

原 著

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による 染色体特異的シグナルの検出 —ホルマリン固定パラフィン包埋組織への応用—

病理センター、遺伝子診断室（中越遺伝子診断研究会）；臨床検査技師³⁾、病理医⁴⁾

長谷川 秀 浩¹⁾，五十嵐 俊 彦²⁾

分子生物学的解析法の一つである Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法をホルマリン固定パラフィン包埋組織に応用し、性染色体動原体を認識するプローブをハイブリダイゼーションさせ、それぞれの特異的蛍光シグナルの検出と条件を確立させた。すなわち、その検出にあたっては、前処理としてクエン酸緩衝液中でマイクロウェーブ (MW) 処理を施し、ホルマリンによるメチレン架橋を除去し、プローブの浸透性を高めるため 0.2% pepsin / 0.01N HCl による蛋白分解酵素処理と 50% Glycerol / 0.1 × SSC による加熱を追加処理することと長時間のハイブリダイゼーションが重要であると判断された。また、本法はスライドガラスに組織切片を貼り付けた状態で行なえることから顕微鏡下において目的とする細胞の局在も容易に把握できる。したがって、本法を病理組織切片に応用することは、通常の病理組織所見に対し、分子生物学的レベルの検討が可能となることから病理診断の質的向上が期待される。

キーワード Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法、染色体、X、Y、ホルマリン固定パラフィン包埋組織。

著 言

近年の分子生物学的技術の目覚ましい発展により、従来、遺伝子検査には不向きとされていた病理検査の領域においても各種解析法が確立され、診断の補助的手段として用いられている。各種分子生物学的解析法の中でも最も古典的な染色体解析法では、分裂期の細胞を試料として用いなければならないことから、細胞分裂像が得られない場合、染色体異常に関する情報を知る手段にはならない。したがって、細胞を培養し分裂期の核を抽出していたのに対し、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法では、クローン化 DNA と染色体 DNA をハイブリダイゼーションさせて、これを蛍光シグナルとして検出する方法であり、特異的なシグナルは、静止期にある核からでも明瞭に検出できることから、染色体の数的異常はもちろんのこと転座や遺伝子増幅など構造的変化も解析可能であり、診断学の分野において、その利用価値は極めて高い方法といえる。しかし、その多くは末梢血や培養細胞などが対象とさ

れ、ホルマリン固定パラフィン包埋組織を対象とした場合、シグナル検出が極めて困難なことから、病理検査室では一般的に実施されていない。本法を病理組織標本への応用を可能とすることは分子生物学的付加価値を含んだ病理診断が可能になることを意味するものであり、その利用価値は極めて高い。今回、我々はホルマリン固定パラフィン包埋組織を対象とした FISH 法による遺伝子解析法について検討し、その検出条件を確立したので報告する。

材 料 と 方 法

材料

検討に用いた材料は2003年5月から6月にかけて当施設に検査材料として提出されたもので、自然排出された子宮内容物2例、前立腺癌により摘出された精巣および精索腫瘍で摘出された精巣を10%中性ホルマリンにより、2日から3日間固定されたパラフィン包埋組織をもちいた (Fig. 1)。それぞれのパラフィン包埋組織を6μmの厚さに薄切し、シランコート付きスライドガラスにとり、37℃にて48時間乾燥した。

Sample	Tissue	Histological diag..	Fixed days
A	Uterus contain	Abortion	3
B	〃	Abortion	2
C	Testis	Hyperspermatogenesis	2
D	〃	Atrophy	2

Fig. 1 Example specimen data for FISH with formalin-fixed paraffin embedded tissue section.

方法

前処理として脱パラフィン後、10mM クエン酸緩衝液にスライドガラスを浸し、マイクロウェーブ (MW) 処理を施すことによりホルマリンにより生じたメチレン架橋を除去し、蛋白分解酵素 (0.2% pepsin / 0.01 N HCl) により表面蛋白を分解し染色体を露出させた (Fig. 2)。ついで、プローブの浸透性を高めるためエージングの後、50% Glycerol / 0.1X SSC による処理を施し、脱水、乾燥させた。染色体 DNA の変性は75℃に加熱された70%Formamide / 2 × SSC 液中にて、5分間行い4℃に冷却された70%、85%、100%のエタノールにより急冷し、DNAの再結合を制止させた。プ

