



レーザーマイクロダイセクション法 —病理組織や細胞診検体への応用—

日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

中西陽子

はじめに

レーザーマイクロダイセクション法は、スライドガラス上の組織切片や細胞の塗沫標本から、分子学的に解析したい組織や細胞を自分の眼で見ながら高精細に回収できる方法である。実験的に作製、あるいは培養された組織や細胞と異なり、医療機関で病理組織診や細胞診を行うために患者から採取される検体は、実に多様な組織や細胞が混在している。このような臨床検体を試料として用いるとき、本法は有用とされている。

レーザーマイクロダイセクション法とは

レーザーマイクロダイセクション法は、米国のMichael R. Emmert-Buck博士とRobert F Bonner博士らが原理を発明し、National Cancer Institute (NIH)におけるがん遺伝子探索プロジェクトのために開発された方法である¹⁻³⁾。がん患者の癌細胞に生じている遺伝子異常を見出すためには、組織中に混在する様々な細胞から、がん細胞だけを回収する必要があった。この方法は、赤外レーザーで標的組織や細胞をキャプチャーするLaser Capture Microdissection (LCM)法であったことから、レーザーマイクロダイセクションの略語はLCMが多く使われている。現在は、UVレーザーを用いた異なる原理の機器も開発されており、Laser Microdissection (LMD)法と表記されることも多い。

レーザーマイクロダイセクション法は、レーザーを用いて、検索対象とする組織や細胞を顕微鏡下で同定して回収する方法であり、自分の眼で確認した組織や細胞を直接回収することができる。がん患者全員のがん細胞の初代培養を行わなくても、がん細胞だけを効率よく取り出してその後の網羅的な解析を行うことができるサンプリングツールとなったのである。



レーザーマイクロダイセクション法の原理

本法を行うためには、レーザー発振器と顕微鏡から構成される専用の装置と、フィルムが貼付された専用スライドガラスを必要とする(図1)。このフィルムは脱パラフィンなどで使用する有機溶媒、熱(200℃での乾熱滅菌)、凍結(-80℃)に強く、核酸抽出などに影響を与えない特殊なフィルムである。組織切片や細胞は、それらが貼りついているフィルムごと、レーザーで回収され、機種毎に特徴的なサンプル回収原理がある(図2)。

レーザーマイクロダイセクション法として最初に開発されたのがレーザーキャプチャー法である(図2-A)。現在はIRレーザーとUVレーザーを組み合わせた方式となり、微小切片の正確な回収に特徴がある。倒立型顕微鏡で位相差対物レンズからレーザーが照射されて専用の回収ジグに接着する方法もある。ムーブ&カット方式(図2-B)は、正立型顕微鏡の対物レンズを通して上部からレーザーが照射されて切り取られ、重力に依存して下のチューブやキャップに回収される。試料側となるステージではなく、レーザーが動いてカットする方式が採用されている。レーザープレッシャーカタパルティング(LPC)法(図2-C)は、倒立型顕微鏡の対物レンズを通して下方からレーザーが照射されて上部にセットしたチューブキャップに回収される。LPC-ドット法(図2-D)は、フィルムのない通常のスライドガラスが使用可能であり、面ではなく、レーザー照射による細片でサンプルを回収する方法である。フィルム貼付スライドガラスでは困難な免疫組織化学染色標本からの回収なども可能である。

レーザーは、焼き切るというイメージがあり、核酸や蛋白質へのダメージが懸念されやすいが、現在用いられているUVレーザーは、生体組織に吸収された光が内部エネルギーとなることで細胞間の分子結合の解離が生じるという光解離蒸散作用を有するため、回収サンプルへの影響は少ないとされ、次世代シーケンサー(NGS)を用いたDNAやRNAの網羅的解析への応用も可能である。

