

In situでの分子生物学的方法による病原真菌の検出

誌名	日本菌学会会報 = Transactions of the Mycological Society of Japan
ISSN	00290289
著者名	村山, 琮明
発行元	日本菌学会
巻/号	53巻1号
掲載ページ	p. 3-14
発行年月	2012年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



In situ での分子生物学的方法による病原真菌の検出

村 山 琮 明

日本大学薬学部分子細胞生物学研究室, 〒274-8555 千葉県船橋市習志野台7-7-1

In situ molecular detection of pathogenic fungi

Somay Yamagata MURAYAMA

Laboratory of Molecular Cell Biology, School of Pharmacy, Nihon University
7-7-1 Narashinodai, Funabashi-shi, Chiba 274-8555, JAPAN

(Accepted for publication February 23, 2012)

Diagnosing deep-seated mycoses continues to be a major challenge for a clinician. Non-culture-dependent laboratory assays with high sensitivity and specificity are needed for rapid diagnosis of deep-seated mycoses. In the future, clinical mycology laboratories will increasingly utilize nucleic acid-based methods for the recognition of pathogenic fungi in patient specimens and the identification of fungal isolates. Over the last 20 years, increasing numbers of papers have documented many molecular biological methods feasible for the detection of fungus-specific DNA sequences in clinical specimens. Polymerase chain reaction (PCR) and internal probes are central to these procedures. More recently, a non-isotopic *in situ* technique has been applied for the detection of pathogenic fungi. These methods have the potential to improve diagnostic accuracy, thereby accelerating the administration of appropriate antifungal therapy. This article will review recent advances in *in situ* molecular diagnosis of fungal infections.

(Japanese Journal of Mycology 53: 3 - 14, 2012)

Key Words—fungal infection, *in situ* hybridization, ISH, IS-PCR, pathogenic fungi

はじめに

深在性真菌症, とくに *Candida* spp. および *Aspergillus* spp. に起因する侵襲性感染は, 好中球減少症その他のリスク因子を持つ易感染患者の病態と予後を悪化させる大きな原因となっている. 侵襲性病型の真菌症の診断は, 主として臨床診断および真菌学的検査に依存してきたが, それぞれ特異度および感度の点で限界がある. これを補助する目的で導入された診断法が, 非培養検査による血清診断と遺伝子診断である. 血清診断用の検査は, 病原真菌特異的な抗原, 抗体, 代謝物の検出を基本とし, これら検査法の幾つかはすでに製品化され, 日常検査に使用されている. しかしいずれの検査法も感度および(または)特異度に問題があり, より信頼性, 感度の高い検査法として Polymerase Chain Reaction (PCR) 法をはじめとする遺伝子診断が, 認可はされていないものの導入されつつある.

PCR 法全盛の遺伝子診断であるが, 臨床検体においては PCR 法での解析がかならずしも妥当でない検体がある. 病理切片や喀痰等の無菌とはいえない標本である. *Candida albicans* や *Malassezia furfur* のような腸管, 口腔粘膜や体表に常在する真菌種や, 腐生的に環境に存在する真菌種の存在が擬陽性を招くためである. これらの検体に遺伝子診断を応用するためには *in situ* での分子生物学的手法, *in situ* hybridization (ISH) や *in situ* PCR などの開発が望まれるが, 残念ながら真菌症の診断にこれが応用された例は少ない. この手法は組織から DNA を抽出して行う解析法に比べ, 手間のかかる検体からの DNA の精製が不要なため, 操作が容易であり, 自動化も可能である. 組織内の真菌由来の核酸の局在を直接視覚的に観察できるので, 診断とともに, 組織背景の観察による病因の解明にも有用である. われわれは, *in situ* での分子生物学的手法を用いて, 組織切片上で病原真菌を視覚的に検出する真菌症 DNA 診断法の開発に成功し

ている。まだ上市されていないが、迅速性やコストを鑑みて臨床的に満足できる程度に達してきたので紹介したい (Hanazawa et al. 2000; Shinozaki et al. 2011)。

1. *In situ* 法とは

In situ 法は、核酸が存在する生体内の原位置のままで (*in situ*)、その存在とともに形態学的に検出する方法で、通常組織切片を用いて特定の遺伝子を検出する。Fig. 1 に示すように3種類ある。組織の前処理はほとんど同じではあるが、第1に組織の上で標識したプローブを用いたハイブリダイゼーションを行う *in situ* hybridization (ISH) 法、第2は標識したヌクレオチドを用いて組織上で直接PCRを行う *in situ* PCR (IS-PCR)、primed *in situ* labeling (PRINS) あるいは direct IS-PCR と呼ばれる方法で、第3は非標識のヌクレオチドを用いたPCRを組織上で行った後で、標識したプローブを用いたハイブリダイゼーションを行う *in situ* PCR hybridization (PCR *in situ* hybridization, PCR-ISH) あるいは indirect IS-PCR と呼ばれる方法である。本論文では、ISH 法に焦点をおいて述べる。

2. ISH 法

2-1. 材料および方法

組織は、通常ホルマリンで固定されたパラフィン包埋組織 (formalin-fixed paraffin-embedded tissue, FFPET) 切片を用いるが、気管支肺胞洗浄液 (BAL)、血液培養、尿や膿瘍なども対象になる。一番問題になるのは、組織

の固定時間と固定溶液であろう。一般的に固定時間を長くしない、ピクリン酸を含む Bouin's 固定液や、水銀を含む固定液を避けることがあげられる。Gillespie ら (2002) によれば、細胞の形態維持および核酸の検出などを総合的に判断すると、アルデヒド系の固定液に較べアルコールをベースにした固定液、特に70%エタノール:100%メタノール (3:1) が優れているとしている。固定液中の組織は不安定であるが、ブロックは長期保存可能である。病理組織標本は、DNA の膨大な供給源と考えて良い。「ジュラシックパーク」のようにDNAから個体を再生することは無理であっても、その断片をとらえることができる。FFPET ではDNAの変性が起きているので、短い領域を増幅あるいは検出するようにする。Foss RD のPCR法によるRNAの検出結果を既報と比較した結果では (Foss et al. 1994)、固定液はエタノール、Omnifix (Ancon Genetics, Inc., Melville, NY, USA)、そしてホルマリンの順で増幅効率が良い結果が多く、増幅する長さは75~245 bp 位であれば結果に差は無いようだった。ただし、Nuovo (1996) は、IS-PCR法による場合は、プロテアーゼ前処理をした場合は、中性ホルマリン15時間固定の方がエタノール固定より良いと述べている。