ローブは CEP X SO/Y (satellite III) SG (Vysis) を使用し、サーマルサイクラーにより73℃で5分間変性後、45℃パラフィン伸展器により加温された切片上に10μl 滴下した。プローブの蒸発を防止するためカバーガラス (18mm×18mm) を載せ、周囲をボンドでシールし、湿潤箱に入れ遮光した状態で45℃、48時間ハイブリダイゼーションを行なった。反応後の洗浄は45℃、50%Formamide/2×SSC、2×SSC、0.1%NP-40/2×SSCにより余分なプローブの洗浄を行い、

SSCを通しNP-40を洗浄後、核染色封入溶液 (DAPI II) により細胞核染色と封入をおこなった。所見の観察は落射型蛍光顕微鏡 (OLYMPAS U-UCM) により励起されるシグナルをトリプルバンドミラーユニットにより確認し、その画像を CCD カメラ (OYMPUS PD-70) により撮影を行なった。ついで、パソコンに取り込まれた画像について任意に選んだ細胞境界が明瞭な100個の細胞について検出されたシグナルの数を計測した。

薄切	6 μm~15μm 湯伸ばし後、スライドガラスにとり、切片とスライドガラスの間に入っている水分はろ紙を使いできる限り吸収除去
スライドガラス	ポリエルリジンコートもしくはシランコートされたものを使う
乾燥	37℃ 2 over night
前処理	1 脱バラ → 親水 → PBS 2 MW 処理500W、10分：10mM クエン酸緩衝液 PH6.0 3 酵素処理 37℃ 10分：0.2%Pepsin/0.01N HCl (操作2：冷却後) 4 PBS → 4%PFA 室温 10分 → PBS 5 エージング37℃ 30分 20×SSC 5ml NP-40 5 μl DDW45ml 6 2×SSC 室温 3分 → 50%Glycerol/0.1×SSC 90℃ 5分 →2×SSC 室温 3分 7 脱水、洗浄、乾燥：70%、85%、100%EtOH 室温 各1分 → 冷風乾燥
染色体DNA変性	1 70%ホルムアミド/2×SSC 75℃ 5分 プローブの調製 ↓ 2 70%、85%、100% EtOH 4℃ 各1分 73℃サーマルサイクラーにて5分間変性 ↓ 3 45℃ パラフィン伸展器 2分 水中 標的範囲にプローブをアプライ *カバーガラスをかけ周囲をペーパーボンドでシールする
ハイブリダイズ	1 遮光湿潤箱中で45℃ 48時間ハイブリダイズ
洗浄	1 50%ホルムアミド/2×SSC 45℃ 10分 3回 *乾燥防止用のシールを剥いでから *カバーガラスは無理にはずさない 洗浄液の中で自然にはずれる 2 2×SSC 45℃ 10分 3 0.1%NP-40/2×SSC 45℃ 5分 4 2×SSC 室温 5分
対比染色と観察	1 DAPI II 10μ位 *洗浄工程4の後余分な水分を除き封入後、約1時間くらい生乾き状態で放置したのち蛍光観察

Fig.2 Protocol of FISH with formalin-fixed paraffin embedded tissue section.

結 果

検討に用いた全てのホルマリン固定パラフィン包埋組織から X 染色体動原体を示すオレンジ色または Y 染色体動原体を示す緑色の蛍光シグナルが確認され

た。その検出率は XY または XX の両方が確認されたものが60%から68%であり、いずれか一方が確認されたものが18%から23%、シグナルが確認できなかった細胞核の比率は9%から12%であった (Fig. 3)。また、その顕微鏡所見を示した (Fig. 4)。

Sample	Signal count numbers			
	non	one	two	more than two
A	12	21	61	6
B	9	23	62	6
C	9	18	68	5
D	11	20	60	9

Fig. 3 Detection rate of specific signal for chromosome x and Y.

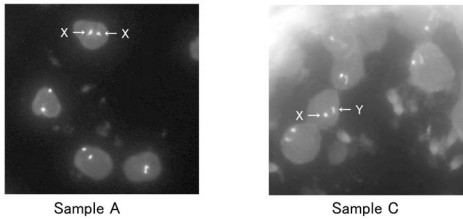


Fig. 4 Representative example of interphase cytogenetic analysis using centromere probes for chromosome X and Y.