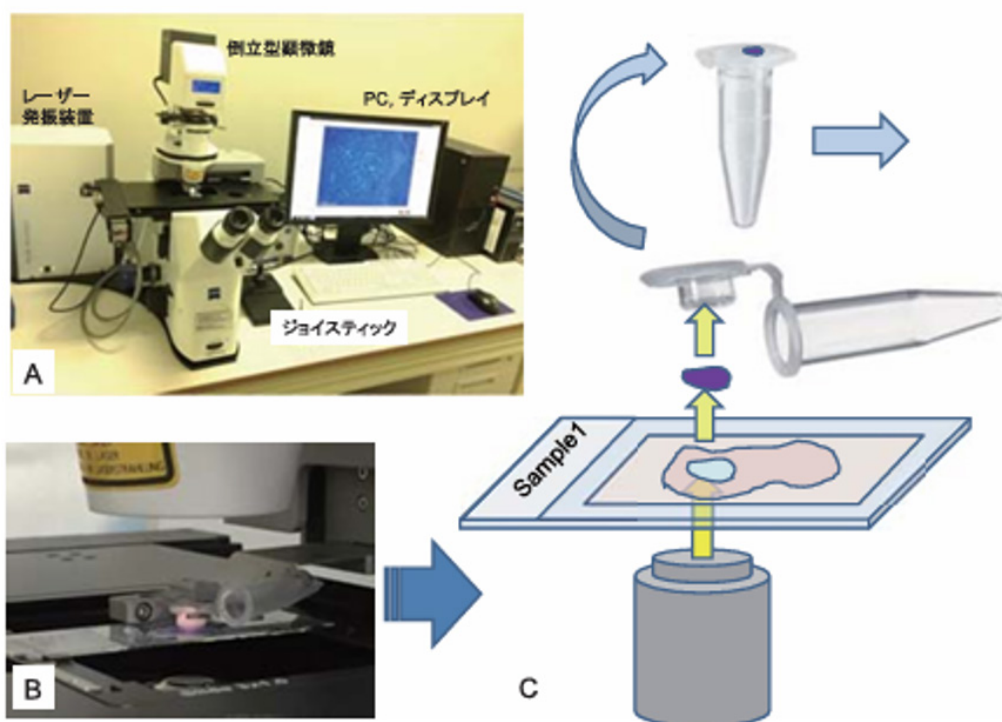


図1 レーザーマイクロダイセクション法(文献3より引用)

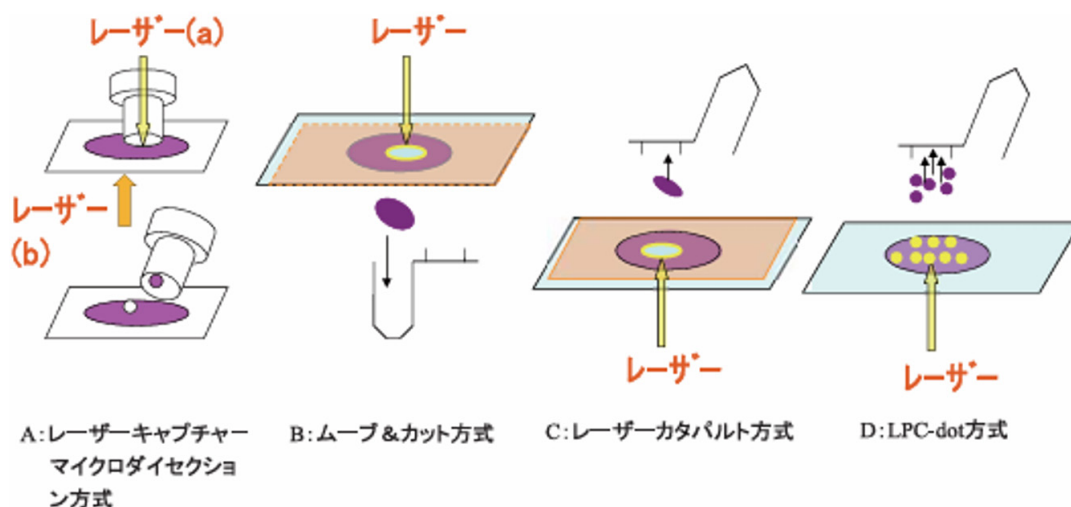


図2 レーザーマイクロダイセクション法の原理(文献3より引用)

