

# 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

篠崎 稔より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 603 号

学位申請者 : しの 篠 ざき 崎 みのる 稔

学位審査論文 : Histopathological diagnosis of invasive fungal infections in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues assisted by molecular methods: Comparison of reproducibility and reliability for histopathological evaluation, polymerase chain reaction, and *in situ* hybridization

(分子生物学的解析法を用いたホルマリン固定パラフィン包埋試料における深在性真菌症の病理診断: 病理組織学的評価、PCR 法、*in situ* hybridization 法の信頼性と再現性の比較検討)

著 者 : Minoru Shinozaki, Naobumi Tochigi, Sota Sadamoto, Somay Yamagata Murayama, Megumi Wakayama, Tetsuo Nemoto

公 表 誌 : Medical Mycology Journal

論文内容の要旨 :

近年、適正に抗真菌化学療法を施行するという観点から、深在性真菌症における病理診断においても可及的速やかな菌種の推定が求められ、また、その重要性が増している。一方、病理組織内では必ずしも感染真菌が典型的な菌形態を示すとは限らず、菌種の推定は困難な場合が少なくない。そこで、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を試料とした高精度の遺伝子病理組織学的診断法の確立が急務となっている。しかし、これまでのところ、分子生物学的解析法を深在性真菌症の診断に応用する試みはなされてはいるものの、広く認知され普及するような診断法の確立には至っていない。

われわれは、FFPE 試料に対して *in situ* hybridization (ISH) 法と PCR 法を基幹とした遺伝子病理組織学的診断法について、その応用の可能性と問題点に関して言及したい。対象試料としては病理解剖 (1955 年~2006 年) にて病理組織形態学的に真菌症と診断された 49 症例 59 試料を対象として検討を行った。病理組織標本の再評価を実施し、以下の如くその菌形態を再評価した。Non zygomycete mold (NZM), Zygomycete mold (ZM), Mold not otherwise specified (MNOS), Monomorphic yeast (MY), Dimorphic yeast (DY)。

ヒトβ-グロビン遺伝子および病原真菌のリボソームRNA関連遺伝子群を標的としたPCR法を施行する事で、標本中における核酸の保存性を評価した。さらに、*Aspergillus*属、*Fusarium*属、Mucorales目、*Scedosporium*属のリボソームRNA関連遺伝子群を標的としたPCR法およびnested PCR法を施行した。増幅産物が得られた場合にはPCRダイレクトシーケンス法にてシーケンス解析を実施した。さらに、病原真菌の28S rRNAを標的としたPNA (Peptide Nucleic Acid)をプローブとしたISH法を施行し、菌体内における核酸の保存性を評価し、*Fusarium*属、*Candida albicans*の26S rRNAを標的としたPNAプローブによるISH法と*A. fumigatus*のAlkaline proteinase (ALP)遺伝子を標的とした二本鎖DNAプローブによるISH法を施行した。

本検討から得られた主な所見として、i) MNOSとして再評価された症例でも、2症例においてこれらの分子生物学的手法により*Aspergillus*属と確定することができた。ii) NZMと再評価した症例は全て*Aspergillus*属で、それ以外の菌種は検出されなかった。iii) ZMと再評価された症例は分子生物学的手法においても全てモコールと証明された。iv) DYと再評価された6症例のうち、1症例は分子生物学的手法により*Trichosporon*属である事がわかった。

PCR法における陽性率および陽性サンプル数はヒトβ-グロビン遺伝子(110 bp)：61% (36/59)、ヒトβ-グロビン遺伝子(250 bp)：10% (6/59)、汎真菌(250 bp)：14% (8/59)、汎真菌(300 bp)：24% (14/59)、*Aspergillus*属(146 bp)：49% (29/59)、*Aspergillus*属(236 bp)：19% (11/59)、Mucorales(175-177 bp)：7% (3/59)、*Fusarium*属(170 bp)：0% (0/59)、*Scedosporium*属(172 bp)：0% (0/59)であった。ISH法における陽性症例数および陽性率は汎真菌：59% (35/59)、*Aspergillus*属(ALP遺伝子)：63% (38/59)、*C. albicans*：8% (5/59)、*Fusarium*属：0% (0/59)であった。

核酸の保存性の評価を目的としたヒトβ-グロビン遺伝子(110 bp)に対するPCR法によると病原真菌の28S rRNAを標的としたISH法において関連性がみられ(p<0.05)、共に6割の試料で陽性所見が得られた。*Aspergillus*属を標的とした2種類のnested PCR法とALP遺伝子を標的としたISH法で関連性が認められた。特に146 bpと増幅産物が短いnested PCR法において陽性率が高く、ALP ISH法との関連性も強かった(p<0.01)。また、仮性菌糸を形成する*Candida*属と*Trichosporon*属、*Aspergillus*属とMucorales、そして、*Aspergillus*属の中でもnon-*fumigatus Aspergillus*の間で遺伝子解析による解析結果と初期診断における形態学的な菌種の判断で乖離がみられた。