われわれが用いている digoxigenin (DIG) 標識したプローブを用いる ISH 法は、大きく3つのステップに分けることができる (Table 1)。1) プロテアーゼなどによるプローブやプライマーを細胞へ浸透させるための前処理、2) ハイブリダイゼーション、3) 抗DIG抗体による陽性シグナルの検出である。一番問題となるのは、1) の前処理のステップで、これが成否の鍵を握っていると

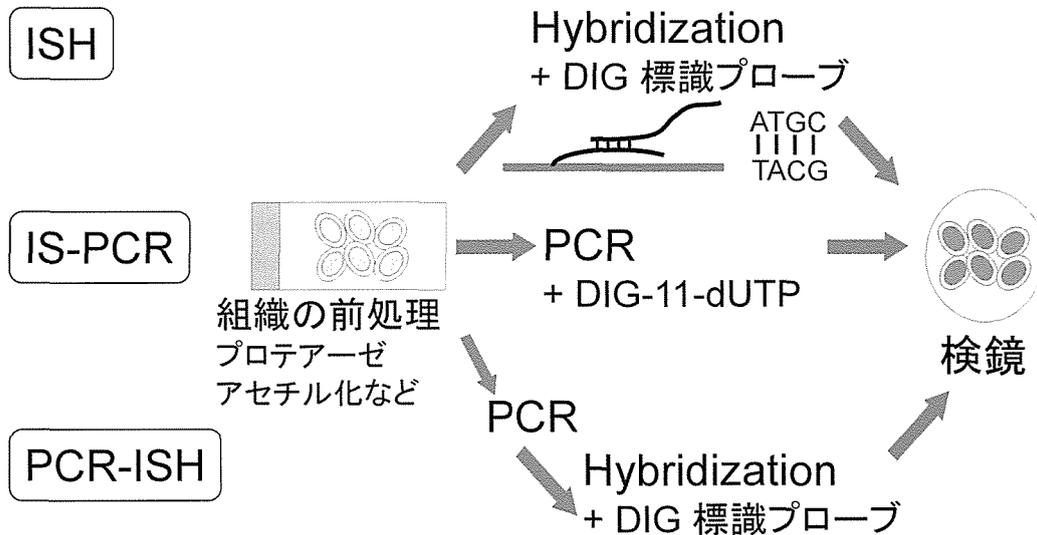


Fig. 1. 3種の *in situ* 法

いっても良い。

2-2. 組織の前処理

前処理とは、ハイブリダイゼーションの前にタンパク分解酵素 Proteinase K などを用いて、結合組織などを分解してプローブが組織に浸透しやすくするステップのことである。詳細は省くが、FFPET の場合の前処理からハイブリダイゼーション、検出までのステップを Table 1 に示した。

このステップの中では、主にプロテアーゼ処理が重要である。細胞内の DNA はヒストンのようなタンパク質によって折りたたまれている上に、ホルマリンのような固定処理により DNA にタンパク質が架橋（クロスリンク）する (Fig. 2)。この架橋が強いと DNA は変性のステップで一本鎖に離れることができない。プロテアーゼ処理の目的の一つは、このような DNA に結合したタンパク質を壊して、プローブやプライマーに結合できるようにすることである。すなわち変性処理をした際に、DNA が二本鎖から一本鎖に容易に変換できる状態にすることである。もう一つの目的は、細胞膜を穏やかに壊して、プローブや酵素などを透過させることである。しかし、プロテアーゼ処理をしすぎると、非特異的なバックグラウンドを生じる。細胞膜まで壊れてしまい、結合したプローブなどが細胞内に留まらず、漏出するためと考えられる。そのため、プロテアーゼ処理後に固定のステップを加える場合もある。また、組織によって反応時間を検討することも必要であろう。

アセチル化は酢酸あるいは無水酢酸トリエタノールアミン溶液によって行うが、組織やスライドガラスに対す

Table 1. ISH 法の概略

処理方法	時間	温度
脱パラフィン キシレン, エタノール下降系列		
H ₂ O	10min	RT
HCl	10min	RT
Proteinase K	5min	37°C
Glycine-PBS	10min	RT
CH ₃ COOH	15sec	inice
変性	10min	94°C
Prehybridization	60min	50°C
Hybridization	12-18hr	50°C
2x SSC	15min, 2回	50°C
0.2x SCC	15min, 2回	50°C
Blocking	1 hr	RT
x500 anti-DIG antibody	30min	RT
0.2% Tween 20, 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl	15min, 3回	RT
BCIP-NBT 反応	30min-14hr	37°C

るプローブの静電的な非特異結合を減少させる。アセチル化や塩酸処理により塩基性タンパクなどポジティブチャージの分子が中和されるとされている。

2-3. DNA を標的としたプローブ

ほとんどのプローブは rDNA (18S, 28S あるいは 5.8S) を標的としている。データベースのデータが多い上に、コピー数が多いからである。Table 2 に既報のプローブの標的および種類をまとめた。

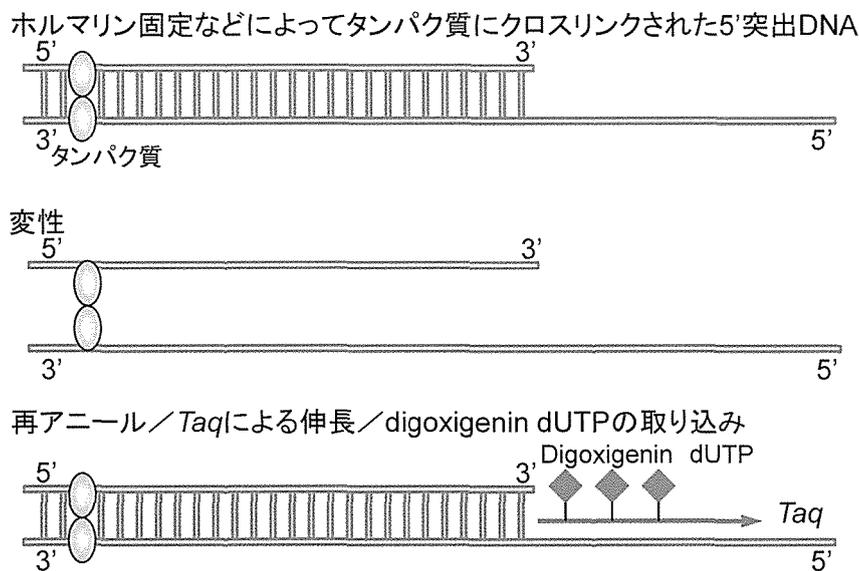


Fig. 2. 組織固定によってクロスリンクしたタンパク質による in situ 法における偽陽性反応

DNAを標的とするプローブの長さとしては300から750 bp位が組織に浸透し、かつ染色体上の塩基配列を検出するのに適当である。568 bp, 333 bp, および154 bpのプローブを用いて、*Aspergillus fumigatus*の染色体上に1コピーあるアルカリプロテアーゼ遺伝子を検出したところ、568 bpでは明瞭な発色、333 bpでもいくらか強度は落ちるが明らかな発色が認められた。ところが154 bpではほとんど反応していなかった(Hanazawa et al. 2000)。コピー数の多い遺伝子ではこの長さの問題はクリアされる部分もある。2コピーある場合は、254 bpのプローブでも問題なく陽性シグナルが得られた。

