

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Histopathological study on the prevalence of trichosporonosis in formalin fixed and paraffin embedded tissue autopsy sections by in situ hybridization with peptide nucleic acid probe
別タイトル	剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋組織に対しペプチド核酸プローブを用いたインサイチューハイブリダイゼーション法によるトリコスポロン症の病理組織学的発生動向調査
作成者（著者）	定本, 聡太
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：舘田一博 / タイトル：Histopathological study on the prevalence of trichosporonosis in formalin fixed and paraffin embedded tissue autopsy sections by in situ hybridization with peptide nucleic acid probe / 著者：Sota Sadamoto, Minoru Shinozaki, Minoru Nagi, Yasuhiro Nihonyanagi, Kozue Ejima, Aki Mitsuda, Megumi Wakayama, Naobumi Tochigi, Yoshitaka Murakami, Tsunekazu Hishima, Tetsuo Nemoto, Shigeki Nakamura, Yoshitsugu Miyazaki, Kazutoshi Shibuya / 掲載誌：Medical Mycology / 巻号・発行年等：58(4):460-468, 2020
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第934号
学位記番号	甲第639号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD91956666

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

定本聡太より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 639 号

学位申請者 : さだ もと そう た
 定 本 聡 太

学位論文 : Histopathological study on the prevalence of trichosporonosis in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue autopsy sections by *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probe

(剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋組織に対しペプチド核酸プローブを用いたインサイチュウハイブリダイゼーション法によるトリコスポロン症の病理組織学的発生動向調査)

著者 : Sota Sadamoto, Minoru Shinozaki, Minoru Nagi, Yasuhiro Nihonyanagi, Kozue Ejima, Aki Mitsuda, Megumi Wakayama, Naobumi Tochigi, Yoshitaka Murakami, Tsunekazu Hishima, Tetsuo Nemoto, Shigeki Nakamura, Yoshitsugu Miyazaki, Kazutoshi Shibuya

公表誌 : Medical Mycology DOI: 10.1093/mmy/myz096

論文内容の要旨 :

研究背景

深在性真菌症は、早期診断・治療が困難な場合も多く、今日においても死亡率の高い日和見感染症の一つである。培養による確定診断は依然として感染症診断の要であるが、培養の陽性率が一般細菌に比して低い深在性真菌症では、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) を用いた従来の病理組織学的診断が重要視されている。しかし、組織切片上の形態の類似している菌種では時として正確な診断が困難である。

Trichosporon 属は、日本を含むアジアにおける酵母感染症の代表的な起因菌であるが、最も頻度の高い酵母血流感染の起因菌である *Candida* 属に用いられるキャンディン系抗真菌薬に対して耐性を示すため、両者の鑑別は極めて重要である。しかしなが

ら、両者は組織内で二形性（酵母・菌糸の両者）を示すため、病理組織学的検索による鑑別は困難なことが多い。

ところで、最近では従来の病理組織診断に加え、polymerase chain reaction (PCR)法や *in situ* hybridization (ISH)法といった分子生物学的な補助診断法の応用は試みられているものの、依然として精度や迅速性等の評価を重ねる必要がある。斯様な現状で、本研究では組織内における二形性酵母の鑑別の一助として ISH 法を用い、本法の評価ならびに酵母血流感染症の起因菌に関する多施設後方視的発生動向調査を行った。

方法・結果

東邦大学医学部病院病理学講座とがん・感染症センター東京都立駒込病院にて 1975 年から 2012 年の間に施行された計 8054 例の病理解剖例を対象として、日本剖検輯報（日本病理学会編）に登録されているデータを用いて選別を行い、深在性真菌症と診断された剖検例 459 例のうち 105 例の酵母血流感染症の症例を文献的に抽出した。この 105 例に関して改めて病理組織学的に評価し、クリプトコックス症を除く酵母血流感染症 88 例を対象とした。これら 88 例の酵母血流感染症に対し、過去の文献で報告されている *C. albicans* と *Trichosporon* spp. に対して特異性のある 2 つの peptide nucleic acid (PNA) プローブを用いた ISH 法を行ったところ、7 例の *Trichosporon* spp. PNA プローブ陽性例と 35 例の *C. albicans* PNA プローブ陽性例が認められた。また、いずれの PNA probe に対しても陽性を示した症例はなく、両者共に陰性であった症例は 46 例であった。また、7 例の *Trichosporon* spp. PNA プローブ陽性例のうち、5 例は過去の病理解剖報告書ではカンジダ症と報告されていた。

