

FISH の細胞同定を容易にする免疫染色

土浦協同病院 病理診断部

池田 聡

はじめに

免疫染色が日常検査に取り入れられるようになって、病理診断の精度が飛躍的に上がったことは言うまでもない。消化管の悪性度診断には、p53 や Ki-67 を利用することで腺管ごとに客観的な評価を行うことができる。手術例のリンパ管侵襲評価には、リンパ管を認識する D2-40 を用いることで一昔前とは全く異なる、病理医にストレスのかからない診断が可能になっている。このように免疫染色は今や病理診断には欠かせない技術であり、検査技師も病理医のニーズにこたえられるまでの染色スキルを保持できるようになった。

また最近では、蛍光 *in situ* hybridization (FISH) の病理診断への応用が行われるようになってきている。免疫染色が蛋白を検出するのに対し、FISH は細胞内の DNA の状態を検出するものである。FISH は腫瘍細胞の核内の遺伝子の状態を検出するため、正常細胞と腫瘍細胞で異なっている遺伝子の変化を客観的に、かつ定量的に可視化することができる。病理標本上の細胞に対して標的とする遺伝子の増幅や欠失、または他の遺伝子との融合などが FISH では検出できる。そのため、蛋白の過剰発現が遺伝子増幅で起きている乳癌の HER2 や融合遺伝子の存在が腫瘍発生に決定的な ALK 肺癌は、病理診断や分子標的治療の選択に欠かせない検査として現在、多くの病院で検査が依頼されている。

このようにすでに必要不可欠となり今後ますます重要な検査法として発展するであろう FISH でも、いくつか問題点がある。そのうちの重要な 1 つとして病理組織・細胞標本上で FISH を行うと、目的の細胞もそれ以外のすべての細胞も一様に反応してしまい、どの細胞が観察すべき細胞なのかわかりづらくなってしまいう点があげられる。せっかく FISH 反応自体がうまくいっていても、観察する時には核の大きさや核のいびつさなどをもとに主観的に目視で判別し、わりきって観察しなければならない。実際に日常 FISH の検査を行っている検査技師の皆様はこのような経験をお持ちと思う。

実際、筆者もこのような日常を送っている。HER2 の検査などでは腫瘍細胞はたいいて大きく、上皮結合をなしているのである程度正確な観察ができると思う。しかし、標的によっては全く不可能な事態も起こり得る。例えば FISH 標本上で T 細胞と B 細胞を区別することなどできない。B リンパ腫の組織切片上には CD3 に染まる T 細胞が意外に多く存在することは免疫染色を見ている皆様にはよく理解できると思う。確実に目的の細胞を識別するためにはやはり客観的な方法を加えなければならない。

方法

筆者はこのような問題に対し、すでに上述のように信頼を獲得している免疫染色を蛍光標識で FISH の前に行い、目的の細胞を認識しつつ FISH の DNA シグナルを観察できる方法を検討した¹⁾。つまり、FISH の目的とする細胞同定を容易にするために免疫染色を用いるのである。この研究では FISH の簡略化が当初の目的であったが、応用することで二重選出もできることを見出した。この玉手箱シリーズでもすでに述べているが²⁾、当初の方法では蛍光染色を行った後 FISH のために再度熱賦活を行っていた。しかし、追試していただいた先生方からもご指摘があったように、これではせっかくの蛍光発色が減衰する傾向があり、最近ではこのことに対し再度の熱賦活は行わない方法をとっている。再度熱賦活を行わなくても FISH のシグナルは十分観察できるし、蛍光免疫染色も十分明るいままである。プロトコルは表 1 に示す。この方法が有効な 1 つのケースは低分化な胃癌の症例で HER2 FISH 検査を行う場合であろう。組織中にばらばらと散らばるように癌細胞が存在し、FISH 標本下ではどれが癌細胞であるかわかりづらい。このようなケースではサイトケラチン(AE1/AE3 など)で上皮細胞を標識しておいて HER2 FISH を行う(図 1a, b, c, d, e)。