マイクロダイセクションとマクロダイセクション

臨床検体には多様な組織や細胞が含まれているため、対象とする病変組織や異型細胞に生じている遺伝子異常やタンパク発現異常を解析したい場合、標本全体を解析してしまうと、結果がどの細胞のものかわからない。しかし、現在がんゲノムとして行われている遺伝子パネル検査において、レーザーマイクロダイセクションを行うことはなく、マクロダイセクションという用語が用いられている。マイクロとマクロの違いは何か、解析結果にどのような違いがあるのだろうか。

レーザーマイクロダイセクション法を用いると、例えば標本中のがん細胞だけを解析したい場合、がん細胞だけを選択して回収することができる。がん組織中にリンパ球や血管が多数存在するような場合も、がん細胞だけを丁寧に回収することが可能であり、ここから抽出されたDNAやRNAは概ね100%が標的細胞由来と考えられる(図3)。細胞診検体も様々な細胞が混在している(図4)。細胞診検体を用いてマイクロダイセクションを行いたい場合は特に細胞の重なりが必要で、液状化細胞診(LBC法)などが有用である。標的となるがん細胞だけに生じた遺伝子異常を知りたいとき、RNAの発現量を解析したいとき、他の細胞が混在していると、結果が不確実となる。一方、診断や治療のためのマーカーとなる既知の遺伝子変異(DNA解析)や融合遺伝子(RNA解析)を検出したい場合は、検出するということが目的となるため、検出感度以上のがん細胞が含まれていればよいということになる。これらのマーカー遺伝子が検出されれば、その遺伝子異常を有する細胞が標本中に存在するということが示されるからである。このため、主に既知の遺伝子異常を検出する診療としての遺伝子検査では、厳密なマイクロダイセクションではなく、検出感度以上の標的細胞を含む領域を選択するマクロダイセクションが必要十分な手技となる。

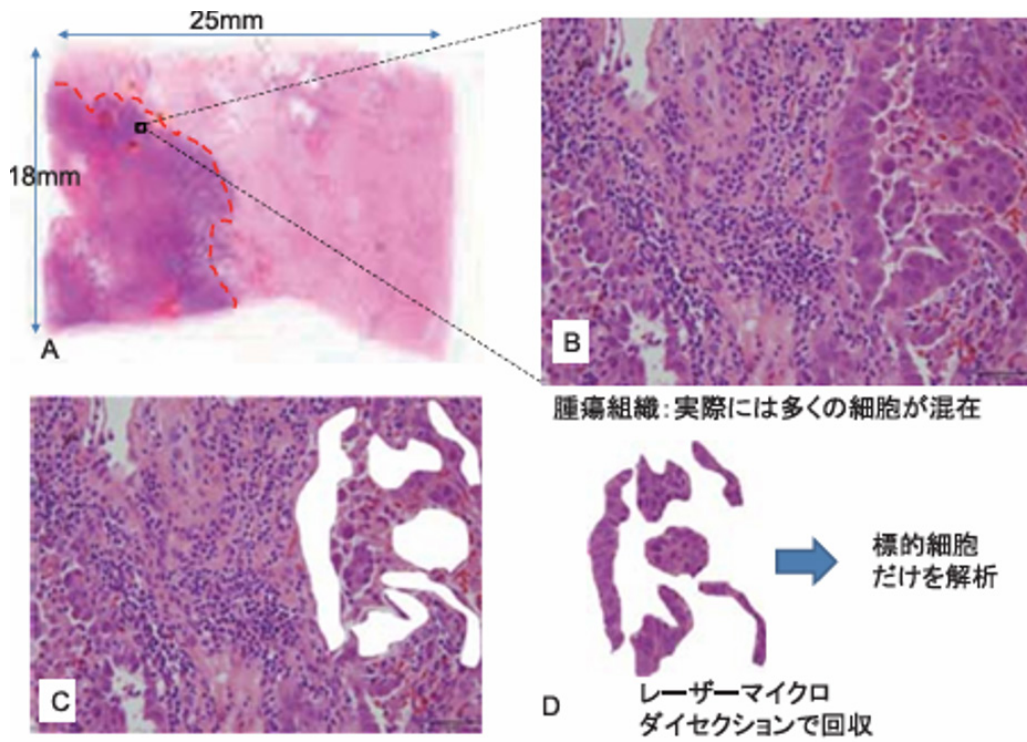


図3 がん患者の病理組織に含まれる多様な細胞とレーザーマイクロダイセクション法による回収(文献3より引用)

