

機関番号：33916

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591210

研究課題名（和文）病理標本を利用した細菌感染症の今日的再考：細菌検査の死角を検証する

研究課題名（英文）Contemporary reconsideration of bacterial infectious using pathological section: Verification of blind spot of bacteria test

研究代表者

塩竈 和也 (SHIOGAMA KAZUYA)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：10387699

研究成果の概要（和文）：臨床的に未発見、あるいは見逃されている一般細菌による細菌感染症の実態を、病理診断の立場から検証した。細菌コロニー標本のパネルを作製して、病理標本上における組織化学的検出条件の確立を行った。大腸菌を除く全例で特異的な陽性シグナルを検出することができた。膿尿セルブロック標本においては、臨床分離菌と免疫染色の結果が10/12例で一致した。*in situ* hybridization法は全例陰性だったため、より検出効率の高いプローブへの変更を検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：We examined the situation of clinically undetected or overlooked bacterial infection caused by general bacteria from the viewpoint of pathological diagnosis. We created a bacterial colony sample panel and established histochemical detection conditions in the pathology sample. A specific positive signal could be detected in all examples except for *E. coli*. The result of clinical bacterial isolate and immunostaining in the pyuria cell block specimen was consistent in 10/12 examples. The *in situ hybridization* method was negative in all examples; therefore it is necessary to consider changing to a probe with more efficient detection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症診断学

キーワード：細菌感染症、病理診断、免疫組織化学、*In situ* hybridization法

1. 研究開始当初の背景

病理診断の分野では、腫瘍に主力が注がれており、感染症はあまり省みられていない。その最大の理由は、ホルマリン固定パラフィ

ン切片上で病原体を同定する技術が十分に検討されていないことが挙げられる。病理診断は、細菌検査よりも生体反応を確認できるという非常に有利な点をもつ。病理標本の観

察を通じて、感染が成立しているか、単なる定着なのかを鑑別可能であり、起因菌の確実な同定に大きな力を発揮する。

連携研究者の堤は、日本における感染症病理診断のリーダーである。免疫染色と *in situ* hybridization (ISH)法に代表される組織化学的手法を駆使して、病理標本上で病原体を正確に検出する技術を追究してきた。

細菌感染症の病理診断は、現在でもそれ自体が未開拓の分野である。一般的な病理検査では、細菌感染巣に遭遇してもギムザ染色などによる菌体形状の確認や、グラム染色性の検討に留まっているのが現状である。細菌検査学領域では、菌種の同定や薬剤感受性の評価のみならず、核型分析など菌株の詳細な解析が可能となっている点と対象的である。

病理標本上での一般細菌の検出条件が確立されれば、細菌感染症における病理診断の価値は大きく向上する。その成果は、従来の細菌検査の間隙を埋める形で、日常診療に反映されることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床的に未発見、あるいは見逃されている一般細菌による細菌感染症の実態を、病理診断の立場から再検証することにおく。発生頻度が高い膿尿のセルブロック標本を対象として、起因菌の同定、病態生理を含めた網羅的解析を行い、一般的な細菌検査で補足されていない細菌感染症の実態を明らかにする。本研究により、病理・臨床診断間の乖離を生じる法則性の抽出が期待される。細菌感染症の診断精度向上も併せて目的としている。

3. 研究の方法

(1) 細菌種同定のための組織化学的検出法の確立：

標準株および臨床分離菌の純粋培養検体(コロニー)を病理標本化したパネルを作製して、検出感度と特異性の確認を行った。細菌コロニーの病理標本化は、ホルマリン固定した細菌コロニーに対して、アルギン酸ナトリウムを用いてゲル化した後、パラフィン包埋セルブロックを作製した。

免疫染色は、臨床的に遭遇頻度の高い一般細菌[大腸菌、腸球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; MRSA)、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (*methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*; MSSA)、メチシリン耐性表皮ブドウ球菌 (*methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis*; MRSE)、緑膿

菌、クレブシエラ、クロストリジウム]にターゲットを絞って、組織化学的検出条件の検討(最適化)を行った。それぞれの菌種に対する市販の抗体を入手して、病理標本上での検出条件(抗体濃度、抗原賦活化処理条件、増感法)を確立した。MRSAについては、*mecA* 遺伝子産物である penicillin-binding protein 2' (PBP2') をターゲットとした。抗原賦活化処理条件は、未処理、各種タンパク分解酵素処理(プロテイナーゼ K、ペプシン、トリプシン)、各種加熱処理(圧力鍋使用、クエン酸緩衝液・EDTA 溶液)を並列に施行して、最適条件を選択した。増感法は、酵素抗体間接法、アミノ酸ポリマー法、超高感度増感法(Dako 社製 CSAII キット使用)から最適な方法を選択した。陽性細胞の可視化には、HRP(horseradish peroxidase)-DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) 発色系を用いた。

