



Title	Application of in situ PCR to diagnose pneumonia in medico-legal autopsy cases
Author(s)	中村, 正巳
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43176
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	なかむら まさみ 中 村 正 巳
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 4 7 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 7 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Application of <i>in situ</i> PCR to diagnose pneumonia in medico-legal autopsy cases (<i>In situ</i> PCR 法を用いた法医学剖検例における肺炎の診断への応用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 的 場 梁 次 (副査) 教 授 青 笹 克 之 教 授 山 西 弘 一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

法医学解剖においては外因死と内因死の区別、及び外因死の種別並びに病死の種類などについて判断を下さなければならない。しかし死因に外的要因と内的要因が複雑に影響を及ぼし合っている場合があり、さらに死亡の原因が発生してから長い時間を経過して死亡した場合には、死因にどの要因がどの程度関わっていたかを判定することはしばしば困難な場合が多い。このうち法医学解剖においてしばしば遭遇する事例に、外傷後に発生した肺炎があり、この場合には外傷と肺炎との因果関係、肺炎の程度、起炎菌の種類などを剖検所見から判定しなければならない。しかし血液や組織の細菌培養はしばしば死後変化との区別が難しいことがある。そこで我々は組織内において起炎菌の種類およびその分布を判定できる新しい手法として液相 PCR 法および *in situ* PCR 法を死因判定に応用するための実験条件を検討した。

【材料と方法】

1. 組織

当教室で行われた法医学解剖例のうち、肺炎の所見を呈していた症例 (n=7)、肺炎の所見を呈していなかった症例 (n=3) を選択した。剖検により、症例番号 (以下、症例) 1、2、3、4、5 は通常の病理組織学的検査によってそれぞれ肺炎の所見を呈しており、症例 6 は肺膿瘍の所見を呈していた。症例 7 は暴行を受け重傷を負い、その創傷から感染を起し敗血症のため死亡した事例であった。症例 8、9、10 は陰性コントロール例であった。

2. 液相 PCR

剖検で得られた肺組織からフェノール/クロロホルム法により DNA を抽出した。肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、溶血性連鎖球菌 (以下、溶連菌) のそれぞれの菌種に対して特異的なプライマーを用いた。反応液の組成は DNA 10.0 ~ 15.0 ng、10×buffer 2.5 μl、dNTPs 2.0 nmol、プライマーをそれぞれ 15.0 pmol、MgCl₂ 37.5 nmol、*Taq* Gold DNA polymerase 1.25 U であった。PCR の条件は熱変性が 94°C 1 分、アニーリングが 55°C 1 分、伸張反応が 72°C 2 分、サイクル数は 40 回にした。得られた増幅産物をアガロースゲルを用いて電気泳動を行い紫外線下で観察した。

3. *In situ* PCR

ホルマリン固定後パラフィン包埋された肺組織を用いて、厚さ 6.0 μm に薄切し組織標本を作成した。Proteinase K で前処理をしバッファーなどで洗浄した後、専用の機種である「GeneAmp *In situ* PCR System 1000」を用いて

in situ PCR を行った。反応液の組成は10×buffer 5.0ul、dNTPs 40.0nmol、プライマーをそれぞれ25.0pmol、MgCl₂ 0.125umol、*in situ* Taq polymerase 10.0U であった。PCR の条件は、熱変性が94℃ 1分、アニーリングが37℃ 1分、伸張反応が72℃ 2分で、サイクル数は10回にした。PCR 終了後、バッファーなどで洗浄しアルカリフォスファターゼ（ALP）標識の抗ジゴキシゲニン抗体を加え抗原抗体反応を行った。さらに基質 NBT-BCIP を加えると ALP を酵素とした発色反応が起り、青紫色の不溶性の沈殿が生じそれを光学顕微鏡下で観察した。