別な具体例を挙げるとホジキン病のリンパ節中の CD30 陽性細胞を蛍光染色で染めておき、IgH 遺伝子のブレイクアパルトプローブを FISH したものを示す(図 2a, b)。

また、この方法を用いて蛋白と遺伝子異常の関係を細胞ごとに調べることもできる。光学的に HER2 の DNA と蛋白を二重検出するシステムもすでに市販されているが、我々の方法を用いることで任意の抗原、DNA に対してそのような観察は可能である。図 3 では ALK 肺がんにおいて見られる ALK 遺伝子の分離シグナルと ALK 蛋白の過剰発現を同時に観察できる。

今回紹介しているプロトコルは簡便であり、どの施設でも実施可能であるが、各施設の標本の固定条件などで多少変更が必要かもしれない。それから、蛍光染色については抗原の量が標的によってかなり差があり、その差が明瞭に出る蛍光染色では通常の可視光的な免疫染色の一次抗体の希釈率を多少検討する必要がある。それから抗原賦活化処理は熱処理であるため、通常は蛋白分解酵素処理を用いる抗体に関しては熱による賦活化を検討しなければならない。例えば図 1 でサイトケラチンは FISH シグナル強度とのバランスを取るため通常の 3 倍に希釈してある。

表 1 蛋白-DNA 二重検出プロトコル

1. 脱パラフィン
2. NP-40 を 0.3% 加えたニチレイバイオサイエンス社抗原賦活液 pH9 で 97°C のウォーターバス中にて加温 (30 分)
3. クールダウン (20 分)
4. 洗浄後正常血清処理
5. 一次抗体 (90 分から一晩)
6. 洗浄 15 分
7. ビオチン標識二次抗体 (30 分)
8. Alexa fluor 488 標識ストレプトアビジン (30 分)
9. 洗浄後 4%ホルマリンにて 5 分再固定
10. DNA プローブを滴下して 97°C で 5 分単鎖化
11. 急冷
12. 42°C でハイブリダイゼーション (5 時間から 1 晩)
13. 42°C のトリスバッファー/0.3%NP-40 で洗浄 15 分
14. 水洗, 乾燥後 DAPI で核染および封入

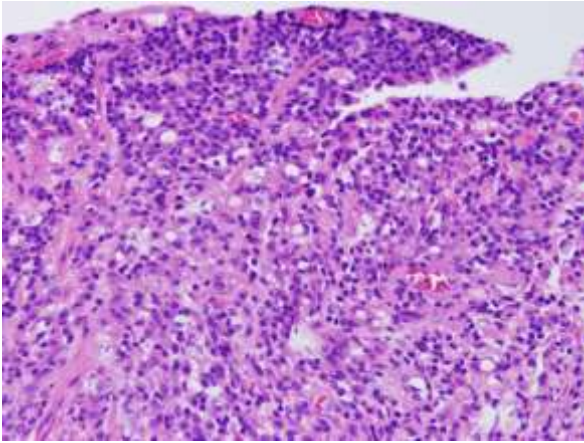
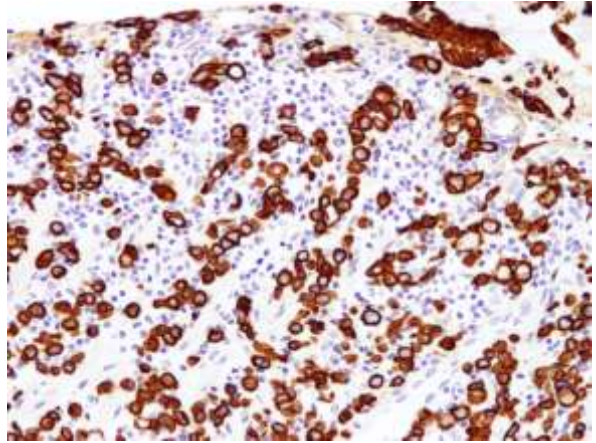
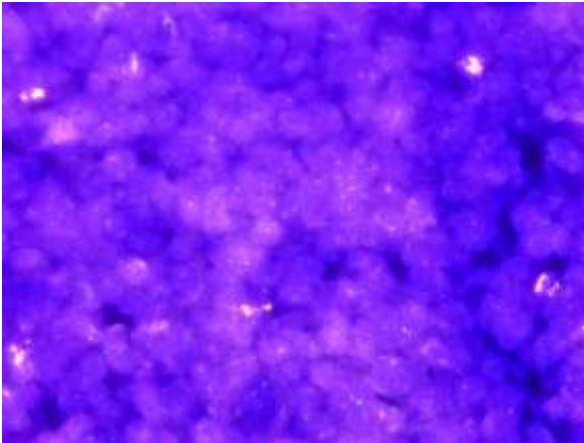