2-4. RNAを標的としたプローブの種類

RNAを標的とする場合は、短い配列をプローブとして選ぶことができる。末端を蛍光標識し直接検出するfluorescence *in situ* hybridization (FISH) も用いられる。DIGなどを標識して、一度抗DIG抗体を結合させてから検出する方法もある。病原真菌ではほとんどないが、環境中の真菌のFISHの場合注意すべきは、自己蛍光がある真菌であろう(Baschien et al. 2001)。また、蛍光標識によく使われる fluorescein isothiocyanate (FITC) は陰性に荷電しているため、好酸球を多く含む検体では、偽陽性になるので用いることができない(Mahmudi-Azer et al. 1998)。

最近のより進んだプローブとしては、peptide nucleic acid (PNA) プローブ (Fig. 3) (Wilson et al. 2005; Shepard et al. 2008) がある。DNAやRNAの主鎖は糖(デオキシリボース、もしくはリボース)がリン酸ジエステル結合を介して繋がられているのに対し、PNAの主鎖は(N-(2-アミノエチル)グリシン)がペプチド結合で繋がれている。PNAにはDNAやRNAに見られるリン酸基

による陰電荷がないため、静電反発の減少により、PNAとDNAで形成される2重鎖は、DNA/DNAの2重鎖よりもきわめて強い。

さらに locked nucleic acid (LNA) プローブも開発された。LNAとは、リボ核酸の2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋した2つの環状構造を持つ人工核酸 (Fig. 3) である。

PNAやLNAの特徴は通常のDNAやRNAプローブに較べ、以下の4つがあげられる。

- 1) 相補鎖のDNA/RNAに対する親和性が高く、熱安定性が高い。融解温度が高い。
- 2) 配列特異性が高く、1塩基のミスマッチでも検出できる。LNAでは完全に相補的な配列と1塩基のミスマッチ配列では融解温度の差が26℃にもなり、高感度に1塩基変異が検出できる (Petersen et al. 2002)。
- 3) 核酸分解酵素 (exonuclease, endonuclease) に対して安定で、分解されにくい。取扱い易く、長期安定である。
- 4) セルファニーリングによるプローブ内の2次構造形成が起こらない。

2-5. プローブの特異性

同じ hybridization 法でも、チューブやメンブレン上の状態とはかなり異なる。反応性が悪いのである。われわれは (Hanazawa et al. 2000)、*A. fumigatus* のアルカリプロテアーゼの一部を標的とした569 bpのプローブ (ALP) を作成した。*A. fumigatus* の患者組織のISHの強拡大像を Fig. 4 に示したが、Grocott 染色と同様、真菌要素に沿って陽性シグナルが明らかに認められる。ALPは、*A. flavus* の同部位とは76.9%、*A. niger* のとは

