

氏名	塩 竈 和 也
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙 第 534 号
学位授与の日付	平成29年10月17日
学位論文題名	New Grocott stain without using chromic acid 「クロム酸を使用しない新しいグロコット染色」 Acta Histochemica et Cytochemica 48(1): 9-14, 2015.2
指導教授	秦 龍 二
論文審査委員	主査 教授 松 浦 晃 洋 副査 教授 原 田 信 広 教授 磯 部 一 郎

論文内容の要旨

【背景】

グロコット染色は、R. G. Grocott氏により考案された真菌を証明する代表的な染色法である。開発から60年以上経った現在でも、当時のままの手法で酸化剤に無水クロム酸(六価クロム)を使用している。六価クロムは、きわめて毒性・腐敗性が高い第2類特定化学物質および第1類危険物に指定されている医薬用外劇物である。母性保護のための女性労働基準規則の対象物質としても知られており、万が一、検査室や研究室で基準値を超えた場合には女性の就業が禁止される。さらに、IARC(国際がん研究機関)が定める発がん性分類グループ1「ヒトに対する発がん性が認められる」にも属しており、アスベスト、ヒ素およびカドミウムと同等の扱いであり、肺癌リスクが高い。

【目的】

本研究では、廃棄物処理のキーワード4R(Refusal: 拒否、Reduction: 低減、Reuse: 再利用、Recycle: 再生利用)に基づいて、グロコット染色の改良を行った。

【対象と方法】

肺カンジダ症3例、肺アスペルギルス症3例、肺ムコール症3例の10%ホルマリン固定パラフィン切片を用いて条件検討した。確立した最終条件につき、ニューモシスティス肺炎3例、肺クリプトコッカス症3例、肺ヒストプラズマ症2例、皮膚ペニシリウム症1例、皮膚クロモマイコーシス2例、皮膚糸状菌症2例、咽頭放線菌症3例、バーラルのクロレラ症1例の10%ホルマリン固定パラフィン切片を追加検討した。病理標本の使用については、本学医学研究倫理審査委員会から承認を得た(12-080)。1%無水クロム酸水溶液(通常法の5倍希釈)による検討、過ヨウ素酸処理及び加熱処理(60℃インキュベーター、電気ポット、電子レンジ、圧力鍋)の二重処理の検討を行った。

【結果】

60℃加温した1%無水クロム酸水溶液によって、原法と同程度の染色性を示すことを明らかにした。間質への共染も抑制され、菌種を問わず良好な染色性を示した。さらに、作製後4週間使い続けても染色性に影響はなく、1か月程度なら繰り返し使用できることを確認した。無水クロム酸の代用法として、加熱処理後に過ヨウ素酸処理を組み合わせた二重処理で染色性が増強した。熱処理に用いる水溶液による差はほとんど認められず、いずれの溶液においても良好な染色像が得られた。熱処理は、60℃インキュベーターでは、いずれの条件でも間質への共染が除去できなかった。電気ポット95℃ 30分、電子レンジ500W 10分、圧力鍋弱火10分がそれぞれの至適検出条件だった。

【結語】

本法の優れた点は以下の6点に集約される。①六価クロムに依存しないグロコット染色を確立した。②カンジダやアスペルギルスだけでなく、従来法では染色性の薄いムコール、その他諸種真菌を明瞭に検出することができた。③従来法と同程度の染色性は保ちつつ、間質への共染を抑制できた。④熱処理は電気ポット、電子レンジおよび圧力鍋に対応した条件をそれぞれ確立しており、高価な機器を購入する必要はなく、各施設で使用している機器で十分対応できた。⑤熱処理に使用する水溶液は、水道水で対応可能であった。⑥従来法が約110分かかるのに対して、本法は最短70分で仕上げるのが可能であり、時間の短縮につながった。本法が成功したポイントとして、熱処理がホルマリン固定によるマスクングを除去して、過ヨウ素酸の酸化力が通常よりも促進した可能性が高い。本法は、従来のグロコット染色が抱える環境汚染や人体被害を一掃でき、検査室や研究室ですぐにも実践できる簡便法として位置づけられる。

論文審査結果の要旨

グロコット染色は、長年真菌の証明法として用いられてきたが、酸化剤として六価クロムを使用しなければならないことが難点であった。本論文において、申請者は六価クロムに依存しないグロコット染色の改良を試み、有害物質を使用せず、共染を抑制でき従来法に勝る方法を確立した。さらに、染色時間を短縮させ、従来法では検出困難なムコールを含むほぼすべての真菌の検出が可能となった。本論文で樹立した手技は、毒性の低い試薬を用いることで、入手及び管理が容易であり、熱処理方法も通常設置されている検査室の機器を用いて行うことができるように工夫されている。従って、本法が病理検査室や研究室などより広い範囲で普及することにより、環境保全ならびに人体被害の軽減など環境に優しい検査室の設立につながり、社会的に重要な貢献をもたらす研究内容として位置づけられる。

これらのデータはすでにActa Histochemica et Cytochemica誌に掲載されており、染色性の確保、染色時間の短縮、毒性物質の排除などに新規性を認めた。また審査委員より、グロコット染色法の基本原理から、各実験の詳細な条件設定にいたるまでの様々な質問がなされたが、それらの質問の全てに的確に返答した。従って学位論文として十分に値すると評価した。