

令和5年4月5日

接合菌類（ムコール菌）の新たなグロコット染色変法の発見

<研究成果のポイント>

- 真菌類を染める従来のグロコット染色法では、菌壁が薄いムコール菌は酸化力の強いクロム酸では染色性が弱く判別が困難でした。
- 比較的酸化力の弱い過ヨウ素酸に変えることで、ムコール菌の染色性を増強させることを可能にしました。
- 前処理として免疫組織化学染色で多用される熱処理を行うことで結合組織などへの共染反応が抑制され、菌体の判別が容易になりました。
- Rhizopus 抗体による免疫染色でのムコール菌陽性率は70%と低く、その多くは弱陽性で判定は困難であったことから、前処理および酸化法を変えたグロコット染色は大変有用であります。
- 真菌感染症は種々の理由で免疫状態が減弱した状況下で、重篤になることも多く、病理解剖で初めて発見されることも稀ではありません。鋭敏かつ正確な同定で、医療の quality control の一助となることが期待されます。

※本研究成果は、国際学術誌「Bio Techniques」に日本時間3月17日に公表されました。

<概要>

真菌感染症は、現在の医学でも治療・診断ともに容易ではない場合があります。分子生物学的あるいは免疫学的手法が開発されているものの、コストも含めて有用なものは少なく、古典的な銀染色といわれる手法が使われています。代表的なものに半世紀以上の歴史をもつグロコット染色がありますが、菌壁が薄いムコール菌は従来の手順である酸化力の強いクロム酸処理では染色性が弱く判別が困難でした。今回、浜松医科大学光先端医学教育研究センター先進機器共用推進部、腫瘍病理学講座、静岡済生会総合病院病理診断科の研究グループは、比較的酸化力の弱い過ヨウ素酸処理に変えて行うことでムコール菌の染色性を増強させることを可能にしました。加えて、前処理として免疫組織化学染色で多用される熱処理を行うことで結合組織の共染が抑制され菌体の判別が容易になりました。ムコール菌に特異的とされる Rhizopus 抗体を用いての免疫染色の検出率は70%であり染色性も非常に弱いことから、この方法は大変有用であると考えます。

<研究の背景>

真菌症は抗がん剤の治療後など、免疫力の弱った時に治療に難渋することもあり、また病理解剖など死後に発見されることも珍しくありません。真菌症の正確な同定は、治療戦略や将来の予防にもつながる地味ながらも重要な作業です。深在性真菌症の4大原因真菌には、アスペルギルス・カンジダ・クリプトコッカス・ムコールがありますが、この中でもムコール菌は隔壁を持たないことを大きな特徴としています。

これら真菌などの組織内病原体を証明する半世紀以上使用されている代表的な染色法の一つにグロコット染色があります。真菌に含まれる多糖をクロム酸で酸化し、遊離したアルデヒド基にメセナミン銀を反応させて菌体を染め出すことを原理としています。ただ、真菌の種類によって検出力に差があるのではないかという問題が、現場の病理分野の検査技師や医師によって指摘されました。特に、通常のクロム酸処理というステップを含むグ

グロコット染色では隔壁を持たないムコール菌のような接合菌類では、染色不良が目立つばかりか、銀反応時間の延長が結合組織への共染過多を生じ菌体の鑑別を困難にしていました。この論文の著者らは、比較的酸化力の弱い過ヨウ素酸で酸化処理を行なったところ明瞭に染め出されることを発見し、さらに、酸化の前処理として、免疫染色の抗原賦活化法で多用される熱処理を行うことで結合組織への共染が抑制され菌体の判別が容易になりました。そこで、グロコット染色の前処理および酸化について比較し、さらに Rhizopus 抗体による免疫染色との一致率も検証することで、ムコール菌のための最適なグロコット染色の方法を検討しました。

＜研究手法・成果＞

剖検材料より形態的に診断された真菌症のムコール菌の組織マイクロアレイブロックを作製し、パラフィン切片を作製。

5%・1.0%・0.5%クロム酸、0.5%過ヨウ素酸、熱処理～0.5%過ヨウ素酸でそれぞれ前処理を行い60℃恒温槽にてメセナミン銀反応を行いました。Rhizopus 抗体による免疫染色も行い陽性率を検討しました。

