

1

病理学的診断法

はじめに

感染症はその種類が数え切れないほど多く、世界的見地からすると、ヒトの疾患のなかで最も重要な位置を占めるといっても過言でない。病理学的に組織所見ないし細胞所見を検討するチャンスは、どの病原体についてもありうるし、しかも、正確な病理診断が適切な治療に直結するので、病理医はそれぞれの感染症の病理形態像および病原体の証明方法に精通している必要がある。

とはいうものの、それらはあまりにも多様であり、また、臨床所見、血清学的所見や培養結果抜きには、正確な診断に到達できない場合も少なくない。さらに、わが国では典型的な症例にめぐりあうチャンスが多くないことも、診断の難しさを助長している。

解説に用いる主な特殊技法を以下に列記しておく。

- 1) 特殊染色：PAS, Grocott, Gram, Methylene blue, Giemsa, Warthin-Starry, Ziehl-Neelsen (Fite 変法)
- 2) スタンプ・スメア細胞標本：HE, Papanicolaou, Giemsa, PAS
- 3) 電子顕微鏡：通常の鉛・ウラニウム二重染色(一部はパラフィン切片を使用)
- 4) 酵素抗体法(間接法, DAB 発色, メチル緑核染)
 - a) 市販抗体(ポリクローナル, モノクローナル)
 - b) 患者血清(100~1,000 倍希釈したヒト血清を一次抗体に使用, 二次抗体は HRP 標識抗ヒト IgG)
 - c) 免疫電顕(pre-embedding 法)：主にパラフィン切片を使用
- 5) non-isotopic *in situ* hybridization 法(HRP あるいは ALP 発色)

I. 患者血清を利用したパラフィン切片内の病原体抗原の証明—酵素抗体法間接法—

1. 原理

感染症回復期の患者血清中には、病原体に特異的に反応する IgG が大量に含まれていることが容易に想像される。ことに、膿瘍や肉芽腫の形成といった病変の病理形態所見、すなわち、宿主の炎症反応が顕微鏡的に確認された場合は、患者血清中には高タイトーの抗体価が存在すると断定してほぼさしつかえない。患者血清中に含まれるこの特異的 IgG を利用して酵素抗体法染色を行うと、病原体に一致するきれいな陽性所見が、通常ホルマリン固定パラフィン

切片で得られるのである。通常、患者血清は、100 ないし 1,000 倍程度の希釈が可能である。二次抗体には、HRP 標識抗ヒト IgG (市販品, 50 ないし 200 倍希釈) を用いる。内因性ペルオキシダーゼ活性は、定法どおり、メタノール・過酸化水素液で阻害しておく。

染色方法としては、間接法, DAB 発色の組合せがよい。PAP 法や ABC 法といったより感度の高い方法を用いると、パラフィン切片内の内在性 IgG が陽性を呈してしまうため、特異的な染色が得られにくくなる。間接法に用いる HRP 標識二次抗体で証明される内在性 IgG は、一部の形質細胞のみであり、背景染色はまず問題とならない。同様な理由で、この方法を凍結切片や細胞診材料にそのまま応用することは難しい。この場合は、患者血清中の IgG をビオチン化することがすすめられる。

2. 利点

高価な市販抗体(しかも、うまく染まるかどうかわからないことが多い)をわざわざ購入しなくてよい点が最大の利点であろう。病理標本をみて、生体反応を確認した後に、主治医や検査室に電話を 1 本入れて、血清を少量保存してもらうよう依頼することがすべてである。血液・血清検査の残りの検体がほんの少し(0.5 ml 以下で OK)あれば十分である。ただし、バイオハザードの観点から、HBV や HCV のキャリアであることが判明している患者血清は用いるべきではない。免疫抑制状態に発生した日和見感染患者の血清は、抗体価の上昇が期待できないうえ、バイオハザードの観点からも、本アプローチには不適である。

3. 限界

特異性の検定は必要に応じて行わねばならない。最も簡単な方法は、関連の病原体感染が判明している陽性検体(パラフィン切片)を準備して、同一条件で染色してみることである。たとえば、スポロトリコーシスの皮膚病変内に *Sporothrix schenckii* を見出すことが目的の場合は、患者血清中の IgG が他の真菌と交差反応を示そうが、それほど大きな問題ではないであろう(実際、患者血清は pan-fungal reagent とみなされる)。

一般に、細菌・真菌感染症の場合は、他種の細菌・真菌に交差反応を示すことが多い。ウイルス、原虫、寄生虫の感染症では、当該病原体に対して、絶対的ではないものの、相当に高い特異性を示すことが多い。