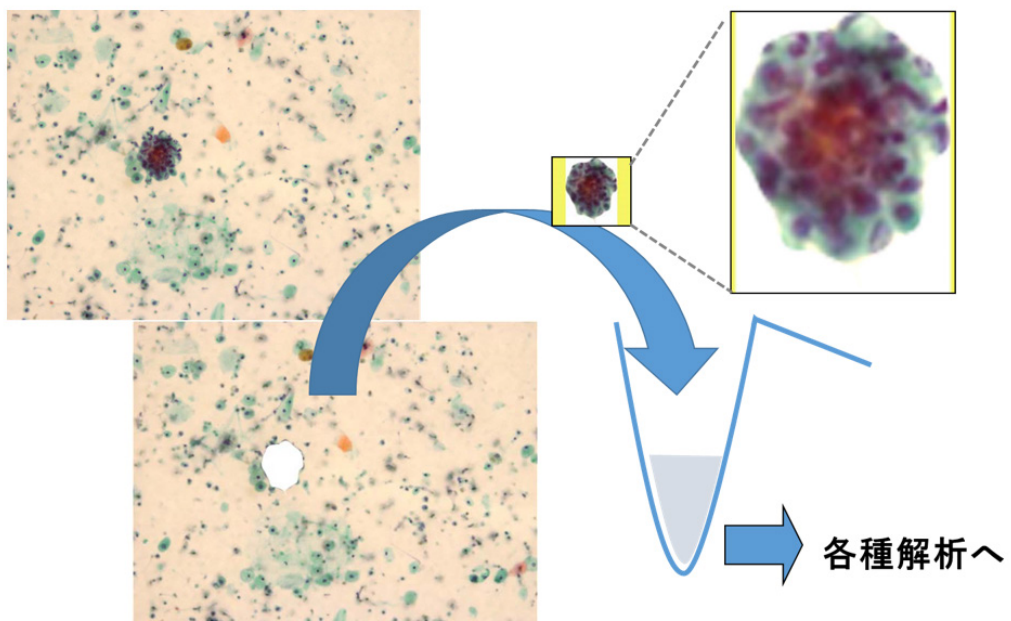


図4 がん患者の細胞診検体に含まれる多様な細胞とレーザーマイクロダイセクション法による回収(文献4より引用)



おわりに

レーザーマイクロダイセクション法は、組織や細胞を顕微鏡下で同定できる知識はもちろんであるが、さらに時間と手間を要する技術であるため、診療に即導入することは難しい。しかし、患者から採取された組織や細胞は、患者の病態や治療効果などの臨床情報と、病理形態学的情報や位置情報、遺伝子やタンパク質などの分子情報が含まれる貴重な検体である。本法によって、これらを同時に、総合的に解析することは、病態の解明、診断や治療のさらなる発展のために重要である。

文献

1. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser Capture Microdissection. *Science* 1996;274:998-1001.
2. 寺島香織、小島清嗣. Laser Capture Microdissection. *組織培養工学*2001;27:72-75.
3. 中西陽子、増田しのぶ. 病理組織を用いたレーザーマイクロダイセクション法と遺伝子解析～基礎から臨床まで～. *日本組織細胞化学編 組織細胞化学2024* pp133-142 (2024).
4. 中西陽子、根本則道. 細胞診検体からのレーザーマイクロダイセクション法. *日本組織細胞化学編 組織細胞化学2006* pp143-148 (2006).