ISH 法は、血液塗抹標本専用の細菌検出試薬であるハイブリゼップ(扶桑薬品)に付属されている5種類のジゴキシゲニン標識 DNAプローブ(黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、緑膿菌、腸球菌、大腸菌)を組織切片に転用して、免疫染色と同様に細菌コロニー標本を用いた組織化学的検出条件の検討を行った。DNA-DNA ハイブリッドは RNA-RNA ハイブリッドに比して結合力が劣るため、検出困難を想定して、検出系には超高感度法を採用することにより検出感度の向上を図った。

(2) 膿尿セルブロック標本に対する組織化学的手法の適応：

材料は、藤田保健衛生大学病院(第一教育病院)の入院患者より採取した膿尿検体12例を対象とした。前述した細菌コロニーの病理標本化と同様の手法で、ホルマリン固定パラフィン包埋セルブロックを作製した。全症例について連続切片を作製した後、HE染色、Gram染色(Hucker変法およびBrown-hopps法)、PAS反応、Grocott染色、Giemsa染色を施行して、細菌の形態および炎症細胞の程度を評価した。各菌種における免疫染色およびISH法の最適な検出条件を用いて、網羅的に組織化学的検出を行った。

4. 研究成果

(1) 細菌コロニー標本における免疫染色について：

市販抗体による一般細菌群の同定は、大腸菌を除く全例で特異的に陽性シグナルを検出することができた。

大腸菌を検出するために用いた抗大腸菌家兎血清は、免疫染色において幅広く腸内細菌に広く交差反応を示した。黄色ブドウ球菌

は、加熱処理によってプロテイン A (黄色ブドウ球菌が持つ細胞壁に存在するタンパク) が賦活化されるため、内因性プロテイン A のブロッキング操作を行う必要があった。

(2) 細菌コロニー標本における ISH 法について：

大腸菌プローブは、エンテロバクターおよびクレブシエラにも交差反応を生じることが確認された。緑膿菌、腸球菌および大腸菌は、0.04% プロテイナーゼ K 溶液による核酸露出処理によって検出された (図 1)。Staphylococcus 属である黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌は細胞壁成分の消化が非常に困難だったが、黄色ブドウ球菌は三重処理 (0.05% サポニン/ 0.05% TritonX-100, 0.1% リゾスタフィン, 0.04% プロテイナーゼ K)、表皮ブドウ球菌は二重処理 (0.1% リゾスタフィン, 0.04% プロテイナーゼ K) により、組織切片上での証明に成功した (図 2)。

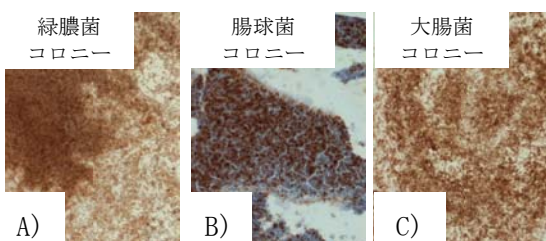


図 1. A) 緑膿菌プローブ、B) 腸球菌プローブ、C) 大腸菌プローブによる ISH 法

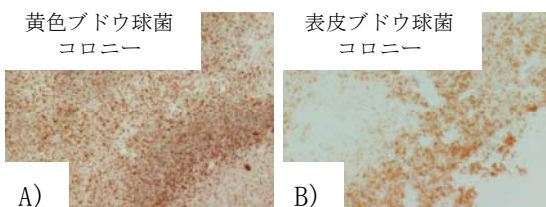


図 2. A) 黄色ブドウ球菌プローブおよび B) 表皮ブドウ球菌プローブによる ISH 法

(3) 膿尿セルブロックの組織化学的検出について：

免疫染色では、大腸菌が 8/12 例 (66.7%)、緑膿菌が 3/12 例 (25%)、黄色ブドウ球菌が 5/12 例 (41.7%)、MRSA が 3/12 例 (25%)、腸球菌が 6/12 例 (50%)、クロストリジウムが 6/12 例 (50%) に検出された。

DNA-ISH 法は、いずれのプローブにおいても陽性シグナルが得られなかった。DNA-DNA ハイブリッドによるプローブ浸透性の問題、ホルマリン固定時間による影響が考えられた。とくに、黄色ブドウ球菌について三重処理を施行しなければならないため、組織損傷が激しく判定困難な症例が大半を占めた。