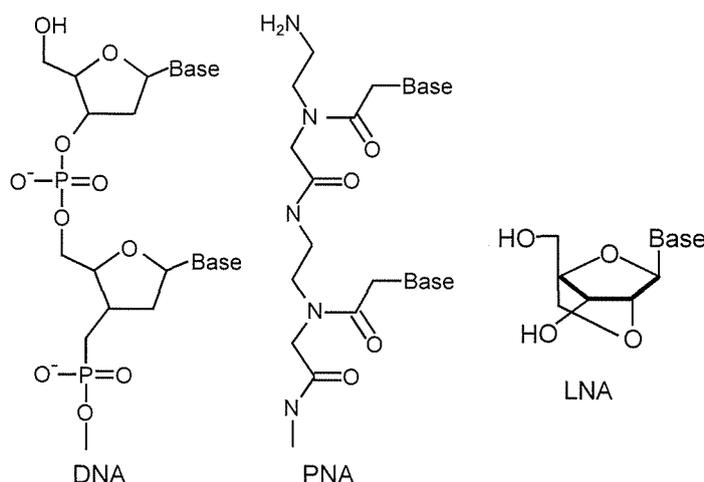


Fig. 3. DNA, PNA, および LNA の構造

Table 2. 病原真菌を標的にした既報のISH法

論文	検出菌種 (属)	標的	方法	プローブ (配列, 長さ, キットなど)	参考文献
Shinozaki et al. 2011	<i>Fusarium</i> spp. Panfungal	28S rRNA 28S rRNA	PNA PNA	GATGATCAACCAAGCCCA TACTTGTGCGCTATCGGT	
Montone et al. 2011	Dematiaceous fungi <i>Alternaria</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Scedosporium</i> spp. を含む	28S rRNA	ISH	GCTATGACGTCTCCCTATATGGC	
Montone et al. 2010	<i>Coccidioides immitis</i> <i>Coccidioides posadasii</i> Panfungal	5.8S rRNA 18S rRNA	LNA LNA	CTCTTTTTTTTATTATATCC CCGATCCCTAGTCGGCATAG	Hayden et al. 2003
Wang et al. 2010	<i>Candida albicans</i> All species of yeast	18S rRNA 18S rRNA	FISH FISH	GCCAAGGCTTATACTCGCT CTCTGGCTCACCTATTTC	Kempf et al. 2000
Martin et al. 2010	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus gattii</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus gattii</i> Universal for eukaryotic organisms	26S rRNA 26S rRNA 26S rRNA 18S rRNA	FISH FISH FISH FISH	CCAGCCCTTATCCACCGA GTCCGGTACTTGGGAGT GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann et al. 1990
Lantz et al. 2010	<i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i>	18S rRNA	FISH	GCCAAGGCTTATACTCGCT	Kempf et al. 2000
Montone et al. 2009	<i>Aspergillus</i> spp.	18S rRNA	LNA	GCGGGTCATCATAGAACACCGC	Park et al. 1997
Montone 2009	<i>Fusarium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	28S rRNA 28S rRNA	LNA LNA	CACCGCATCAAAGTCATC CACCGCATCAAATCATC	Hayden et al. 2003, Park et al. 1997 Hayden et al. 2003, Park et al. 1997
Myoken et al. 2008	<i>Aspergillus</i> spp.	alkaline proteinase	ISH	583 bp	Hanazawa et al. 2000
Xuire et al. 2006	<i>Pichia anomala</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26S rRNA 26S rRNA	FISH FISH	GACAGGCAATATCAGCAGA TGACTTACGTCCGAGTCC	
Peters et al. 2006	<i>Candida krusei</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida parapsilosis</i> Eubacteria Pan-yeast	18S rRNA 18S rRNA 26S rRNA 26S rRNA 18S rRNA 18S rRNA 16S rRNA 26S rRNA	FISH FISH FISH FISH FISH FISH FISH FISH	GATTCTCGGCCCATGGG GCCAAGGCTTATACTCGCT) CCGCCAAGCCACAAGGACT CCTGGTTCGCCAAAAAGGC)	Kempf et al. 2000 Kempf et al. 2000 Kempf et al. 2000 Kempf et al. 2000 Amann et al. 1990
Abbott et al. 2006	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Coccidioides immitis</i>		ISH ISH ISH ISH		Hayden et al. 2001
Teertstra et al. 2004	Eucarya <i>Schizophyllum commune</i>	18S rRNA Sc3 protein 18S rRNA	PNA PNA FISH	ACCAGACTTGCCTC TCCGACACCGATGA TATACGCTATTGGAGCTGGAATTAC CGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGC	Perry-O'Keefe et al. 2001 Chartrand et al. 2000
Hayden et al. 2003	<i>Fusarium</i> sp <i>Pseudallescheria boydii</i> <i>Aspergillus</i> sp. Panfungal	28S rRNA 18S rRNA 18S rRNA 5S rRNA 5S rRNA 18S rRNA	ISH ISH ISH ISH ISH ISH	CACCGCATCAAAG(A)TCATC AGT(C)CTTTATCCCCCGG(G)GAA CGGAAGACAAGACTTTCG CCCGGCTGGATCAGTGCACC TCCACACCTATGCTGATATGT GTACGGCTGAGCGGACGGGAA CCGATCCCTAGTCGGCATAG	Hayden et al. 2002 Hayden et al. 2002 Hayden et al. 2001
Rigby et al. 2002	<i>Candida albicans</i>	26S rRNA	PNA	AGAGAGCAGCATGCA	
Hayden et al. 2002	<i>Candida</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Mucor</i> , <i>Rhizomucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Saksenaea</i> <i>Absidia</i> <i>Cunninghamella</i> <i>Apophysomyces</i> Panfungal	18S rRNA 28S rRNA 5S rRNA 5S rRNA 18S rRNA 18S rRNA 18S rRNA 18S rRNA 18S rRNA	ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH	CCCCCTTCTAAACCAATCCGGA TCCACACCTATGCTGATATGT GTACGGCTGAGCGGACGGGAA TCAATGAAGACAGGCGCAC ACCTGACCAAAGGTCAGGC TGGCTAGACGAATCTAGAAAC GTTCGAGTAAGCCATAGAGCAAA CGGATCCCTAGTCGGCATAG	Lischewski et al. 1997 Hayden et al. 2002 Hayden et al. 2002 Hayden et al. 2001
Hayden et al. 2001	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Sporothrix schenckii</i> <i>Sporothrix schenckii</i> Panfungal	18S rRNA 28S rRNA 18S rRNA 28S rRNA 18S rRNA 28S rRNA 18S rRNA 18S rRNA 18S rRNA 18S rRNA	ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH	CGACAGCGGGTTCGGCT CCCGCGCGGGGATG GCAAACCGAGCGGGCT CCCGCGGTGGGGAGTG CGACCCAGTCAGATTGACGTGGG ACACCCAGCAACTGGTGAACCAATAGA GAACGGGTATTCAAAGTTCGCCGT TAACCAACCGCCAGAAGTATG CGCGTCCCAAAGCAACGC GTGTCCCGGAGGCGCAA CCGATCCCTAGTCGGCATAG	Hayden et al. 2001
Perry-O'Keefe et al. 2001	Eucarya <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen	18S rRNA	PNA PNA	ACCAGACTTGCCTC TTACCGAGGCAAGCT	Amann et al. 1990
Oliveira et al. 2001	<i>Candida albicans</i> <i>Candida dubliniensis</i>	26S rRNA 18S rRNA	PNA PNA	ACAGCAGAAGCCGTG TAGCCAGAAGAAAGG	
Jensen et al. 2001	<i>Pneumocystis jirovecii</i> All eukaryotic organism	18S rRNA 18S rRNA	FISH FISH	GGTAATCCAGGAGGGAAGG ACCAGACTTGCCTCC	Amann et al. 1990
Kempf et al. 2000	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida parapsilosis</i> All yeasts	18S rRNA 18S rRNA 18S rRNA 18S rRNA 18S rRNA	FISH FISH FISH FISH FISH	GCCAAGGCTTATACTCGCT CCGCCAAGCCACAAGGACT GATTCTCGGCCCATGGG CCTGGTTCGCCAAAAAGGC CTCTGGCTTACCTATTTC	
Hanazawa et al. 2000	<i>Aspergillus</i> spp	alkaline proteinase	ISH	569 bp	
Kobayashi et al. 1999	<i>Aspergillus fumigatus</i>	18S rRNA	ISH	385 bp	
De Brito et al. 1999	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	18S rRNA	ISH	ACTCCCCGTGGTC	
Sterflinger et al. 1998	病原性黒色真菌	18S rRNA	PCR-ISH	ACCTGGTGTATCTGCGCAG	
Lischewski et al. 1997	<i>Candida parapsilosis</i>	18S rRNA	ISH	CCCCCTTCTAAACCAATCCGGA	
Park et al. 1997	<i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i>	5S rRNA 5S rRNA 18S rRNA 5S rRNA	ISH ISH ISH ISH	TCCACACCTATGGTCTGATGT GTACGGCTGAGCGGACGGGAA GCGGGTCATCATAGAACACCGC TCTCTGAGGTATGGCCGTAAC	Mntone et al. 1994
Lischewski et al. 1996	<i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i> All eukaryotic organism	18S rRNA 18S rRNA	ISH FISH	CCCCCTTCTAAACCAATCCGGA ACCAGACTTGCCTCC	Amann et al. 1990
Kobayashi et al. 1996	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	5S rRNA	ISH	120 bp	
Montone et al. 1995	<i>Aspergillus</i> spp.	5S rRNA	ISH	TCCACACCTATGGTCTGATGT	Chen et al. 1984
Tsongalis et al. 1994	<i>Pneumocystis jirovecii</i>		IS-PCR	378 bp	Lipschik et al. 1992
Montone 1994	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Pneumocystis jirovecii</i>	5S rRNA 18S rRNA	ISH ISH	TCCACACCTATGGTCTGATGT	Chen et al. 1984
Hayashi et al. 1990	<i>Pneumocystis jirovecii</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i>	5S rRNA 5S rRNA 18S rRNA	ISH ISH ISH	GGGATACGGTATATTCTGAGGT CCATATGGTACCACATATAGT GGTAATCCAGGAGGGAAGGATCAGT	

