

IIA-13

細胞診検体を対象とした遺伝子解析における検体保存液の影響

中西 陽子¹⁾、小松 京子²⁾、佐野 誠¹⁾、逸見 明博³⁾、
根本 則道^{1,2)}

日本大学医学部病理学講座¹⁾、日本大学医学部附属板橋病院病理部²⁾、日本大学医学部附属練馬光が丘病院病理部³⁾

【目的】細胞診において適正な細胞評価には良好な塗抹標本の作製が不可欠である。近年、液状処理検体を用いた自動塗抹法の有用性が期待されている。我々は、形態所見に加えてより多くの情報を得ることを目的として、液状処理検体で Papanicolaou 標本作製した後、保存液中に残存する細胞を用いて補助診断としての遺伝子解析を試みた。【対象と方法】病理部に提出された 15 例の細胞診検体（自然尿 13 例、カテーテル尿 1 例、気管支洗浄液 1 例）を用いた。液状処理検体の残液 1ml を PBS で洗浄した後、沈査より DNA および、total RNA を抽出した。cDNA を合成した後、RT-PCR 法、TaqMan リアルタイム RT-PCR 法を用いてハウスキーピング遺伝子である β -actin、GAPDH、さらに尿路上皮癌での蛋白発現が報告されている CK7 (KRT7)、CK20 (KRT20) を増幅した。また、PCR-SSCP 法により p53 遺伝子 exon5-8 の領域について点突然変異の検出を試みた。【結果】p53 遺伝子については、免疫組織化学で p53 蛋白の蓄積が認められた 1 例で exon5 における変異が検出された。mRNA 発現解析の結果は、13 例でハウスキーピング遺伝子の検出が可能であった。CK7、CK20 についても免疫組織化学に相応した結果が得られ、リアルタイム RT-PCR 法により、これらの遺伝子発現の定量化が可能であった。以上の解析結果は保存液中に 14 日間室温放置した検体でも可能であった。【考察】検体の液状処理後、保存液中に長期間保存された細胞からも遺伝子解析が可能であることが示された。通常の検体保存では経時的な細胞変性が必至であるが、液状処理後の保存では、良好な形態観察と遺伝子解析を組合わせた検討が可能であり、より精度の高い診断を得ることが期待される。

IIA-14

ISH 法、FISH 法、IHC 法の簡便な自動化の試み

湯浅 加苗^{1,2)}、永井 賢治¹⁾、山田 健人²⁾、
平石 佳之¹⁾、近藤 裕道^{1,2)}

¹⁾アロカ株式会社 バイオサイエンス部

²⁾慶應義塾大学 医学部病理学教室

【背景・目的】遺伝子発現の有無および発現遺伝子の局在を組織上で解析する方法として、*in situ* Hybridization (ISH) 法、Fluorescein *in situ* Hybridization (FISH) 法があり、その遺伝子産物であるタンパク質を解析する方法として Immunohistochemistry (IHC) 法がある。ポストゲノム時代を迎えた現在、これらの解析により得られた結果は、各方面の検査・研究において重要な意味を持つ。例えば、臨床検査では乳癌における Her-2 遺伝子の増幅確認として FISH 法、IHC 法が最も盛んに実施されており、治療方針の決定において、これらの検査結果が持つ意味の重要度は高い。また、基礎研究では、ISH 法は生体内における mRNA の発現とその局在を明確にし、組織・細胞の発生および再生の時期を確認することのできる手段として有効である。しかしながら、ISH 法、FISH 法および IHC 法は、その他の病理組織学的染色法に比し、温度調整ならびに試薬交換等煩雑な行程が多く、検査・実験実施者は非常な労力を要する。また、結果の再現性が得られにくく、結果の判断に困難な場合がある。そこで今回我々は、検査・実験実施者の労力を解消し、結果の再現性の向上を図るべく有効な手段として、その自動化を試みた。

【方法】プローブ、抗体等高価な試薬の使用を少量に抑えられ、さらに試薬の攪拌が可能なパーツが設置された装置を開発し、以下の実験を行った。1) ISH 法: ヒト小脳、マウス脳組織において NFP(68kD)のプローブを使用した。FISH 法: 末梢リンパ球標本を使用し、BCR/ABL をプローブとして使用した。IHC 法: ヒト扁桃腺を使用し、CD20、CD45RO、CD21 を使用した。

【結果】ISH 法、FISH 法および IHC 法ともに良好な検出が可能であり、今回開発した手段および微量で攪拌展開できるパーツは再現性の向上につながった。

【考察】今回使用した各々の方法に用いた細胞および臓器とプローブや抗体の組み合わせは、比較的簡便なものを選択した。今後は、発現量の少ない RNA やタンパク質でスループットならびに再現性の向上を試みる予定である。