臨床分離菌と免疫染色の結果は、10/12 例 (83.3%) で一致した。一致しなかった 2 例は、切片上の菌量や検出感度の問題が考えられた。

日常での病理診断の中で、細菌感染症に遭遇する頻度は高く、正確かつ迅速な起因菌の同定は重要な課題である。本研究により、諸種細菌を対象とした免疫染色の有用性が証明された。ISH 法については、プローブ浸透性の問題が考えられ、DNA プローブから強力アニーリング効率に優れる人工核酸である locked nucleic acid (LNA) プローブへの変更を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- 1) 塩竈和也、宮瀬 薫、鴨志田伸吾、伊藤舞、水谷泰嘉、稲田健一、堤 寛：病理技術～CSA II法を用いた免疫染色において、抗体高度が高い場合に生じる偽陰性の検討～. 病理と臨床. 28 (11): 1213-1217, 2010. 査読有
- 2) Shiogama K, Teramoto H, Morita Y, Mizutani Y, Shimomura R, Inada K, Kamahora T, Makino M, Tsutsumi Y: Hepatitis C virus infection in a Japanese leprosy sanatorium for the past 67 years. *J Med Virol.* 82 (4): 556-561, 2010. 査読有
- 3) 下村龍一、塩竈和也：感染症の病理 最近の話題～病原体の組織化学的証明～. 病理と臨床. 28 (4): 367-373, 2010. 査読無
- 4) Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, Fujita S, Mazutani T, Furukawa C, Fujishiro M, Ichinose M, Shiogama K, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H: Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. *Clin Cancer Res.* 15 (12): 4009-4016, 2009. 査読有
- 5) 鴨志田伸吾、塩竈和也、堤 寛：実験講座～ホルマリン固定標本におけるアポトーシスの同定～免疫染色の進歩～. *Surgery Frontier* 16 (4): 88-92, 2009. 査読無
- 6) 鈴木 舞、安藤静香、塩竈和也、鴨志田

伸吾、堤 寛：病理技術～免疫染色における tetramethylidenzidine 系 発色 剤 “True Blue” の有用性とその応用～. 病理と臨床 27 (1): 85-89, 2009. 査読有

- 7) Mizutani Y, Tsuge S, Shiogama K, Shimomura R, Kamoshida S, Inada K, Tsutsumi Y: Histochemical detection of antigen-specific antibody-producing cells in tissue sections of rats immunized with horseradish peroxidase, ovalbumin, or keyhole limpet hemocyanin. *JHistochem Cytochem*. 57 (2): 101-111, 2008. 査読有
- 8) 大西山大、塩竈和也、堤 寛：創傷治癒に対するプラスモイストVの有効性について～遺伝的糖尿病マウスを用いた実験的研究～. 医学と薬学 59 (2): 225-234, 2008. 査読有
- 9) 塩竈和也、堤 寛：アポトーシスの免疫組織化学～ホルマリン固定パラフィン切片におけるアポトーシス細胞の証明～. 医学のあゆみ 225 (6): 485-490, 2008. 査読無

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 塩竈和也：約 60 年間ホルマリン固定された組織標本は染色できるか？ハンセン病剖検例を用いた組織化学的検討. 第 42 回藤田学園医学会, 平成 22 年 10 月 8 日, 愛知, 一般講演 (示説)
- 2) 塩竈和也：邑久光明園における院内感染の検証：長期ホルマリン固定剖検肝を用いたC型肝炎ウイルスの証明. 第 42 回藤田学園医学会, 平成 22 年 10 月 7 日, 愛知, 奨励賞発表 (口演)
- 3) 塩竈和也：長期ホルマリン固定剖検肝標本を用いた *in situ* hybridization 法によるC型肝炎ウイルスの組織化学的証明. 第 99 回日本病理学会総会, 平成 22 年 4 月 28 日, 東京, 一般講演 (示説)
- 4) 水谷泰嘉：Horseradish peroxidase 免疫ラットを用いた酵素抗原法の技術開発：免疫回数と特異抗体産生細胞数の関連性. 第 99 回日本病理学会総会, 平成 22 年 4 月 27 日, 東京, 一般講演 (示説)
- 5) 塩竈和也：長期ホルマリン固定ハンセン病剖検肝におけるC型肝炎ウイルスの証

明. 第 98 回日本病理学会総会, 平成 21 年 5 月 3 日, 京都, 一般講演 (示説)

- 6) 水谷泰嘉：潰瘍性大腸炎の病変各所で産生される抗体のクローナリティ解析. 第 98 回日本病理学会総会, 平成 21 年 5 月 2 日, 京都, 一般講演 (示説)
- 7) 水谷泰嘉：酵素抗原法の技術開発：ovalbumin および keyhole limpet hemocyanin 免疫ラットを用いて. 第 99 回組織細胞化学会, 平成 20 年 10 月 6 日, 長崎, 一般講演 (示説)
- 8) 塩竈和也：高感度 *in situ* hybridization 法を用いたEBV由来microRNAの証明. 第 97 回日本病理学会総会, 平成 20 年 5 月 16 日, 金沢, 一般講演 (示説)
- 9) 鴨志田伸吾：胃癌における CD133 の発現：S-1・cisplatin 併用療法の効果との関連. 第 97 回日本病理学会総会, 平成 20 年 5 月 15 日, 金沢, 一般講演 (示説)
- 10) 水谷泰嘉：Ovlbumin および keyhole limpet hemocyanin 免疫ラットを用いた「酵素抗原法」の技術開発. 第 97 回日本病理学会総会, 平成 20 年 5 月 15 日, 金沢, 一般講演 (示説)

[図書] (計 1 件)

- 1) 亀井敏昭：アトラス 細胞診と病理診断. 医学書院 総ページ数 183, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩竈 和也 (SHIGAMA KAZUYA)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：10387699

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

堤 寛 (TSUTSUMI YUTAKA)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：80138643

稲田 健一 (INADA KEN_ICHI)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：70246081

寺本 英巳 (TERAMOTO HIDEMI)
藤田保健衛生大学・医学部・研究生
研究者番号：80304236