

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860251

研究課題名(和文) 病理標本から感染症診断へ：高感度in situハイブリダイゼーション法の応用

研究課題名(英文) Application to infectious disease diagnosis by high-sensitivity in situ hybridization in formalin-fixed paraffin-embedded sections

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高感度ISH法によって、SFTSウイルスおよびnew Toflaウイルスの検出に成功した。SFTS剖検例の6/7例に肝臓および脾臓などの血球貪食マクロファージに一致して陽性シグナルが検出された。電顕ISH法および免疫電顕法で100 nm前後のウイルス粒子が確認された。SFTSウイルス免疫染色では、1C3モノクローナル抗体が最も明瞭な染色性を示し、高感度ISH法の発現分布とほぼ一致した。New Toflaウイルスは、胃、十二指腸および食道の上皮細胞、大腸のリンパ濾胞の胚中心に陽性シグナルが確認された。本法は、技術的に困難だったパラフィン切片における感染症病原体の検出を可能にした。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded to detect severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus and new Tofla virus by using high-sensitivity in situ hybridization (ISH) in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) sections. SFTS virus genome and mRNA were demonstrated on hemophagocytic macrophages in liver and spleen from 5 of 6 cases with autopsies. About 100 nm of viral particles were identified by using pre-embedded method with transmission electron microscope combined ISH and immunostaining. The clone 1C3 mouse monoclonal antibody was the best marker in among different SFTS virus targeting antibodies. Similar expression pattern was obtained in both high-sensitivity ISH as well as immunostaining. The new Tofla virus was visualized with high-sensitivity ISH in epithelial cells of stomach, duodenum esophagus, and germinal center in lymphoid follicle of colon in new TFL virus infected mice. Our high-sensitivity ISH technique made it possible to detect some infectious pathogens in FFPE sections.

研究分野：人体病理学 分子病理

 キーワード：in situ hybridization法 LNA-ISH法 AT tailing-ISH法 免疫染色 SFTS virus New Tofla virus
電顕ISH法 免疫電顕法

1. 研究開始当初の背景

病理診断は多くの場合、腫瘍の診断に重点がおかれており、感染症診断は軽視される傾向にある。事実、感染症検査には微生物検査が主力として行われているが、実際のところ病理診断で感染症を最初に発見できるケースは少なくない。さらに、病理標本のみが診断根拠となるケースも存在する。感染症診断の分子病理学領域は、いまだ改善の余地が多く残されている。正確な感染症の病理診断は、患者の治療に直結することを常に念頭におくべき重要課題である。

病理標本における病原体の検出は、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による形態観察が基本である。これに加えて、グラム染色やギムザ染色、グロコット染色、PAS 反応などを組み合わせて検出精度を高めているが、ウイルスなど光学顕微鏡レベルでは認識できない病原体に対しては、免疫染色が有効となる。免疫染色は、特異抗体を用いて標的抗原を検出できる有効な方法だが、多様な感染症病原体を網羅できるほど抗体が充実しておらず、また市販抗体に依存しているため、ロット間における染色性の差、特異性の低さなど問題が山積している。そこで注目されるのが、標識した核酸鎖 (プローブ) を用いて組織切片上の特定の塩基配列を検出する *in situ hybridization* (ISH) 法である。現在では、病理検査室においても治療判定・効果予測のための HER-2、ALK および EGFR の *fluorescein in situ hybridization* (FISH)、感染症関連では *Human papilloma virus* (HPV)、EBV encoded RNA (EBER) など限られたターゲット遺伝子に対して実施されているが、免疫染色のように十分に普及しているとは言い難い。その要因として、パラフィン切片における標的核酸の保存状態、プローブの感度と特異性、標的核酸露出処理等の問題があげられる。ホルマリン固定の場合、時間の経過とともに核酸の断片化が生じることは周知の事実だが、臨床現場では、核酸保存を最優先としてサンプル処理が行われていない。通常ホルマリン固定でも簡便に再現性よく、標的核酸を検出できる技術が求められる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高感度 ISH 法によって今まで検出困難だった病理標本に潜む諸種感染症病原体を証明すること、さらに、本法を日常の感染症の病理診断に応用可能な検出法に位置づけることにおく。高感度 ISH 法を可能にする突破口として、LNA/DNA キメラプローブと biotin-free チラミド増感を組み合わせた LNA-ISH 法、AT の繰り返し配列を付加した AT tailing プローブによる増幅反応と biotin-free チラミド増感による AT tailing-ISH 法を用いる。これらの手法は *in situ PCR* に匹敵する検出感度を持ち合わせた非常に高感度な ISH 法である。この優れた両技術を用いることにより、多様な感染症病原