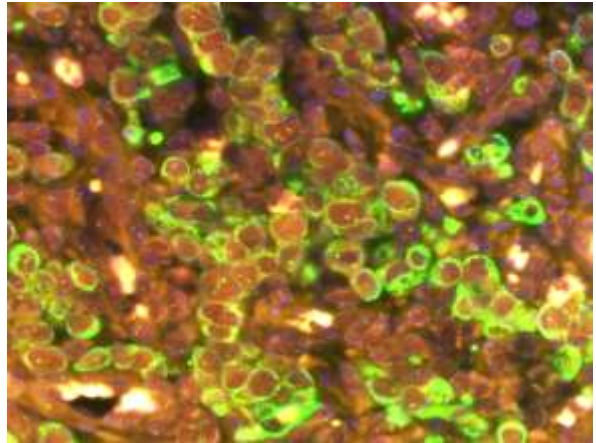
図 1 a 低分化腺癌の 1 症例 (胃手術材料)
HE 染色 腫瘍細胞がリンパ球と混在している。



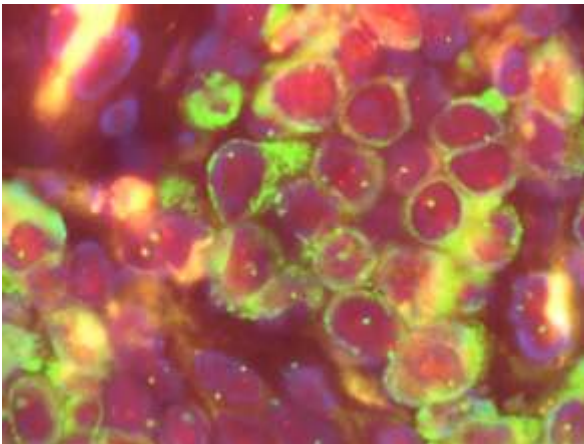
b 胃低分化腺癌におけるサイトケラチン染色
HE では鑑別が困難であった腫瘍細胞が明瞭に検出できる。これで確認しつつ FISH ができたら…