ヒトの *Pneumocystis* 症は 2002 年より、*Pneumocystis carinii* から *Pneumocystis jirovecii* が起病菌とされ改名されたので従った。参考文献は原論文で引用されていたものである。
¹ sea FAST Sepsis Kit (SeaPro International B.V., Lelystad, the Netherlands)

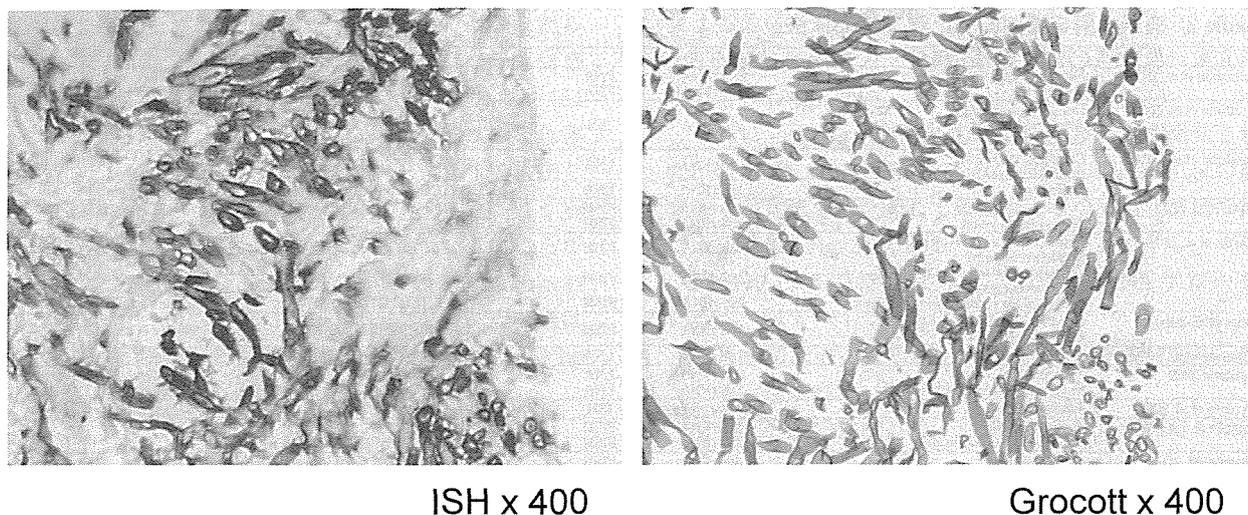


Fig. 4. 臨床患者組織における *Aspergillus* 属を標的にした ISH 法とグロコット染色



A. fumigatus 感染 ラット肺 3.3x20 *A. flavus* 感染 マウス腎 3.3x20 *A. niger* 感染 マウス腎 3.3x20
 Fig. 5. *Aspergillus* 属感染動物組織の ALP プローブ (569 bp) を用いた ISH 像

65.9% の相同性であるが、*A. niger* との反応性は、検出はできるが弱い (Fig. 5)。

遺伝子のデータベースが驚異的な勢いで増えている現在、プローブのデザインは昔ほど困難を覚えないが、それでも実用化に耐えるだけの特異性や感度をもったプローブの開発は、いまだに問題である。次のようなデータベースもあるので参照されたい。現在までに論文化された rRNA を標的にしたオリゴプローブについて、ウイーン大学で作成した probeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>) というデータベース (Loy et al. 2007) である。マイクロアレイと FISH のプローブであるが、FISH 用の真菌プローブは 23 種が登録されている。Table 2 に病原真菌用のプローブは、ほとんど網羅したが、環境真菌についても幾つか含まれている。

rRNA の配列については、リボソーム遺伝子の配列のデータベース RDP II, Greengenes, SILVA, and FGPR などから、提供を受けているとのことであり、自分で作成したプローブもチェックできる (probeCheck, Loy et al. 2008)。

2-6. 陽性発色の増強

標的が少ない場合、catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH といわれる方法が開発されている。プローブは FITC などの蛍光の代わりに horseradish-peroxidase (HRP) で標識し、HRP がリポーター (Tyramide-Cy3) を沈着させる Tyramide Signal Amplification (TSA) 反応により可視化する。通常の FISH の 20-30 倍の感度を示す。これを 2 回繰り返す two-pass Catalyzed re-

ホルマリンなどの固定によりタンパク質がクロスリンクされ、5'側が突出している

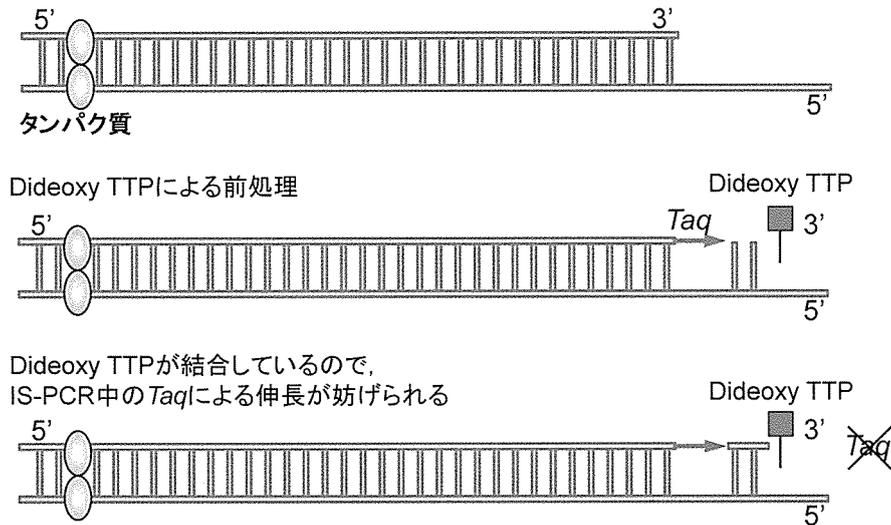


Fig. 6. IS-PCR法における dideoxy TTP (ddTTP) を用いた、偽陽性反応の抑制の模式図

porter deposition (CARD)-FISH では 400 倍近いシグナルの増幅が認められるという (Pernthaler et al. 2002).