体を網羅的に検出することが可能となり、パラフィン切片側の核酸の保存状態に左右されない高感度 ISH 法が実現すると予想される。

3. 研究の方法

(1) 材料:

重症熱性血小板減少症候群 (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome: SFTS) ウイルス証明のため、SFTS ウイルス感染 veroE6 細胞、SFTS ウイルス感染マウス 6 例および SFTS ウイルス感染により死亡した 7 例の剖検材料を用いた。New Tofla ウイルス証明のため、New Tofla ウイルス感染 veroE6 細胞および New Tofla ウイルス感染マウス 5 例を用いた。紅斑熱群リケッチアおよびツツガムシ病オリエンチア証明のため、それぞれの病原体感染細胞セルブロックを用いた。いずれもバイオハザードの観点から、ホルマリン固定パラフィン切片を用いた。

(2) 高感度 ISH 法におけるプローブのデザイン:

①SFTS ウイルスおよび new Tofla ウイルスは、いずれもウイルスゲノムの三分節 (S 分節、M 分節、L 分節) をターゲットとし、それぞれのゲノム RNA および mRNA を検出対象とした。紅斑熱群リケッチアおよびツツガムシ病オリエンチアは、いずれも 16s rRNA をターゲットとした。すべてのプローブは、「BLASTN」により他の遺伝子との相同性が限りなく低い領域を選出した。

②LNA-ISH 法で用いる LNA/DNA キメラプローブは、LNA の比率を 1/3 にすることを考慮して、LNA の組み込む位置が異なるプローブをそれぞれ 2 種類ずつ作製した。いずれもプローブの長さを 50 塩基程度に設定し、3' 末端にジゴキシンゲニンを標識した。

③AT tailing-ISH 法で用いる AT tailing プローブは、対象塩基配列の 5' 末端にビオチンを標識し、3' 末端に AT 繰り返し配列を 20 塩基組み込んだ。いずれも全長を 60 塩基程度に設定した。

(3) 高感度 ISH 法:

核酸露出処理の検討 (プロテイナーゼ K 濃度、反応温度、反応時間)、ハイブリダイゼーション条件の検討 (プローブ濃度、反応温度、反応時間)、洗浄条件の検討 (内部緩衝液濃度、反応温度、反応時間) に重点をおいて、最良の組み合わせを選出した。

(4) 免疫染色:

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野から譲渡された 3 種類の抗 SFTS ウイルス N protein マウスモノクローナル抗体 (clone: 1C3, 5G12, 1A11) および 6 種類の抗 new Tofla ウイルス家兎血清 (1A8-5-8, 3A6, 4D2, 5D1, 5D4, 5G8-5-6) を用いて至適検出条件を設定

した。抗原賦活化処理の検討（タンパク分解酵素処理、熱処理）、至適抗体希釈倍率の検討に重点をおいて、最良の組み合わせを選出した。

（5）電顕解析：

包埋前電顕 ISH 法および免疫電顕法によって、各病原体への特異的反応を観察した。本研究で確立した至適検出条件によって高感度 ISH 法および免疫染色を行ったのち（DAB 発色）、オスミウム処理を施行してスライドガラス上の目的部位にエポキシ樹脂を倒立させた。数日かけて硬化させたのち、加熱しながらスライドガラス上の切片をエポキシ樹脂に転写させた。通常の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

（1）免疫染色：

SFTS ウイルス検出のための免疫染色において、3 種類の抗体のうち、1C3 が最も染色良好だった。クエン酸緩衝液 pH 6.0 による加熱処理、2000 倍希釈した一次抗体、アミノ酸ポリマー法による検出が至適検出条件だった。SFTS ウイルス感染 veroE6 細胞の細胞質に散在性に陽性を示した。陰性対象における交差反応は認められなかった。New ToFla ウイルス検出のための免疫染色では、いずれの抗体においても陰性対象に反応し、特異性を欠く結果が確認された。