菌壁が薄く隔壁を持たないムコール菌は、従来のクロム酸による酸化では他の真菌に比べてカルボキシル基にまで酸化が進みメセナミン銀との反応が不十分となり、クロム酸の濃度を低くしても反応時間を延長しても、従来のグロコット染色では検出が困難でしたが、酸化力の弱い過ヨウ素酸で酸化処理することにより菌体の検出が容易になりました。さらに熱処理を加えることで、組織タンパク質の立体構造が変化し、酸化剤の浸透性がより強化され結合組織の他、マクロファージや白血球などの血液細胞の共染が抑制され菌体の判別が容易になりました。免疫染色の検出率は70%と低く、また、陽性率の多くが弱陽性であり判定に苦慮しました。

＜今後の展開＞

半世紀以上使われている手順を、現場からの一工夫で改善できたということ、世界中のこの分野（病理組織染色は、成熟した学問分野ではありますが、分子生物学や免疫学などの発展を組み合わせながら、世界中で医療の基盤として重視されています）の同僚と情報共有し、今後病理技術教本等に載せていただくよう啓発していきたいと思っております。

＜発表雑誌＞

Bio Techniques (DOI : 10.2144/btn-2022-0063)

＜論文タイトル＞

Modification of Grocott's staining procedure with heat treatment and oxidation by periodic acid for mucormycosis in tissue : a method to detect Mucor spp

＜著者＞

Yayoi Kawabata(corresponding author), Hisaki Igarashi, Haruhiko Sugimura

＜研究グループ＞

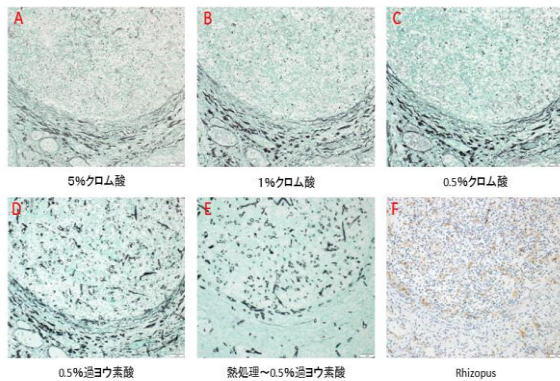
本研究は、浜松医科大学光先端医学教育研究センター先進機器共用推進部、腫瘍病理学講座、静岡済生会総合病院病理診断科との共同研究で行われたものです。本大学は医科大学として、医師や大学院生ばかりではなく、技術職員などの実務のなかでの一工夫もしっかりした科学的知見の形で発信することにも力をいれています。

＜本件に関するお問い合わせ先＞

国立大学法人 浜松医科大学 光先端医学教育研究センター
ナノスーツ開発研究部（現所属部署）
川端弥生（旧所属 浜松医科大学光先端医学教育研究センター先進機器共用推進部）
〒431-3192 浜松市東区半田山 1-20-1
Tel/Fax：053-435-2505
E-mail：if919@hama-med.ac.jp

＜参考図＞

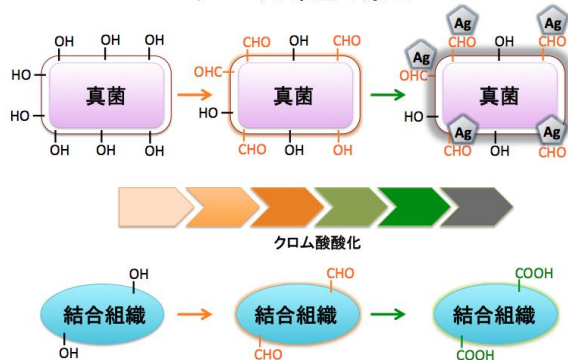
ムコール菌の染色結果



染色結果の比較

Mucor	クロム酸 (非特異的反応)	過ヨウ素酸 (非特異的反応)	熱処理～過ヨウ素酸 (非特異的反応)	Rhizopus
Case 1	± (+++)	++ (+++)	++ (-)	+
Case 2	+	++ (+++)	++ (±)	-
Case 3	± (++)	++ (+++)	++ (±)	±
Case 4	- (++)	+	+	±
Case 5	± (++)	++ (+++)	++ (-)	±
Case 6	± (++)	++ (+++)	++ (±)	-
Case 7	+	++ (+++)	++ (+)	+
Case 8	(++)	++ (+++)	++ (+)	-
Case 9	± (++)	+	++ (±)	±
Case 10	± (++)	++	++ (+)	±

グロコット染色の原理



- OH: ヒドロキシル基
- CHO: アルデヒド基 (銀反応)
- COOH: カルボキシル基