3. IS-PCR 法

IS-PCR 法は、digoxigenin などで標識したヌクレオチドを直接 PCR 産物に取り込ませ、IS-PCR 後すぐに免疫組織化学的に標的を検出することが可能になる。次に示す PCR-ISH 法と比べ、ISH のステップを省くことができるので、手間と時間を少なくすることができる。しかし、われわれの結果では、IS-PCR 法では無視できない偽陽性に近い所見や陽性シグナルの浸漏が得られた。これは Taq DNA polymerase の DNA 修復機能による、標識されたヌクレオチドの非特異的な染色体 DNA への組込みもその原因の一つと考えられる (Fig. 2)。すなわち DNA の損傷が多い検体ほど偽陽性の危険性が高まる。これを防ぐために、IS-PCR 法では ddTTP を用いてあらかじめ DNA ポリメラーゼでニックあるいはギャップを埋めておく操作が前処理として必要になる (Fig. 6)。

PCR-ISH は PCR の持つ高い感度と ISH 法の特徴を兼ね備えた、新しい分子病理学的解析法である。single copy をも検出できるとされ、DNA の再構成、染色体の転座あるいは点突然変異なども検出できると考えられている。ウイルスの核酸の検出などによく用いられている。組織切片においては PCR の効率が悪いので、プライマー対 (multiple primer pair) を数種用いて細胞内の標的 DNA を増幅させ、プローブも数種を混合させた oligonucleotide probe

cocktail による ISH で検出する方法も使われている。

4. まとめ

4-1. IS 法の長所と短所

長所を以下にあげる。

- 1) 種々の組織材料に応用できる (パラフィン切片、染色切片、マイクロダイセクション)。
- 2) 塩基配列が知られている遺伝子であれば標的になる。
- 3) 後ろ向き研究として多くの標本を用いることができる。
- 4) 組織学的染色法に較べると特異度が高い。通常の染色法と比較して、属あるいは種レベルの同定ができる。
- 5) 特異抗体より簡便にプローブやプライマーを作製できる。

短所としては、Grocott 染色や PAS 染色に較べて必ずしも感度が良くない。Grocott 染色は、真菌に含まれる多糖類をクロム酸で酸化させると、遊離アルデヒド基ができ、これをメセナミン銀で染め出す方法である。おそらく細胞壁の多糖類の方が核酸より保存性が良いためであろう。

しかし通常のチューブで行う PCR 法と較べると、in situ では、核酸が組織内で固定されているため、プローブや amplicon (増幅産物) が重なりあって、scaffolding (足場) の形成が見られ、核酸を抽出する方法に比べて、感度が良い場合がある (Fig. 7)。チューブ内の PCR 法では、

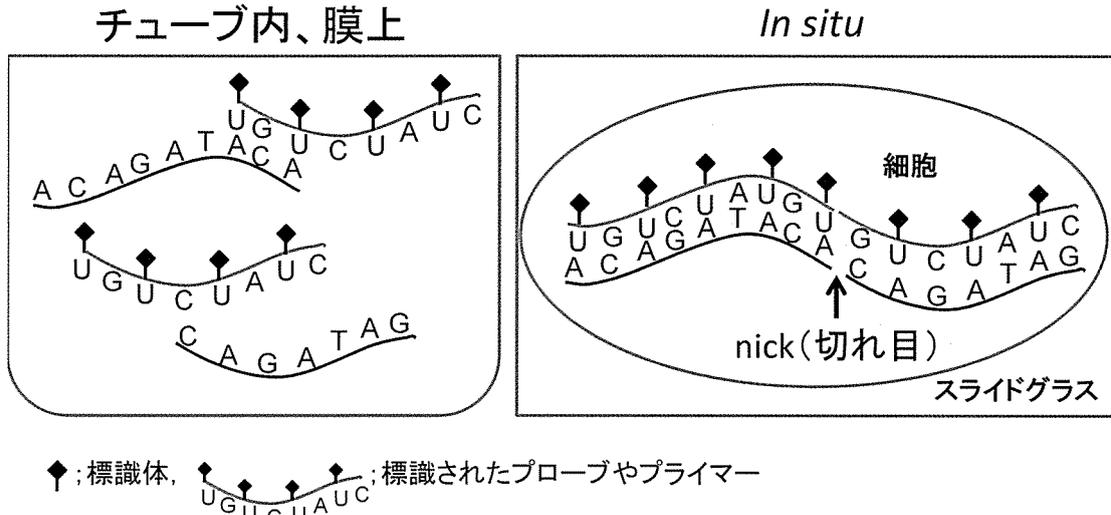


Fig. 7. *In situ* 法でみられる scaffolding(足場) の形成
In situ 法では、核酸が組織内で固定されているためプローブや amplicon が重なりあって、核酸を抽出する方法に比べて感度が良い場合がある。

DNA は抽出に伴いさらにニック (切れ目) が入ったり、さらに断片化したりする。そのようにばらばらになった状態ではプライマーやプローブはその一部がアニールするか、あるいはまったくアニールできない状態になる。*In situ* 法では、ニックが入っていても抽出操作を伴わないため一応標的 DNA は形を保っていて、そこにプローブやプライマーが結合することができる。われわれの経験でも、PCR では検出できず、ISH 法で検出できた例は多い。

4-2. 販売されているプローブ、キット

米国では、上市するのに必要なアメリカ食品医薬品局 (FDA) の安全性・有効性を証明する申請書 (510 (k)) の承認が下りている PNA FISH^{Flow} kit (AdvanDx, Woburn, MA, <http://www.advandx.com/>) がある。これは、“*C. albicans* and/or *C. parapsilosis*”, “*C. tropicalis*”, “*C. glabrata* and/or *C. krusei*”, “*C. dubliniensis*”, “*C. parapsilosis*” のプローブあるいは 90 分ほどで判定できるキットを用いて、培養菌体や血液中の菌を同定する系である (Ghera et al. 2008; Trnovsky et al. 2008; Bishop et al. 2008; Torner et al. 2007; Shepard et al. 2007; Reller et al. 2007; Wilson et al. 2005; Sogaard et al. 2005)。 *C. albicans* と non-*albicans* を区別して、アゾール系薬剤に耐性の *C. glabrata* と *C. krusei* であれば薬価の高いキャンディン系抗真菌剤であるカスポファンギンを用い、 *C. albicans* であれば薬価の安いフルコナゾールなどのアゾール系薬剤を用いるためである。皆保険ではない米国では重要な問題で、一患者あたり、1,729 ドルあるいは 1,837 ドルも

節約できるので、一検体あたり通常の同定法で 2.83 ドルのところが PNA-FISH 法で 82.72 ドルかかるとしても迅速性のため社会的経済コストに見合うとしている (Alexander et al. 2006; Forrest et al. 2006)。残念ながら組織切片において応用された例はまだ報告されていない。

その他にオランダの seaFAST Sepsis Kit (SeaPro International B.V., Lelystad, the Netherlands) を用いた汎真菌、 *C. dubliniensis* あるいは *C. tropicalis* の検出例が報告されている (Peters et al. 2006)。