（2）高感度 ISH 法：

LNA-ISH 法は、5~40 $\mu\text{g/ml}$ プロテイナーゼ K 溶液による核酸露出処理を施行したのち、0.01 $\mu\text{mol/L}$ ジゴキシゲニン標識プローブを滴下して、95°Cホットプレートで5分間、さらに 37°C一晩ハイブリダイゼーションさせた。翌日、1x SSC および 0.1x SSC 緩衝液で 50°C各 15 分間洗浄したのち、100 倍希釈した西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識ジゴキシゲニン抗体を反応させて、FITC 標識チラミドによる増感を行った。最終的に、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識 FITC 抗体により増幅産物を検出した。LNA を組み込む位置を変えたプローブ間では、ほとんど染色性の差は認められなかった。ビオチンフリーチラミド増感法に限って、陽性シグナルを検出することができた。

AT tailing-ISH 法は、クエン酸緩衝液 pH 6.0 による圧力鍋に引き続き 0.1 $\mu\text{g/ml}$ プロテイナーゼ K 溶液による核酸露出処理を施行したのち、0.01 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ ビオチン標識プローブを滴下して、95°Cホットプレートで 5 分間、さらに 50°C一晩ハイブリダイゼーションさせた。翌日、1x SSC および 0.1 xSSC 緩衝液で 55°C各 10 分間洗浄したのち、AT tailing 反応を 60°C30 分間施行して、tail 部分の伸長とビオチンの取り込みを行った。100 倍希釈した西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標

識ストレプトアビジンを反応させて、ビオチン標識チラミドによる増感を行った。最終的に、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにより増幅産物を検出した。

SFTS ウイルスの分節別プローブ、SFTS ウイルスゲノムおよび mRNA 検出プローブにおける染色性の差は認められず、いずれも明瞭な陽性シグナルが検出できた。LNA-ISH 法と AT tailing-ISH 法では、非常に類似した分布を示し、同程度の染色性が確認された（図 1）。高感度 ISH 法と免疫染色の結果は完全一致し、発現分布もほぼ同一だった（図 2）。いずれのプローブにおいても、交差反応は確認されなかった。SFTS 剖検例の 6/7 例において、肝臓および脾臓などの血球貪食マクロファージに一致して陽性シグナルが検出された。

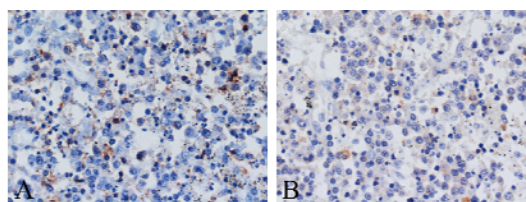


図 1. 高感度 ISH 法の比較. A: LNA-ISH 法、B: AT tailing-ISH 法

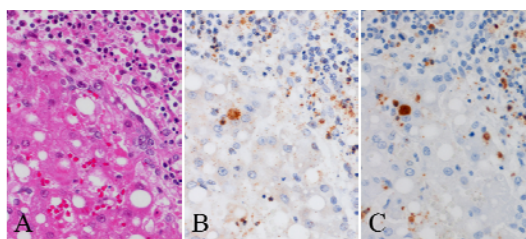


図 2. 高感度 ISH 法と免疫染色による SFTS ウイルスの検出（肝臓）. A: HE 染色、B: AT tailing-ISH 法、C: 免疫染色（1C3）

New ToFla ウイルスは、new ToFla ウイルス感染マウスの胃、十二指腸および食道の上皮細胞、大腸のリンパ濾胞の胚中心に陽性シグナルが確認された。SFTS ウイルスと同様、LNA-ISH 法および AT tailing-ISH 法の発現はほぼ一致した。

高感度 ISH 法による紅斑熱群リケッチアおよびツツガムシ病オリエンチアの検出は、相互に交差反応が生じたため、両者の鑑別ができなかった。

（3）電顕解析：

ガラス標本からの転写は、MBL 社のスライドガラス「TACAS」が最も優れていた（図 3）。包埋前電顕 ISH 法および免疫電顕法によって、約 100 nm 前後の SFTS ウイルス粒子をとらえ