c 通常の HER2 FISH
せっかく FISH を行なっても、どれが癌細胞か区別がつかない。



d 二重検出 (通常の HER2 FISH と抗 HER2 抗体 (緑色)) (×400)
腫瘍細胞を認識しつつ FISH のシグナルを計測することができる。



e 強拡大での観察 (×1000)
HER2 のシグナルの確実な計測が可能である。

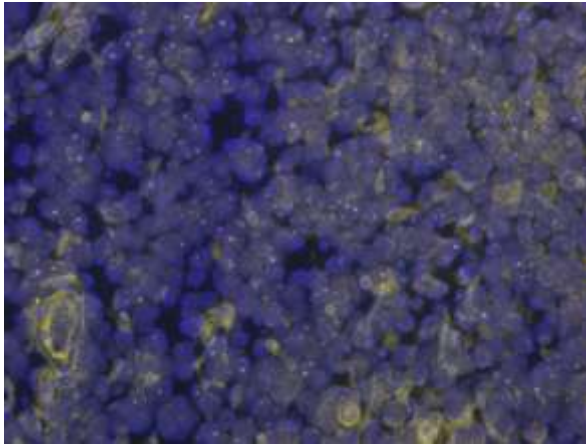
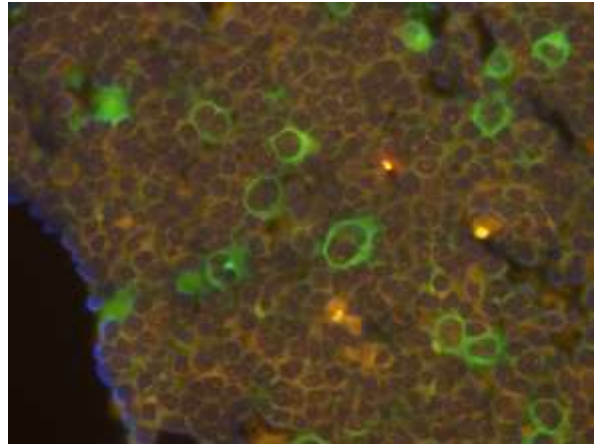


図 2a ホジキン病リンパ節での FISH
どれがホジキン細胞か区別しづらい。



b 二重検出 (通常の IgH FISH と抗 CD30 抗体 (緑色)) (×400)
CD30 で標識しておくともホジキン細胞が明瞭に区別できる。

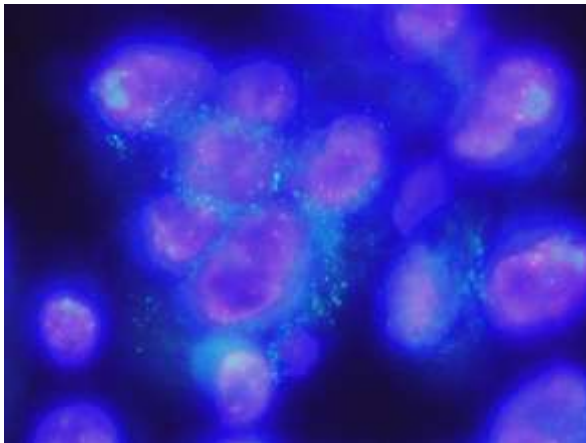


図 3 ALK 肺がんにおける二重検出 (ALK 分離遺伝子と抗 ALK 抗体 (緑色)) (×400)
蛋白が顆粒状に検出される。核内には分離シグナルが見られる。

おわりに

病理検査における FISH 検査のニーズは今後ますます高まる。腫瘍の原因である融合遺伝子の報告は年々増えており、この場合、FISH 検査が腫瘍診断に決定的なものとなる。腫瘍は遺伝子の変化で起きるものであるから、遺伝子そのものを調べることは必要不可欠であり、遺伝子産物である蛋白 (分子標的療法の標的となっているものもある) の検査と共に将来ますます重要なものとなっていくであろう。病理診断は飛躍的進歩をしつつある。追いつける距離のうちに研鑽して追いついて行かなければ、我々は目の前の患者に役立つことはできない。

参考文献

- 1) 池田 聡、内田佳介、鈴木恵子、江石義信：酵素処理を用いない FISH 法プロトコルの簡素化および FISH+蛍光免疫二重検出 病理と臨床 2011;29(11)1275~1278
- 2) 池田 聡：抗原賦活液 pH9 を利用した蛍光 in situ hybridization 法プロトコルの簡略化+蛍光免疫染色二重検出法の開発 ニチレイバイオサイエンス染色玉手箱 http://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/pdf/tech_21_dr_ikeda.pdf