PCRダイレクトシーケンス法においては汎真菌PCR法(300bp)にてITS-1領域が増幅された試料のうち、菌種の特定につながる結果が得られたのは9試料で、non-*fumigatus*による*Aspergillus*属が1試料、*A. fumigatus*が5試料、*Trichosporon*属が3試料であった。*Aspergillus*属の18S rRNA遺伝子領域を標的としたnested PCR法(146 bp)にて増幅された試料では、*A. flavus*などnon-*fumigatus*による*Aspergillus*属が1試料、他27試料においては*Aspergillus*属に矛盾しない相同性を示した。Mucoralesの18S rRNA遺伝子領域を標的としたnested PCR法で増幅された試料においては*Rhizopus*属、*Rhizomucor*属ともに1試料であった。

初期診断と形態学的再評価との間で乖離を認めた症例は7症例であった。初期診断、組織学的再評価そして遺伝子解析を進める中で、仮性菌糸を形成する*Candida*属と*Trichosporon*属、*Aspergillus*属とMucorales、そして、*Aspergillus*属の中でもnon-*fumigatus Aspergillus*の判断において、遺伝子解析による解析結果と初期診断における形態学的な菌種の判断で乖離がみられたことから、これらの点を形態学的判断の問題点として指摘したい。

本法を*Aspergillus*属はもとより、病理・細胞診断材料中において*Aspergillus*属と形態学的に鑑別が難しい非*Aspergillus*性糸状菌である*Fusarium*属や*Scedosporium*属、また、相互に鑑別が問題となる*Candida*属と*Trichosporon*属などの二形性酵母、さらに、事実上補助診断法が存在しないMucoralesなどの半形に展開することが重要な課題である。

これまでの研究から、FFPE試料の有用性と限界を把握し、ISH法と病理形態学的診断とを関連づけた複合的診断により、病理診断領域における精度が高い真菌症診断の可能性が示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 603 号	氏 名	篠 崎 稔
学位審査担当者	主 査	館 田 一 博
	副 査	三 上 哲 夫
	副 査	石 井 良 和
	副 査	高 橋 啓
	副 査	黒 田 優

学位審査論文の審査結果の要旨 :

深在性真菌症は今日においても診断の難しい感染症の 1 つである。申請者らはホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を試料とした高精度の遺伝子病理組織学的診断法について、*in situ* hybridization (ISH) 法と PCR 法を基幹とした遺伝子病理組織学的診断法を用いてその応用の可能性と問題点に関して検討している。対象試料としては病理解剖 (1955 年～2006 年) にて病理組織形態学的に真菌症と診断された 49 症例 59 試料を対象として検討を行っている。ヒト  $\beta$ - グロビン遺伝子および病原真菌のリボソーム RNA 関連遺伝子群を標的とした PCR 法を施行する事で、標本中における核酸の保存性を評価し、*Aspergillus* 属、*Fusarium* 属、Mucorales 目、*Scedosporium* 属のリボソーム RNA 関連遺伝子群を標的とした PCR 法および nested PCR 法を施行している。増幅産物が得られた場合には PCR ダイレクトシーケンス法にてシーケンス解析、さらに病原真菌の 28S rRNA を標的とした PNA (Peptide Nucleic Acid) をプローブとした ISH 法を施行し、菌体内における核酸の保存性を評価している。PCR ダイレクトシーケンス法においては汎真菌 PCR 法 (300bp) にて ITS-1 領域が増幅された試料のうち、菌種の特定につながる結果が得られたのは 9 試料で、non *fumigatus* による *Aspergillus* 属 が 1 試料、*A. fumigatus* が 5 試料、*Trichosporon* 属が 3 試料であった。*Aspergillus* 属の 18S rRNA 遺伝子領域を標的とした nested PCR 法 (146 bp) にて増幅された試料では、*A. flavus* など non-*fumigatus* による *Aspergillus* 属が 1 試料、他 27 試料においては *Aspergillus* 属に矛盾しない相同性を示した。Mucorales の 18S rRNA 遺伝子領域を標的とした nested PCR 法で増幅された試料においては *Rhizopus* 属、*Rhizomucor* 属ともに 1 試料であった。

論文成績に関する説明ののち、審査委員から多数の質問が出された。特に、ホルマリン固定パラフィン包埋切片における  $\beta$  グロビンの安定性、迅速診断法への応用、次世代シーケンサー法などの新しい診断法の可能性に関して、申請者は本論文で得られた知見とともにその限界、将来的な研究の方向性に関して理論的に説明を行った。今日の医療技術の進歩とともに今後ますます免疫不全宿主が増加することが考えられ、深在性真菌症患者のさらなる増加が危惧されている。申請者が報告した知見は、これからの深在性真菌症の診断法を考える上で重要な示唆を与えるものである。発表・質疑応答のの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。