【結果】

液相 PCR では肺炎球菌は症例 1～6、黄色ブドウ球菌は症例 1、3、6、7、溶連菌は症例 6、7 から検出された。これらの結果は *in situ* PCR の結果と一致していた。さらに *in situ* PCR では、肺胞内への白血球の浸潤、菌塊および白血球の胞体の色調が変化する現象が観察された。白血球の胞体の色調が変化する現象は白血球内に取り込まれた細菌の DNA 断片が増幅されたことに基づくものであり、生活反応を示していると考えられた。さらに症例 7 では大阪大学医学部付属病院・臨床検査部・感染微生物学研究室のご協力による血液の細菌培養が行われたところ、溶連菌（3+）が検出され、菌血症にて死亡したことが判明した。これは液相 PCR および *in situ* PCR の検出結果とも一致していた。

【考察】

ある微生物に感染しこの感染が原因で死亡したことが考えられる死体で、その微生物がもつ DNA が存在することを証明しかつその病的意義が証明できれば、死因の決定に役立つものと考えられる。我々は DNA の検出に高感受性をもつ *in situ* PCR 法を採用し、実際の法医学解剖例、特に頻度の高い感染症の 1 つである肺炎像を呈していた症例に応用した。しかし実際に *in situ* PCR を行ったところ試薬がガラス表面に結合し反応が起らないことや組織の破壊などがみられたため、PCR 反応液の組成および PCR 反応について考察した。その結果 PCR 反応液の組成に関しては dNTPs、プライマー、DNA polymerase、MgCl₂ などの試薬を多く加えなければならないことが判明した。特に非特異的に増幅産物ができるのを防ぐため MgCl₂ は約 3 倍濃度を高めたものを用いた。PCR 反応に関しては組織の形態を保ちつつ標的ゲノムの増幅を行わなければならないため熱変性の時間を短縮し、サイクル数を減らした。また適切なアニーリング温度の検討をした結果、その温度は 37℃ であることも判明した。

【総括】

in situ PCR 法は法医学解剖または病理解剖において通常の組織標本から感染症の種類と程度を同時に判定できるという利点をもっている。また PCR 法は非常に鋭敏なので、通常の組織学的検査では検出できないような事例にも応用でき起炎菌の同定を行うことができる。*in situ* PCR 法は簡便な直接法を行う上で、適切な実験条件を確定することによってホルマリン固定パラフィンブロックからも細菌を検出することができ、さらにウイルスや真菌などの他の病原体の検出にも応用できればより多くの知見が得られるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

In situ PCR 法はヒトの組織における色々な微生物の特異的な DNA の検出を可能にする。法医学解剖例においては死因に感染症が関与している例は多く、特に肺炎はよくみられるものである。本研究では実際の法医学解剖例に液相 PCR 法および *in situ* PCR 法を応用し肺組織における細菌感染の存在、起炎菌の同定、および組織内における細菌の分布を証明することで死因の決定に役立てることを目的とした。ホルマリン固定後パラフィン包埋された肺組織を用いて、肺炎の所見を呈していた例と陰性対照例に対して、肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、溶血性連鎖球菌のそれぞれの菌種に対して特異的なプライマーおよび専用のキットなどを用いて実験を行った。肺炎の所見を呈していた 7 症例では、少なくとも 1 つ以上の細菌の菌塊が肺胞より検出され、また白血球の胞体の色調が抗原抗体反応および発色反応を用いることにより変化的ことが観察された。この胞体の色調が変わる現象は白血球内に取り込まれた細菌の DNA 断片が増幅されたことに基づくもので生活反応を示しており、法医学上重要な知見と考えられる。*In situ* PCR 法の適切な実験条件を検討した結果、液相 PCR 法に比べて試薬を多く加えること、組織の形態を保つためサイクル数を減らすこと、検出感度を上げるためアニーリング温度を下げるなどが必要であることも判明した。*In situ*

PCR 法は直接法により適切な実験条件を確定することでホルマリン固定パラフィンブロックからも細菌を検出することができ、さらにウイルスや真菌などの他の病原体の検出にも応用できればより多くの知見が得られると考えられる。本研究は実際の法医学解剖例にこの方法を応用し死因の決定に役に立てたことのみならず、通常の組織標本から感染症の種類と程度を同時に判定できるという利点を示し得ており、本論文は学位に値するものとする。