ることに成功し、高感度 ISH 法および免疫染色の特異性が確認された (図 4)。

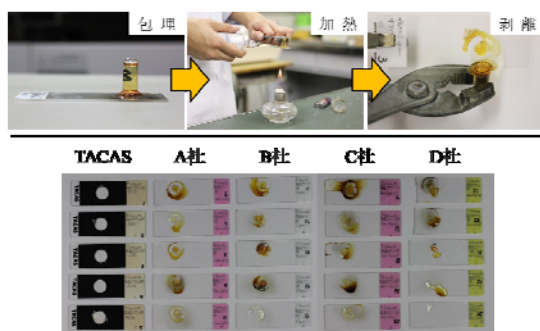


図 3 : 包埋前電顕 ISH 法および免疫電顕法のための切片転写。TACAS スライドガラスに限って全例 (5/5 例) で転写が成功した。

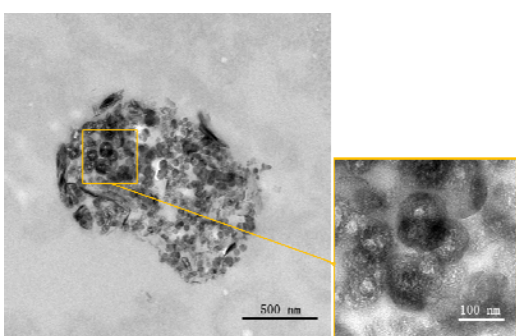


図 4 : 電顕 ISH 法。約 100 nm 前後のウイルス粒子の集簇が確認された (SFTS 剖検例のリンパ節)。

(4) 総括 :

本法は、ホルマリン固定パラフィン切片上における諸種感染症病原体の検出に有効な手法である。遺伝子診断 (PCR) との併用によって、病原体証明のための診断精度を高めることが期待できる。本研究内容は、2015 年の *Acta Histochemica et Cytochemica*、2016 年の *Oncotarget* および *Scientific Reports* に掲載された。

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 10 件)

- ① Shimada S, Aoki K, Nabeshima T, Fuxun Y, Kurosaki Y, Shiogama K, Onouchi T, Sakaguchi M, Fuchigami T, Ono H, Nishi K, Posada s-Herrera G, Uchida L, Takamatsu Y, Yasuda J, Tsutsumi Y, Fujita H, Morita K: Tofla virus: A newly identified Nairovirus of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan. 6: 20213, *Sci Rep*. 2016. 査読有 doi:

10.1038/srep20213

- ② Hayakawa D, Nishi K, Fuchigami T, Shiogama K, Onouchi T, Shimada S, Tsutsumi Y, Morita K: 18F-FDG PET imaging for identifying the dynamics of intestinal disease caused by SFTSV infection in a mouse model. 7 (1): 140-147, *Oncotarget*. 2016. 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.6645
- ③ Matsui T, Onouchi T, Shiogama K, Mizutani Y, Inada KI, Yu F, Hayasaka D, Morita K, Ogawa H, Mahara F, Tsutsumi Y: Coated glass slides TACAS are applicable to heat-assisted immunostaining and in situ hybridization at the electron microscopy level. *Acta Histochem Cytochem*. 48 (5): 153-157, 2015. 査読有 doi: 10.1267/ahc.15012
- ④ Oshima Y, Fujii M, Shiogama K, Miyamoto K, Fujita H, Sato S, Maruyama S, Mahara F, Tsutsumi Y: Bartonella henselae infection caused by cat flea bite. *Pathol Int*. 66 (3): 177-179, 2015. 査読有 doi: 10.1111/pin.12360
- ⑤ Shiogama K, Kitazawa K, Mizutani Y, Onouchi T, Inada KI, Tsutsumi Y: New Grocott stain without using chromic acid. *Acta Histochem Cytochem*. 48 (1): 9-14, 2015. 査読有 doi: 10.1267/ahc.14045
- ⑥ Kobayashi K, Sakurai K, Hiramatsu H, Inada KI, Shiogama K, Nakamura S, Suemasa F, Kobayashi K, Imoto S, Haraguchi T, Ito H, Ishizuka A, Tsutsumi Y, Iba H: The miR-199a/Brm/EGR1 axis is a determinant of anchorage-independent growth in epithelial tumor cell lines. *Sci Rep*. 5: 8428, 2015. 査読有 doi: 10.1038/srep08428
- ⑦ Onouchi T, Mizutani Y, Shiogama K, Inada KI, Okada T, Naito K, Tsutsumi Y: Application of the enzyme-labeled antigen method to visualizing plasma cells producing antibodies against Strep A, a carbohydrate antigen, of *Streptococcus pyogenes* in recurrent tonsillitis. *Microbiol Immunol*. 59 (1): 13-27, 2015. 査読有 doi: 10.1111/1348-0421
- ⑧ Kageyama-Yahara N, Yamamichi N, Takahashi Y, Nakayama C, Shiogama K, Inada KI, Konno-Shimizu M, Kodashima S, Fujishiro M, Tsutsumi Y, Ichinose M, Koike K: Gli regulates MUC5AC transcription in human gastrointestinal cells. *PLoS one*. 9