4-3. ISH の精度管理

実用化には、プローブやプライマーの精度管理が問題になるが本邦では規定はない。米国の Food and Drug Administration (FDA) は、1998 年に免疫組織化学 (immunohistochemistry, IHC) の精度管理のガイダンス 2 つと Points to Consider を出していたが、やっと 2005 年になって自動 FISH システムについてのガイダンスが出された (U.S. Department 2005)。法律的な決まりに関する注意がほとんどであるが、偽陽性の問題、再現性の問題などにも触れている。

おそらく一番大事な点は以下の 2 つだと思われる。第一に組織の選択、固定、ISH の操作には特別の研修が必要。特に組織の前処理には注意を要する。第二に結果の解釈は他の形態学的、組織病理学的基準のコンテキストの中で責任のある病理医が最終的には判断することである。この第一の点については、キット化、自動化などにより、対応することが可能である。

最後に本方法が本邦でも広く標準的な方法として使用

され、臨床的に実用化することを望む。

摘 要

深在性真菌症は多彩な病像を示す上に、従来の方法では診断が困難なことが多く、より確実な早期診断法の確立が望まれている。著者等は組織内真菌の局在と同定を可能にする *in situ* での分子生物学的手法を用いた病理組織切片上での病原真菌の特異的検出法を開発してきた。本報は、*in situ* での分子生物学的手法、すなわち *in situ* hybridization 法あるいは *in situ* PCR 法について概説し、本法を用いた既報の病原真菌の検出についてまとめた。

引用文献

- Abbott JJ, Hamacher KL, Ahmed I (2006) *In situ* hybridization in cutaneous deep fungal infections: a valuable diagnostic adjunct to fungal morphology and tissue cultures. *J Cutan Pathol* 33: 426 – 432
- Alexander BD, Ashley ED, Reller LB, Reed SD (2006) Cost savings with implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54: 277 – 282
- Amann RI, Krumholz L, Stahl DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 172: 762 – 770
- Baschien C, Manz W, Neu TR, Marvanova L, Szewzyk U (2008) *In situ* detection of freshwater fungi in an alpine stream by new taxon-specific fluorescence *in situ* hybridization probes. *Appl Environ Microbiol* 74: 6427 – 6436
- Bishop JA, Chase N, Magill SS, Kurtzman CP, Fiandaca MJ, Merz WG (2008) *Candida bracarensis* detected among isolates of *Candida glabrata* by peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization: susceptibility data and documentation of presumed infection. *J Clin Microbiol* 46: 443 – 446
- Chartrand P, Bertrand E, Singer RH, Long RM (2000) Sensitive and high-resolution detection of RNA *in situ*. *Methods Enzymol* 318: 493 – 506
- Chen MW, Anne J, Volckaert G, Huysmans E, Vandenberghe A, De Wachter R (1984) The nucleotide sequences of the 5 S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. *Nucleic Acids Res* 12: 4881 – 4892
- De Brito T, Sandhu GS, Kline BC, Aleff RA, Sandoval MP, Santos RT, Brandao AA, Lacaz CS (1999) *In situ* hybridization in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 37: 207 – 211
- Forrest GN, Mankes K, Jabra-Rizk MA, Weekes E, Johnson JK, Lincalis DP, Venezia RA (2006) Peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *J Clin Microbiol* 44: 3381 – 3383
- Foss RD, Guha-Thakurta N, Conran RM, Gutman P (1994) Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls. *Diagn Mol Pathol* 3: 148 – 155
- Ghera M, Merz WG (2009) Identification of *Candida albicans* and *Candida glabrata* within 1.5 hours directly from positive blood culture bottles with a shortened peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization protocol. *J Clin Microbiol* 47: 247 – 248
- Gillespie JW, Best CJ, Bichsel VE, Cole KA, Greenhut SF, Hewitt SM, Ahram M, Gathright YB, Merino MJ, Strausberg RL, Epstein JI, Hamilton SR, Gannot G, Baibakova GV, Calvert VS, Flaig MJ, Chuaqui RF, Herring JC, Pfeifer J, Petricoin EF, Linehan WM, Duray PH, Bova GS, Emmert-Buck MR (2002) Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *Am J Pathol* 160: 449 – 457
- Hanazawa R, Murayama SY, Yamaguchi H (2000) In-situ detection of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 49: 285 – 290
- Hayashi Y, Watanabe J, Nakata K, Fukayama M, Ikeda H (1990) A novel diagnostic method of *Pneumocystis carinii*. *In situ* hybridization of ribosomal ribonucleic acid with biotinylated oligonucleotide probes. *Lab Invest* 63: 576 – 580
- Hayden RT, Isotalo PA, Parrett T, Wolk DM, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV (2003) *In situ* hybridization for the differentiation of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Pseudallescheria* species in tissue section. *Diagn Mol Pathol* 12: 21 – 26
- Hayden RT, Qian X, Procop GW, Roberts GD, Lloyd RV (2002) *In situ* hybridization for the identification of filamentous fungi in tissue section. *Diagn Mol Pathol*