考 察

腫瘍細胞の染色体の構造異常や数異常が報告され、これらの異常が癌の発生に密接に関わっているとされている。個々の腫瘍において、それが特異的な染色体異常であるとすれば、病理組織切片にて、その異常を検出することは病理標本により得られた形態学的所見に対し、遺伝子学的な裏づけが可能となることを意味するものである。このような有用性から、細胞診材料や病理組織材料を対象とした報告例(1)~(4)があるが、ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた FISH 法については、桂ら(5)がホルマリン固定の条件に応じた前処理の検討が必要であり、過固定された組織からはシグナルは得られないと報告しているように、その感度の悪さによる信憑性の問題から一般の病理検査室においては未だ実施に至っていない。しかし、組織学的変化に対応した染色体異常の解析が極めて有意義であることから、検出方法についてさまざまな検討がなされている(5)~(8)。今回、我々が検討した組織は検体採取から固定日数が、最も長いもので3日であったもののシグナルの検出は可能であった。したがって、中性ホルマリンにより固定された場合、その固定日数が3日以内であるならばシグナルの検出が可能な範囲であると考えられる。つまり、これは当施設における日常業務において、検体採取から検体処理までの固定日数は、概ねこの範囲以内であることから、一般の臨床材料においても本法の適応が可能であることを示唆するものであった。また、報告されている標本作製法として、細胞を単離してから行なう方法と切片としてスライドガラスに貼り付けたまま行なう方法があるが、我々の検討結果では Fig. 5 に示すようにパラフィン包埋組織からの単離核抽出法(6)により得られた標本は、その組織材料に血液が含まれている場合、核に重積することにより解析しにくくなるほか、結合組織等の居雑物除去するためメッシュによる濾過を繰り返した場合、細胞核の回収率が減少する。さらにホモジナイザ

—処理や蛋白分解酵素処理の影響により、オートスメア—による伸展塗抹の段階で核が、折れ曲がったり集積してしまう可能性も高く、解析に支障をきたす場合が多い。一方、五十嵐等(7)により報告されている方法は薄切した組織片をスライドガラスに貼り付けたまま行なうことから、組織学的背景と同時に染色体の情報を解析することが可能であり、優れた方法であると考えられるが、プローブの浸透性を高めるため特殊な MW 迅速試料処理装置: MI-77 (東屋医科器械) を用いて、ハイブリダイゼーション中に MW の間欠照射が必要とされる。

我々は組織切片をスライドガラスに貼り付けた状態で行なう FISH 法の前処理に、一般の家庭用電子レンジを用いた MW 処理により、ホルマリン固定による架橋構造を除去した後、蛋白分解酵素処理を行なった。ホルマリン固定材料からのシグナル検出のためには蛋白分解酵素処理は必要不可欠であるが、シグナルの検出がしやすいように、この反応時間を長くした場合、細胞核の境界が不明瞭となるとともに核は膨化し、通常の組織標本よりも核の重なりが多くなる。このような蛋白分解酵素処理による悪影響を抑えるため、処理時間を必要最小限とし、さらにプローブの浸透性を高める目的でエージングの他に50%Glycerol/0.1×SSC (90℃, 5分) の追加処理をおこなうことにより、組織形態を損なうことなく染色体動原体部分のシグナルの検出が可能であった。我々の行なった前処理は MW による熱処理、蛋白分解酵素処理、Glycerol による熱処理というように、酵素処理を挟んで熱処理を繰り返していることから切片に対する影響も著しく、剥がれてしまう可能性も考えられる。したがって、スライドガラスは接着力の強いシランコート付きのスライドガラスを使用し、切片の乾燥については十分に行なった。また、切片をスライドガラスに貼り付けた状態で行なう FISH 法の際に考慮しなければいけないこととして、切片の厚さとプローブの浸透深度の問題である。我々は6μm厚の切片を用いたが、切片表面に接する細胞核は薄切により切断されていることから、切片の厚さが薄ければ、切断される細胞核の割合が高くなり、細胞核一個あたりのシグナルの数は少なくなるが、プローブの浸透は容易になる。反対に厚くすることにより、細胞核は重なり合い確認されるシグナルの数は実際の数よりも多くなるが、プローブの浸透が十分に行なわれない可能性がある。今回検討した材料についても、核が重なり合いシグナルカウントに適さない部分も有ったものの一対の性染色体動原体部分シグナル検出率は60%~68%であったことから、概ね適正に近い厚さであり、プローブの浸透についても良好であったと考えられた。しかし、厳密には検討しようとする組織の細胞核の大きさや細胞密度を考慮にいれ決定すべきである。本法は特別な機器の必要もなく、固定液として中性ホルマリンを使用した材料ならば簡単な前処理を施し、ハイブリダイゼーションの時間を若干長めに設定することにより実施可能な遺伝子検査法である。本法を用いることにより、今までの病理標本から診断が不可能であった症例に対して、分子生物学的側面からの検討が可能となることから、その利用価値は極めて高いものと判断される。

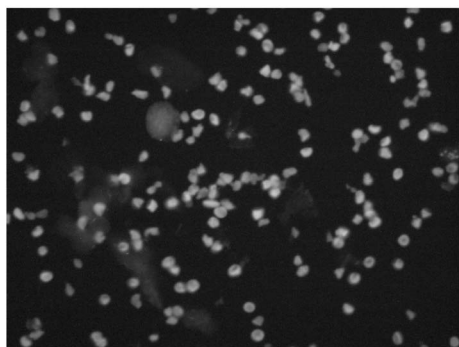


Fig.5 FISH image of separated nuclei from tissue section.

参 考 文 献

- (1) 野口眞三郎 他. 遺伝子診断の乳癌診察への応用
穿刺細胞診検体を用いた乳癌の FISH 診断. 癌と
化学療法 1999 ; 26 : 2127-2130.
- (2) 浦野俊一. 尿中脱落細胞を用いた FISH 法による
膀胱癌診断. 臨床 FISH プロトコル. 東京 : 秀潤
社 ; 1997. 169-171.
- (3) 長尾勝人 他. パラフィン包埋材料を用いた Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による染色体転座の検出. 医学のあゆみ 1995 ; 172(11) : 733-734.
- (4) 池田 聡 他. 大腸癌における 8 番染色体欠失について—染色体特異プローブを用いた ISH 法 (Chromosome in situ hybridization 法 : CISH 法) による検討—. 病理と臨床 1999 ; 17(4) : 401-402.
- (5) 桂 泰 他. 分子生物学的手法を用いた形態学的同定 : 染色体変化からの in situ 検出. 病理と臨床 (臨時増刊号) 1996 ; 14 : 238-241.
- (6) 橋本直哉 他. ホルマリン固定パラフィン包埋標本からの単離隔標本の作製. 臨床 FISH プロトコル. 東京 : 秀潤社 ; 1997. 142-147.
- (7) 五十嵐久喜 他. ホルマリン固定パラフィン切片を用いた FISH に対する可視化 (Chromosome in situ

hybridization : CISH 法) の検討. 医学検査 2002 ; 51(3) : 212-215.

- (8) 大島 晋 他. 組織切片を用いた Interphase cytogenetics (間期細胞遺伝学) の実際. 埼玉大医誌 2001 ; 28(3) : 143-149.

英 文 抄 録

Original article

Detection of the specific signal on the chromosome by Fluorescence in situ hybridization (FISH) method. —application to the formalin-fixed paraffin-embedded tissue—

Department of Genetic diagnosis (Chu-etsu genetic diagnosis study group), Pathology Center ; Clinical technologist 1), Pathologist 2)
Hidehiro Hasegawa 1), Toshihiko Ikarashi 2)

We established Fluorescence in situ hybridization (FISH) method for formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens. The examining probes contained alpha satellite DNA, specific to the centromere regions, and were directly labeled with spectrum orange and spectrum green by fluorescence microscope. The preprocessing procedure was necessary for the paraffin-embedded tissue specimens to detect specific signal by FISH. The pretreatment consisted of microwave in citrate buffer, protein digestion with enzymes and heat treatment by 50% glycerol/0.1x SSC solution. It was important that a long time of hybridization to the detect specific signals by FISH. Specific signal could be confirmed on the chromosome with X and Y by fluorescence microscope in the specimens. The analysis of chromosomes from paraffin-embedded tissues can be analyzed by FISH. Our new procedure using pathological archives has many advantages in studying genetic analysis in various types of tumors.

Keywords : Fluorescence in situ hybridization method (FISH), Chromosome, X, Y, Formalin-fixed paraffin-embedded tissue.