4. 応用例

われわれはこれまでに、患者血清を利用した上記免疫染

2 1. 病理学的診断法

色法により、以下の病原体のパラフィン切片内での証明に成功している。

細菌：MRSA, ネコひっかき病菌, 梅毒スピロヘータ, ツツガムシ病リケッチア, ピロリ菌

真菌：クリプトコッカス, スポロトリックス

ウイルス：水痘・带状疱疹ウイルス

原虫：赤痢アメーバ, アカントアメーバ, リーシュマニア, クリプトスポリジウム, トキソプラスマ, ミクロスポリジウム, プラストシスティス

蠕虫：回虫, 顎口虫, 広東住血線虫, ビルハルツ住血吸虫

II. パラフィン切片を利用した免疫電顕法と電顕レベルの *in situ* hybridization 法—pre-embedding method—

1. 原理

細菌やウイルスといった病原体は、その明確な粒子構造や厚い膜構造の存在のため、通常のホルマリン固定パラフィン切片においても、その形態が十分保存される傾向にある。パラフィン切片は、抗体の浸透性がよく、凍結切片を用いる場合のような、抗体の浸透不良による偽陰性化はまずみられない。したがって、pre-embedding method による免疫電顕法を病原体抗原を対象にして行くと、病原体に一致した陽性所見が認められることが予想される。

同様の原理で、病原体ゲノムに対する non-isotopic *in situ* hybridization 法により、電顕レベルでの病原体ゲノム局在を観察することが可能である。

2. 利点・欠点

病原体は病巣のごく一部にのみ局在することが多いため、パラフィン切片でその局在性を確認したうえで、ねらい定めた免疫電顕を行うことの利点は大きい。さらに、次のような光顕・電顕の直接比較も可能である。

まず、型のように、パラフィン切片を用いた(光顕用の)免疫染色ないし *in situ* hybridization 染色・核染を行う(DAB 発色)。光学顕微鏡観察と写真撮影をしたのち、カバーガラスをはずして、陽性細胞をねらって、オスミウム酸処理後に電顕包埋する(inverted beam capsule method)。この場合、パラフィン切片の浸透性のよさのため、電顕用の特別な免疫染色手順(H₂O₂ 抜きの DAB preincubation や長い抗体反応時間)は原則として不要である。同一細胞が光顕と電顕で比較観察できる点が最大の特徴といえよう。陽性反応が病原体に一致するの否かを直接確認できる点は、組織化学反応の特異性の証明法の一つとしても有効で

ある。

バイオハザードに対する注意を払わなくてよいことは、病原体の局在観察に際してのパラフィン切片の一つの大きな利点といえよう。最大の欠点は、むしろ、超微形態所見の保持の悪さである。

3. 応用例

われわれはこれまでに、次の病原体抗原・ゲノムに対して、パラフィン切片における電顕的局在観察に成功した。

- a) 免疫電顕：HPV, EBV, CMV, HBV, *Chlamydia trachomatis*, 大腸菌, 結核菌, 非定型抗酸菌, らい菌, リステリア, *Helicobacter pylori*
- b) *in situ* hybridization：HPV, EBV, CMV, *Chlamydia trachomatis*

参考文献

- 1) Tsutsumi, Y., Kawai, K., Nagakura, K.: Use of patients' sera for immunoperoxidase demonstration of infectious agents in paraffin sections. *Acta Pathol Jpn* 1991, **41**: 673-679
- 2) 堤 寛：感染症の免疫組織化学。病理と臨床 1993, **11**: 320-327
- 3) 川井健司, 堤 寛：患者血清を利用した組織内病原体の染色法。Medical Technology 1994, **22**: 299-304
- 4) Tsutsumi, Y.: Application of the immunoperoxidase method for histopathological diagnosis of infectious diseases. *Acta Histochem Cytochem* 1994, **27**: 547-560
- 5) 堀 貞明, 川井健司, 伊藤 仁, 長村義之, 堤 寛：パラフィン切片およびパパニコロウ染色標本を利用した免疫電顕法。病原体局在観察への応用。病理技術 1994, **50**: 14-18
- 6) 堤 寛：性感染症(STD)：顕微鏡による同定。免疫組織化学と *in situ* hybridization 法。臨床検査 1996, **40**: 679-686
- 7) 堤 寛：感染症。細胞診と酵素抗体法(長村義之編), 武藤化学, 1997, pp. 112-130
- 8) Tsutsumi, Y.: Histological diagnosis of protozoan infection using patients' sera. In: *Host Response to International Parasitic Zoonoses* (ed. Ishikura, H.), Springer-Verlag, Tokyo, 1998, 69-81
- 9) 堤 寛：肺感染症の病理。呼吸 1998, **17**: 778-793
- 10) 堤 寛：*in situ* hybridization 法の感染症領域における展開。臨床検査 1998, **42**: 969-977
- 11) 堤 寛：免疫組織化学。感染症診断への応用。病理と臨床 2000, **18**(臨増): 216-221
- 12) 堤 寛：*In situ* hybridization。感染症診断への応用。病理と臨床 2000, **18**(臨増): 277-283