FPPE 組織における真菌に由来する遺伝子保存状態の評価は、これまでほとんど行われていない。そこで、本研究における ISH 法の妥当性を評価するために以下の検討を行った。1) 宿主の感染防御能の指標として炎症反応を評価し、ISH 法陽性率と比較したところ炎症細胞浸潤が乏しい病変で ISH の陽性率が上昇すること。2) 46 例の両者陰性例に対して真菌特異的な Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域の遺伝子検出を試みたが、全ての検体で酵母に由来する遺伝子は証明されなかった。

考察

本研究では、いずれの PNA probe にも反応しない検体が 46 例と多かったが、その原因として、標的とする遺伝子の損傷を第一に考えたい。損傷を与える要因としてはホルマリン固定に基づく蛋白質の架橋や遺伝子の断片化が考えられる。また、本研究結果で炎症細胞浸潤の減弱が ISH 法陽性率の向上に寄与していたことから宿主の感染防御担当細胞による標的遺伝子の破壊も想定される。更に陰性例に対して施行した ITS 領域での PCR で酵母に由来する増幅産物が得られなかったことも標的遺伝子が標本作成の過程で失われてしまった可能性を示唆している。

本研究では、トリコスポロン症の深在性真菌症における頻度は 1.5% (7/459 例) であった。これに対して日本剖検輯報（日本病理学会編）を用いて検討された過去の報告でトリコスポロン症の頻度は 0.1-0.2% と極めて低い数値になっている。この結果は、従来の形態診断に基づく病理組織診断ではトリコスポロン症をカンジダ症から識別することは事実上困難であることを示唆しており、ISH 法を用いた本研究の結果がより実勢に近いものと判断したい。

結論

クリプトコックス症を除く酵母血流感染症剖検例 88 例について ISH 法を施行し、従前と比較してトリコスポロン症の頻度が高いことを指摘した。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 639 号	氏 名	定 本 聡 太
学位審査担当者	主 査	館 田 一 博
	副 査	石 井 良 和
	副 査	三 上 哲 夫
	副 査	赤 坂 喜 清
	副 査	高 橋 啓

学位論文の審査結果の要旨 :

申請者は、東邦大学医学部病院病理学講座とがん・感染症センター東京都立駒込病院において1975年～2012年の間に施行された8054例の病理解剖例を対象に、酵母血流感染の原因病原体に関して検討を行っている。深在性真菌症と診断されたのは459例であり、このうちクリプトコックス症を除外した酵母血流感染が疑われた88例に関して詳細に検討している。*C. albicans* と *Trichosporon* spp. に特異的な peptide nucleic acid (PNA) プローブを用いた *in site* hybridization (ISH) 法で検討したところ、*Trichosporon* 陽性が7例、*C. albicans* 陽性が35例、両プローブともに陰性が46例であった。さらに申請者は、宿主感染防御能の指標として炎症反応を評価し、炎症細胞浸潤が強い症例で ISH 陽性率が低下することを報告した。さらに、両プローブで陰性となった46例を対象に真菌特異的な Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域の遺伝子検出を試みたが、全ての検体で酵母に由来する遺伝子は証明されなかったことを報告している。

酵母様真菌において、*Trichosporon* 属はキャンディン系抗真菌薬に耐性を示すことから、*Candida* 属との鑑別が重要となる。本研究においても、7例の *Trichosporon* 属陽性となった症例のうち、5例が病理解剖報告書で *Candida* 症と報告されていた。過去の報告では *Trichosporon* 症の頻度は0.1～0.2%と報告されていたが、本検討では7/459例(1.5%)という結果であり、形態学的診断だけでは本症が見逃されている可能性が示唆された。また申請者は、ホルマリン固定による病原体遺伝子の断片化に加え、宿主炎症細胞の集積による遺伝子の破壊が ISH 陰性の理由として重要であることを報告している。

申請者による研究結果の説明のうち、審査委員から多数を質問が寄せられた。病理診断と培養結果との関連、*Trichosporon* と *Candida* は病理学的に鑑別できるのかどうか、ホルマリン濃度による DNA fragmentation の影響、治療薬の選択と臨床経過、などの質問に対して、申請者は報告されているエビデンスを的確に引用しながら回答した。さらに両プローブ陰性症例を対象に、*C. albicans* 以外の *Candida* 属を対象とした ISH 法を検討することの重要性に関して説明を加えた。

申請者が報告した成績は、深在性真菌症、特に酵母真菌症の中の *Trichosporon* 症の重要性を示す成績であり、抗真菌薬の選択の上からも重要な知見であると考えられる。発表・質疑応答のうち審査委員で議論され、本論文は学位に値する研究成果であることが全員一致のもとに確認された。