- 11: 119 – 126
- Hayden RT, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV (2001) *In situ* hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. *Diagn Mol Pathol* 10: 15 – 23
- Jensen TK, Boye M, Bille-Hansen V (2001) Application of fluorescent *in situ* hybridization for specific diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in foals and pigs. *Vet Pathol* 38: 269 – 274
- Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB (2000) Fluorescent *In situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 38: 830 – 838
- Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB (2000) Rapid identification of pathogens in blood. *Ann Intern Med* 132: 330 – 331
- Kobayashi M, Sonobe H, Ikezoe T, Hakoda E, Ohtsuki Y, Taguchi H (1999) *In situ* detection of *Aspergillus* 18S ribosomal RNA in invasive pulmonary aspergillosis. *Intern Med* 38: 563 – 569
- Kobayashi M, Urata T, Ikezoe T, Hakoda E, Uemura Y, Sonobe H, Ohtsuki Y, Manabe T, Miyagi S, Miyoshi I (1996) Simple detection of the 5 S ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* using *in situ* hybridisation. *J Clin Pathol* 49: 712 – 716
- Lantz AW, Bisha B, Tong MY, Nelson RE, Brehm-Stecher BF, Armstrong DW (2010) Rapid identification of *Candida albicans* in blood by combined capillary electrophoresis and fluorescence *in situ* hybridization. *Electrophoresis* 31: 2849 – 2853
- Lipschik GY, Gill VJ, Lundgren JD, Andrawis VA, Nelson NA, Nielsen JO, Ognibene FP, Kovacs JA (1992) Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. *Lancet* 340: 203 – 206
- Lischewski A, Amann RI, Harmsen D, Merkert H, Hacker J, Morschhauser J (1996) Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent *in situ* hybridization with an 18S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Microbiology* 142 (Pt 10): 2731 – 2740
- Lischewski A, Kretschmar M, Hof H, Amann R, Hacker J, Morschhauser J (1997) Detection and identification of *Candida* species in experimentally infected tissue and human blood by rRNA-specific fluorescent *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol* 35: 2943 – 2948
- Loy A, Arnold R, Tischler P, Rattei T, Wagner M, Horn M (2008) probeCheck—a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. *Environ Microbiol* 10: 2894 – 2898
- Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M (2007) probeBase—an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res* 35: D800 – 804
- Mahmudi-Azer S, Lacy P, Bablitz B, Moqbel R (1998) Inhibition of nonspecific binding of fluorescent-labelled antibodies to human eosinophils. *J Immunol Methods* 217: 113 – 119
- Martins ML, Ferreira AS, Sampaio A, Vieira R, Inacio J (2010) Direct and specific identification of *Cryptococcus neoformans* in biological samples using fluorescently labelled DNA probes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 571 – 576
- Montone KT (1994) *In situ* hybridization for ribosomal RNA sequences: a rapid sensitive method for diagnosis of infectious pathogens in anatomic pathology substrates. *Acta Histochem Cytochem* 27: 601 – 606
- Montone KT (2009) Differentiation of *Fusarium* from *Aspergillus* species by colorimetric *in situ* hybridization in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using dual fluorogenic-labeled LNA probes. *Am J Clin Pathol* 132: 866 – 870
- Montone KT, Feldman MD (2009) *In situ* detection of aspergillus 18 S ribosomal RNA Sequences using a terminally biotinylated locked nucleic acid (LNA) probe. *Diagn Mol Pathol* 18: 239 – 242
- Montone KT, Litzky LA (1995) Rapid method for detection of *Aspergillus* 5 S ribosomal RNA using a genus-specific oligonucleotide probe. *Am J Clin Pathol* 103: 48 – 51
- Montone KT, Litzky LA, Feldman MD, Peterman H, Mathis B, Baliff J, Kaiser LR, Kucharczuk J, Nachamkin I (2010) *In situ* hybridization for *Coccidioides immitis* 5.8S ribosomal RNA sequences in formalin-fixed, paraffin-embedded pulmonary specimens using a locked nucleic acid probe: a rapid means for identification in tissue sections. *Diagn Mol Pathol* 19: 99 – 104
- Montone KT, Livolsi VA, Lanza DC, Feldman MD, Kennedy DW, Palmer J, Chiu AG, Nachamkin I (2011) Rapid *In-situ* hybridization for dematiaceous fungi using a broad-spectrum oligonucleotide DNA probe. *Diagn Mol Pathol* 20: 180 – 183
- Myoken Y, Sugata T, Mikami Y, Murayama SY, Fujita Y (2008) Identification of *Aspergillus* species in oral tis-

- sue samples of patients with hematologic malignancies by *in situ* hybridization: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 1905 – 1912
- Nuovo G (1997) PCR *in situ* hybridization: protocols and applications, Third edn. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia
- Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ, Stender H (2001) Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 39: 4138 – 4141
- Park CS, Kim J, Montone KT (1997) Detection of *Aspergillus* ribosomal RNA using biotinylated oligonucleotide probes. *Diagn Mol Pathol* 6: 255 – 260
- Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R (2002) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68: 3094 – 3101
- Perry-O'Keefe H, Stender H, Broomer S, Oliveira K, Coull J, Hyldig-Nielsen JJ (2001) Filter-based PNA *in situ* hybridization for rapid detection, identification and enumeration of specific micro-organisms. *J Appl Microbiol* 90: 180 – 189
- Peters RP, van Aghtmael MA, Simoons-Smit AM, Danner SA, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH (2006) Rapid identification of pathogens in blood cultures with a modified fluorescence *in situ* hybridization assay. *J Clin Microbiol* 44: 4186 – 4188
- Petersen M, Bondensgaard K, Wengel J, Jacobsen JP (2002) Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA:RNA hybrids. *J Am Chem Soc* 124: 5974 – 5982
- Reller ME, Mallonee AB, Kwiatkowski NP, Merz WG (2007) Use of peptide nucleic acid-fluorescence *in situ* hybridization for definitive, rapid identification of five common *Candida* species. *J Clin Microbiol* 45: 3802 – 3803
- Rigby S, Procop GW, Haase G, Wilson D, Hall G, Kurtzman C, Oliveira K, Von Oy S, Hyldig-Nielsen JJ, Coull J, Stender H (2002) Fluorescence *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 40: 2182 – 2186
- Shepard JR, Addison RM, Alexander BD, Della-Latta P, Gherna M, Haase G, Hall G, Johnson JK, Merz WG, Pelotroche-Llacsahuanga H, Stender H, Venezia RA, Wilson D, Procop GW, Wu F, Fiandaca MJ (2008) Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 46: 50 – 55
- Shinozaki M, Okubo Y, Nakayama H, Mitsuda A, Ide T, Yamagata Murayama S, Shibuya K (2009) Application of *in situ* hybridization to tissue sections for identification of molds causing invasive fungal infection. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 50: 75 – 83
- Sogaard M, Stender H, Schonheyder HC (2005) Direct identification of major blood culture pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, by a panel of fluorescence *in situ* hybridization assays using peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 43: 1947 – 1949
- Sterflinger K, Krumbein WE, Schwiertz A (1998) A protocol for PCR *in situ* hybridization of hyphomycetes. *Int Microbiol* 1: 217 – 220
- Teertstra WR, Lugones LG, Wosten HA (2004) *In situ* hybridisation in filamentous fungi using peptide nucleic acid probes. *Fungal Genet Biol* 41: 1099 – 1103
- Torner N (2007) Test finds infections faster, cuts stays. *Mater Manag Health Care* 16: 36 – 38
- Trnovsky J, Merz W, Della-Latta P, Wu F, Arendrup MC, Stender H (2008) Rapid and accurate identification of *Candida albicans* isolates by use of PNA FISHFlow. *J Clin Microbiol* 46: 1537 – 1540
- Tsongalis GJ, McPhail AH, Lodge-Rigal RD, Chapman JF, Silverman LM (1994) Localized *in situ* amplification (LISA): a novel approach to *in situ* PCR. *Clin Chem* 40: 381 – 384
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health (2005) Guidance for Industry and FDA Staff - Class II Special Controls Guidance Document: Automated fluorescence *in situ* hybridization (FISH) enumeration systems. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm077912.htm>
- Wang P (2011) Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-*C. albicans* directly in a variety of clinical specimens using fluorescent *in situ* hybridisation. *Mycoses* 54: 331 – 336
- Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, Reller LB, Roberts GD,

Hall GS, Alexander BD, Procop GW (2005) Multi-center evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. J Clin Microbiol 43: 2909 – 2912

Xufre A, Albergaria H, Inacio J, Spencer-Martins I, Gírio F (2006) Application of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. Int J Food Microbiol 108: 376 – 384