17-23.
5. Arnold C, Moradpour D, Blum HE. Tuberculous colitis mimicking Crohn's disease. Am J Gastroenterol 1998;93:2294-6.
6. Roth A, Foscher M, Hamid M, Michalke S, Ludwid W, Mauch H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing Mycobacteria basedon 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. H Clin. Microbiol 1998;36:139-47.
7. Chang CL, Son HC, Kim SH, Kim CM, Chung BS, Park SK, Park HK, Jang HJ, Song SD. Detection of mycobacteria by amplifying the internal transcribed spacer regions with novel genus-specific primers. Proceedings of XX World Congress of Pathology and Laboratory Medicine1999;19-23.
8. Iliffe GD, Owen DA. Rectal biopsy in Crohn's disease. Dig. Dis.Sci. 1981;21:321-4.
9. Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. 4thed., New York, Churchill Livingstones, 684-6,1996.
10. Moatter T, Mirza S, Siddiqui MS, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis in paraffin-embedded intestinal tissue specimens by polymerase chain reaction; characterization of IS6110 element negative strains. JPMA J PAK MED ASSOC 1998;48:174-8.
11. Osaki M, Adachi H, Gomyo Y, Yoshida H, Ito H. Detection of mycobacterial DNA in formalin-fixed,paraffin-embedded tissue specimens by duplex polymerase chain reaction: application to histopathologic diagnosis. Mod Pathol 1997;10: 78-83.
12. Salian NV. Rish JA. Eisenach KD. et al. Polymerase chain reaction to detect Mycobacterium tuberculosis in histologic specimens. Am J Respir Crit Care Med 1998;158: 1150-5.
13. Frevel T., Schafer KL, Totsch M, et al. PCR based detection of mycobacteria in paraffin wax embedded material rountinely processed for morphological examination. Mol Pathol 1999;52: 283-8.
14. Al-Shamali M, Khan I, Al-Nakib B, Al-Hassan F, Mustafa AS. A multiplex polymerase chain reaction assay fot the detection of Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue. Scan J Gastroenterol. 1997;32: 819-23.
15. Anand BS, Schneider FE, El-Zaatari FA, et al. Diagnosis of intestinal tuberculosis by polymerase chain reaction on endoscopic biopsy specimens. Am J Gastroenterol 1994;89: 2248-9.
16. Hermon-Taylor J, Bull TJ, Sheridan JM, et al. Causation of Crohn's disease by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Can J Gastroenterol 2000;14: 521-39.
17. Frank TS. Cook SM Analysis of paraffin section of Crohn's disease for Mycobacterium paratuberculosis using polymerase chain reaction. Mod pathol 1996;9: 32-5.
18. Chiodini RJ. Crohn's disease and the mycobacterioses; a review and comparison of two disease entities. Clin Microbiol Rev. 1989;2:90-117
19. Kanazawa K, haga Y, Funakoshi O, Nakajima H, Munakata A, Yoshida Y. Absence of Mycobacterium paratuberculosis DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. J Gastroenterol 1999;34: 200-6.
20. Koneman EW, Allen SD, Janda WH. Schreckerberger PC, Winn WC. Classification of Mycobacterium in Diagnostic *microbiology. 5th ed. New York, Lippincott.* 1997; 918-20.