- (8): e106106, 2014. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0106106
- ⑨ Fujiwara H, Fujiwara H, Akatsuka I, Takahashi T, Komori Y, Shiogama K, Tsutsumi Y: Lymphocytic gastritis showing concomitant occurrence of both CD4+ and CD8+ T-cells among epithelial cells. *Pathol Int.* 64 (1): 361-363, 2014. 査読有 doi: 10.1111/pin.12172
- ⑩ Mizutani Y, Tsuge S, Takeda H, Hasegawa Y, Shiogama K, Onouchi T, Inada KI, Sawasaki T, Tsutsumi Y: In situ visualization of plasma cells producing antibodies reactive to *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis: The application of the enzyme-labeled antigen method. *Mol Oral Microbiol.* 29 (4): 156-173, 2014. 査読有 doi: 10.1111/omi.12052

[学会発表] (計9件)

- ① 塩竈和也、尾之内高慶、水谷泰嘉、櫻井浩平、稲田健一、堤 寛：好中球細胞外トラップ (NETs) とフィブリンは HE染色で鑑別できるか？第56回日本組織細胞化学会。2015年10月3日～4日。関西医科大学 (枚方市)
- ② 塩竈和也、尾之内高慶、水谷泰嘉、櫻井浩平、稲田健一、堤 寛：好中球細胞外トラップ (NETs) とフィブリンを HE染色で鑑別する。第47回藤田学園医学会。2015年10月1日～2日。藤田保健衛生大学 (豊明市)
- ③ Shiogama K, Onouchi T, Mizutani Y, Takahashi Y, Inada KI, and Tsutsumi Y: Distinction between NETs and fibrin in paraffin sections. 第104回日本病理学会総会。2015年4月30日～5月2日。名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ④ Shiogama K, Hayasaka D, Onouchi T, Mizutani Y, Inada KI, Morita K, and Tsutsumi Y: Demonstration of SFTS virus with high-sensitivity in situ hybridization and immunostaining. 第104回日本病理学会総会。2015年4月30日～5月2日。名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ⑤ 塩竈和也、堤 寛：SFTSの病理。第7回リケッチア症臨床研究会。2015年1月10日～11日。滋賀県立県民交流センター・ピアザ淡海 (大津市)
- ⑥ 塩竈和也、水谷泰嘉、尾之内高慶、稲田健一、堤 寛：SFTS virusの組織化学的証明：高感度in situ hybridization法と免疫染色の応用。第69回日本衛生動物学会西日本支部大会。2014年11月8日～9日。愛知医科大学 (長久手市)
- ⑦ 塩竈和也、松井貴弘、三宅芳裕、水谷泰嘉、尾之内高慶、稲田健一、堤 寛：ホルマリン固定パラフィン切片における好中球細胞外トラップ検出マーカーの確立。第55回日本組織細胞化学会。2014年9月27日～28日。松本中央公民館 (松本市)
- ⑧ 塩竈和也、堤 寛：SFTS virusの組織化学的証明。第22回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー SADI 太宰府大会。2014年7月4日～6日。大宰府館まほろばホール (太宰府市)
- ⑨ 塩竈和也、三宅芳裕、水谷泰嘉、尾之内高慶、稲田健一、堤 寛：好中球細胞外トラップ～ホルマリン固定パラフィン切片における免疫組織化学～。第103回日本病理学会。2014年4月24日～26日。広島国際会議場 (広島市)

[その他]

- ① 塩竈和也、堤 寛：抗原性賦活化が核染色に及ぼす影響。免疫染色玉手箱、技術。ニチレイバイオサイエンス、東京、2015。
http://www.nichirei.co.jp/bio/tamat ebako/pdf/intro_11_dr_Shiogama.pdf

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし