

パラフィン切片標本と細胞診標本における FISH 法の比較検討

— FISH 解析における切片厚の影響と LBC 法の利点 —

金山 和樹¹⁾, 松田 知世²⁾, 米田 操¹⁾

1) 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 医療栄養学科 臨床検査コース

2) 三重大学大学院 医学系研究科 腫瘍病理学

研究報告

パラフィン切片標本と細胞診標本における FISH 法の比較検討

— FISH 解析における切片厚の影響と LBC 法の利点 —

金山 和樹¹⁾, 松田 知世²⁾, 米田 操¹⁾

1) 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 医療栄養学科 臨床検査コース

2) 三重大学大学院 医学系研究科 腫瘍病理学

キーワード： Fluorescence in situ hybridization, Liquid based cytology, パラフィン切片標本, 切片厚, 共焦点レーザー顕微鏡

要 旨

パラフィン包埋薄切標本は、病理診断時の FISH 解析に用いられる標準の標本作製方法であるが、薄切によって人工的な核内シグナルの欠失が生じ FISH 解析に影響を与える可能性がある。この影響を明らかにするために本検討では、パラフィン切片標本と細胞診標本の FISH シグナルの解析を行い、FISH 解析における切片厚の影響および LBC 法を用いた FISH 解析の利点について考察する。パラフィン切片標本は、胃癌組織 1 検体を用いて 3 μ m と 5 μ m の厚さで連続に薄切し標本を作製した。細胞診検体は、EUS-FNA で採取された通常型腺癌 1 検体を使用し、合わせ法と LBC 法で標本作製を行った。各標本について FISH 法を行い、(1) パラフィン切片標本と細胞診標本でのシグナル視認性の比較、(2) 各切片厚と LBC 標本のシグナル数の比較、(3) LBC 標本を用いた核内シグナルの分布、の 3 項目について検討を行った。パラフィン切片標本と LBC 標本では、腫瘍細胞の核の重なりは少なくシグナルの視認性は良好であった。切片厚と LBC 標本のシグナル数の比較では、3 μ m で 1 細胞あたりのシグナル数の低下が強く認められた。また、Z 軸と核内断面の解析において核内における CEP17 と HER2 シグナルの位置や分布が異なっていた。これらの知見から、パラフィン切片標本での FISH 解析では切片厚が重要な影響因子であり、人工的なシグナルの欠失を考慮して解析をする必要があると考える。LBC 法は細胞同士の重なりが少なく人工的なシグナルの欠失を受けない手法であるため、FISH 解析に適した標本作製方法であると考えられた。

はじめに

Fluorescence in situ hybridization 法 (以下 FISH 法) は、細胞内の目的とする核酸配列と相補的な配列を持つ蛍光標識プローブを反応させて可視化する方法である。FISH 法は病理分野において、乳癌および胃癌での Human epidermal growth factor receptor 2 (以下 HER2) 遺伝子増幅の検出や肺癌の ALK 融合遺伝子、骨軟部腫瘍の各種融合遺伝子の検出に用いられている¹⁻⁴⁾。また、FISH 法による 1p36, 19q13 の欠失の解析が脳腫瘍の診断に重要であり^{5,6)}、病理検体での正確な FISH 解析が必要となる。

通常、FISH 解析にはホルマリン固定されたパラフィン切片が使用されるが、薄切時に人工的な核内シグナルの欠失が生じ解析に影響を与える可能性がある。しかし、切片厚とシグナル数を解析した報告は認められず、切片厚が FISH 解析に及ぼす影響については明らかではない。一方、細胞診標本での FISH 解析では、薄切によるアーチファクトは認められないため腫瘍細胞の核全体の観察が可能である。さらに Liquid based cytology (以下 LBC) 法で作製した細胞診標本は、細胞間の重なりが軽減されるため個々の腫瘍細胞の詳細な観察が可能である⁷⁾。

本検討では、パラフィン切片 FISH 標本と合わせ法、LBC 法で作製した細胞診 FISH 標本の核内のシグナル数、分布、視認性について解析を行い、FISH 解析時における薄切の影響や LBC 法を用いた FISH 解析の利点について考察する。

材料および方法

1. 材 料

三重大学医学部附属病院で過去に診断された胃癌組織 1 検体と超音波内視鏡下穿刺吸引によって採取された細胞診 1 検体 (腺通常型腺癌) を使用した。

2. 方 法

パラフィン切片標本は、胃癌組織パラフィンブロックを 3 μ m, 5 μ m の厚さで連続に薄切し、標本を作製した。細胞診標本は、検体採取後、まず従来通りに合わせ法で標本を作製した。次に残りの一部を非婦人科材料用の BD サイトリッチTM レッド固定液に入れ BD 社の LBC プロトコール (Sure Path 法) に従って LBC 標本を作製した。

FISH 法は、常光社のヒストラ HER2 FISH キットを使用した。パラフィン切片標本と細胞診標本の最適プロトコールを作製し FISH 法を行った (表 1)⁸⁾。FISH DNA プローブは、キットに添付されている 17q11.2-q12 に位置する HER2/neu (spectrum orange) と Chromosome 17 Centromeric (CEP17; spectrum green) に対する混合プローブを使用した。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 710, Carl Zeiss, Germany) で各 FISH 標本を観察し Z 軸で 0.5 μ m の間隔で撮影した。各標本の視認性シグナル数、分布について解析し、(1) パラフィン切片標本と細胞診標本でのシグナル視認性の比較、(2) 各切片厚と細胞診標本のシグナル数の比較、(3) LBC 標本を用いた核内シグナルの分布、の 3 項目について検討を行った。切片厚とシグナル数の解析においては、腫瘍によるポリソミーの影響を避け

表 1 パラフィン切片標本と細胞診標本の FISH 処理工程

	胃癌組織パラフィン切片標本	細胞診標本
前処理	95-99°C, 40min	95-99°C, 5min
酵素処理	37°C, 10min	37°C, 5min
プローブ熱変性	85°C, 5min	85°C, 5min
ハイブリダイゼーション	37°C, 14h-18h	37°C, 14h-18h
プローブ洗浄	72°C, 2min	72°C, 2min

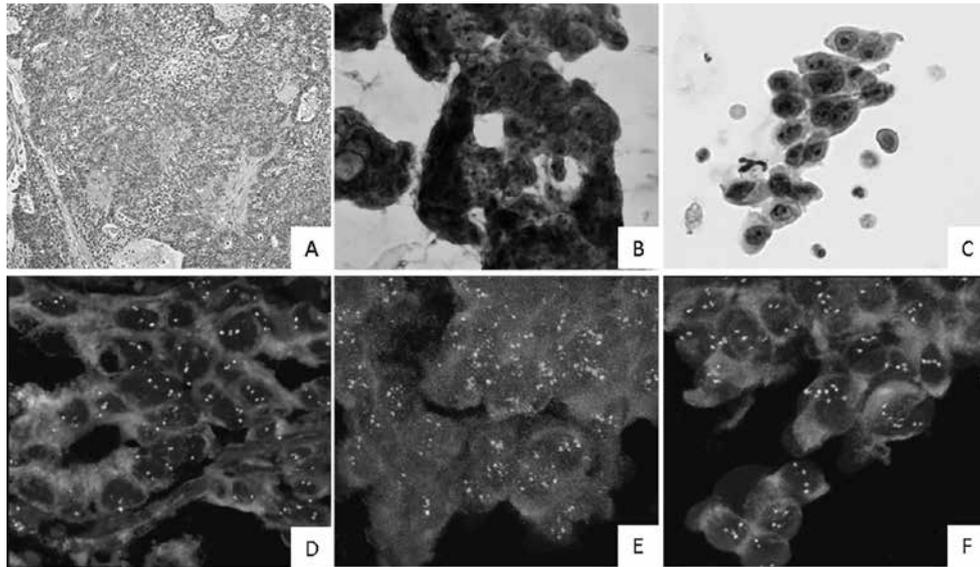


図1 パラフィン切片標本と細胞診標本のシグナル視認性の比較

A, D: Tubular adenocarcinoma (A: HE × 10, D: FISH × 60), B, E: 合わせ法 通常型腺癌 (B: Pap × 40, E: FISH × 60), C, F: LBC 法通常型腺癌 (C: Pap × 40, F: FISH × 60). パラフィン切片標本と LBC 標本では、シグナル評価が可能であるが、合わせ法では、細胞の重なりが強くシグナル評価が困難である。

るために腫瘍組織に付随した正常部位でシグナル数の計測を行った。シグナル数の計測は 20 細胞を測定した。

3. 結果

(1) パラフィン切片標本と細胞診標本でのシグナル視認性の比較

パラフィン切片標本と LBC 標本では、腫瘍細胞の核の重なりは少なくシグナルの視認性は良好であった。合わせ法で作製した細胞診標本では、シグナル強度は十分に認められたが、腫瘍細胞の重なりが非常に強く細胞境界が不明瞭であり観察が困難であった (図 1A-F)。

(2) 各切片厚と LBC 標本のシグナル数の比較

結果を表 2 に示す。パラフィン切片標本では、3 μ m で CEP17 シグナル : 1.15, HER2 シグナル : 0.95, 5 μ m で CEP17 シグナル : 1.5, HER2 シグナル : 1.75 と 2.0 以下を示し、LBC 標本と比較してシグナル数の低下を認めた (表 2, 図 2A-C)。

また、切片厚において 3 μ m と 5 μ m では、5 μ m でシグナルの検出が良好であり、細胞診検体に近接していた。

(3) LBC 標本を用いた核内シグナルの分布

LBC 標本を用いて Z 軸と断面を解析した結果、CEP17

と HER2 シグナルは、焦点の位置によってシグナルの出現および消失が認められ、核内におけるシグナルの位置および分布が異なっていた (図 3A-E)。

4. 考察

FISH 法は、癌における遺伝子増幅や融合遺伝子の検出、染色体の数的異常の解析に有用な方法であるが¹⁻⁶⁾、パラフィン切片を用いた解析では切片厚や核内シグナルの分布によって薄切による人工的なシグナルの欠失が生じる可能性がある。本検討において切片厚の違いにおけるシグナル数を解析した結果、3 μ m では CEP17, HER2 シグナル共に約 1 個分のシグナルが欠失することが明らかとなった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡での Z 軸と断面図の解析から核内におけるシグナルの分布にバラツキを認めた (図 2A-E)。これらの知見からパラフィン切片での FISH 解析は切片厚が重要な影響因子であり、FISH 解析を行う際には腫瘍細胞の切れ方によって人工的なシグナルの欠失が生じることを念頭に置いて解析する必要があると考える。

細胞診標本での FISH 解析は、腫瘍細胞の核全体のシグナルを把握することができるため、パラフィン切片標本

表2 パラフィン切片標本と細胞診標本のシグナル数の比較

	胃癌組織パラフィン切片標本				細胞診標本 (LBC法)	
	3 μ m		5 μ m		CEP17	HER2
	CEP17	HER2	CEP17	HER2		
シグナル数 (20 cell)	23	19	30	35	40	40
1細胞あたりのシグナル数	1.15	0.95	1.5	1.75	2.0	2.0

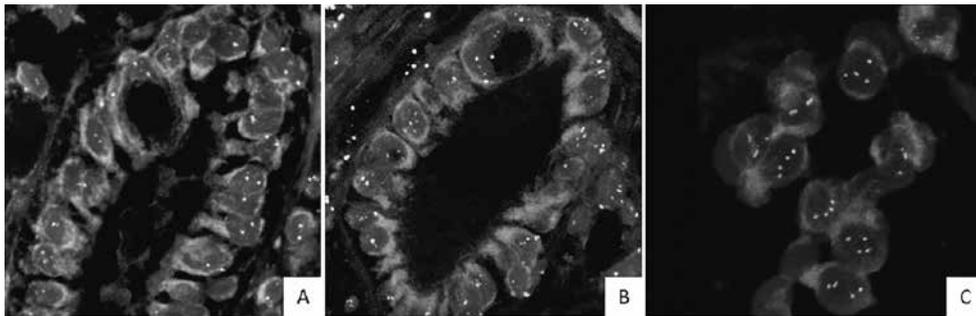


図2 各切片厚とLBC標本の比較

A: パラフィン切片標本 3 μ m, B: パラフィン切片標本 5 μ m, C: LBC 標本. 3 μ m よりも 5 μ m の標本でシグナル数が多く観察される. LBC 標本ではすべての細胞にシグナルが明瞭に観察される.

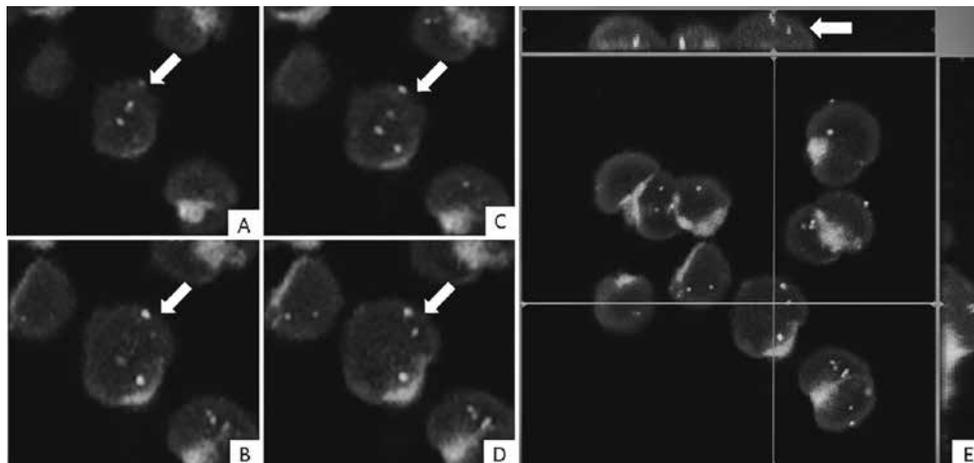


図3 FISHシグナルの分布と焦点

A-D: 同一腫瘍細胞における核内シグナルの分布. HER2/neu (赤色), CEP17 (緑色) シグナルは焦点の位置によって出現または消失し, 核内におけるシグナルの位置および分布が異なるのが分かる (矢印). E: 腫瘍細胞の断面画像. 矢印は緑色の線部分の断面画像を表し, HER2/neu (赤色) と CEP17 (緑色) シグナルの位置が異なるのが分かる.

に比べて正確な判定が可能である。しかし、従来の細胞診塗抹標本や捺印、圧挫標本では細胞間の重なりが強いため、シグナル評価が問題となる。本検討においても合わせ法で作製した細胞診標本では、細胞の重なりが強くと細胞境界が不明瞭となりシグナル評価が困難であった。これに対しLBC法では、従来法と比較して細胞同士の重なりが軽減されており、細胞境界が明瞭で個々の腫瘍

細胞の詳細な核内シグナルの解析が可能であった。よって、LBC法はFISH解析に適した標本作製方法であると考える。また、LBC法を用いたFISH解析はポリソミーや欠失などの染色体数的異常を正確に評価できる可能性があることから、脳腫瘍の1p36, 19q13の欠失の評価への有用性の検証を今後の検討課題とする。

5. 結 論

パラフィン切片標本での FISH 解析において、切片厚は重要な影響因子となりうる事が明らかとなった。また、LBC 法は細胞同士の重なりが少なく個々の腫瘍細胞の詳細な核内シグナルの観察が可能のため、FISH 解析に適した標本作製方法と考えられた。

文 献

- 1) Vanden Bempt I, Vanhentenrijk V, Drijkoningen M, et al.: Real-time reverse transcription-PCR and fluorescence in-situ hybridization are complementary to understand the mechanisms involved in HER-2/neu overexpression in human breast carcinomas. *Histopathology*. Apr;46(4):431-41, 2005.
- 2) Kanayama K, Imai H, Yoneda M, et al.: Significant intratumoral heterogeneity of human epidermal growth factor receptor 2 status in gastric cancer: A comparative study of immunohistochemistry, FISH, and dual-color in situ hybridization. *Cancer Sci*. Apr;107(4):536-42, 2016.
- 3) Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L, et al.: Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and next-generation sequencing for detection of EML4-ALK rearrangement in lung cancer. *Oncologist*. Mar;20(3):316-22, 2015.
- 4) Yamaguchi U, Hasegawa T, Morimoto Y, et al.: A practical approach to the clinical diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour and other small round cell tumours sharing EWS rearrangement using new fluorescence in situ hybridisation probes for EWSR1 on formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol*. Oct;58(10):1051-6, 2005.
- 5) Barbashina V, Salazar P, Holland EC, et al.: Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res*. Feb 1;11(3):1119-28, 2005.
- 6) Nagasaka T, Gunji M, Hosokai N, et al. : FISH 1p/19q deletion/imbalance for molecular subclassification of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol*. 24(1):1-5, 2007.
- 7) Lee JK, Choi ER, Jang TH, et al.: A prospective comparison of liquid-based cytology and traditional smear cytology in pancreatic endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration. *Acta Cytol*. 55(5):401-7, 2011.
- 8) 金山和樹, 今井裕, 米田操, 他: 市販キットを用いた胃癌 HER2 FISH 法の条件検討—各処理時間におけるシグナル視認性の比較—. *医学検査*, 64(1)72-77, 2015.

**Comparison of fluorescence in situ hybridization method
between paraffin embedded tissue section and cytology specimen**

Kazuki KANAYAMA, Chise MATSUDA, Misao YONEDA

略 歴

金山 和樹 (博士 [医学]) 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 医療栄養学科 臨床検査コース 助教

学 歴：

平成28年 三重大学大学院医学系研究科 博士課程 生命医科学専攻修了

職 歴：

平成17年 三重県健康管理事業センター 臨床検査技師

22年 三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学 技術員

28年 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 医療栄養学科 臨床検査コース

受賞歴：

平成27年 公益財団法人 がん研究振興財団 第48回がん研究助成一般課題B受賞

28年 公益財団法人 がん研究振興財団 第49回がん研究助成一般課題B受賞

学会活動：

日本臨床検査技師会 (正会員)

日本臨床細胞学会 (正会員)

日本病理学会 (正会員)

日本癌学会 (正会員)

日本免疫学会 (正会員)

主な研究活動：

HER2 腫瘍内不均一性を呈する胃癌の分子生物学的解析

FISH 法を用いた固形腫瘍における新規融合遺伝子の探索