

第26回日本臨床細胞学会
関東連合会学術集会

シンポジウム

「新しい細胞診技術による診断精度の向上と臨床支援」

LBCを用いた 分子病理診断の現状と可能性

東海大学医学部付属病院病理検査技術科¹⁾

東海大学医学部基盤診療学系病理診断学²⁾

伊藤 仁¹⁾, 小山田裕行¹⁾, 古田島繁美¹⁾, 加戸伸明¹⁾, 宮嶋葉子¹⁾

芹澤昭彦¹⁾, 井野元智恵²⁾, 梶原博²⁾, 中村直哉²⁾

平成24年9月8日(土)

高 崎 市

はじめに

免疫組織化学(IHC)が広く普及し, FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) 法などの分子病理学的な技術も応用されるようになり, 近年, 実際の病理診断へ用いられるようになってきた. これらは通常, 組織切片が対象であるが, これまで我々は, IHC法をはじめとする様々な技術を細胞標本に応用してきた.

本発表では, 分子病理技術のエタノール固定標本, LBC標本, Pap標本など, 細胞標本への応用について概説する.

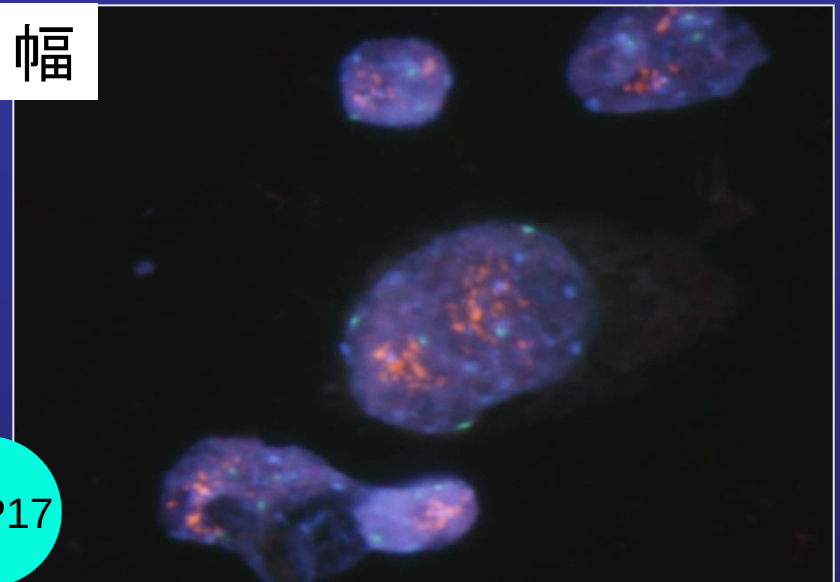
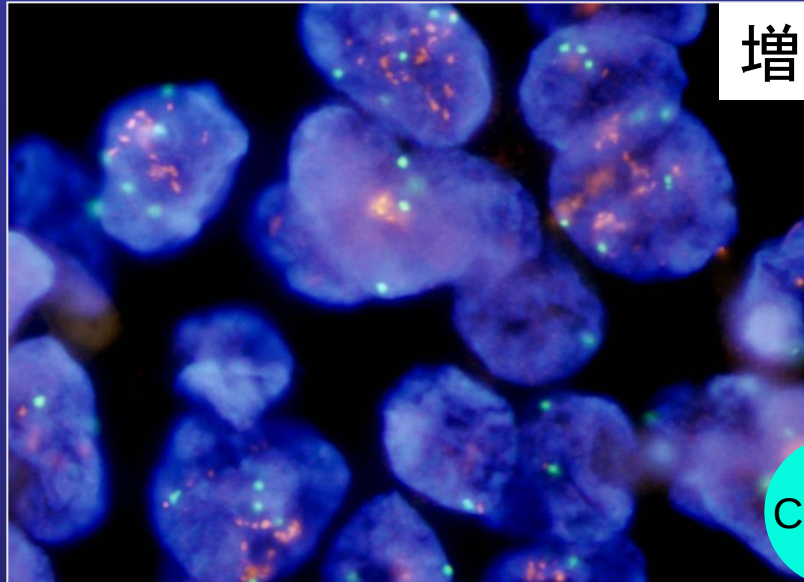
分子病理技術

- FISH 法
 - Fluorescence *in situ* hybridization
- DuoCISH 法
 - Dual color chromogenic *in situ* hybridization
- DISH 法
 - Dual color *in situ* hybridization
- PCR 法
 - Polymerase Chain Reaction

乳癌における細胞標本を用いた HER2-FISH 遺伝子増幅の検出

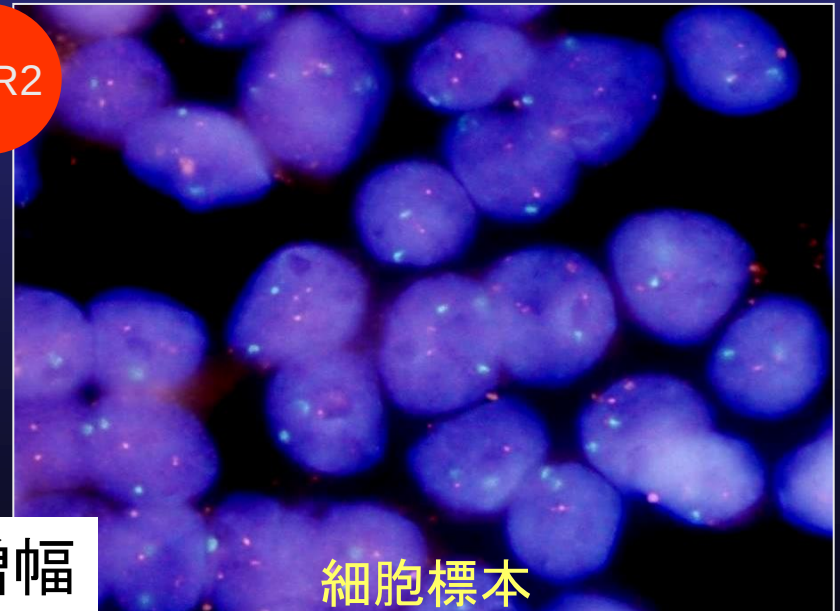
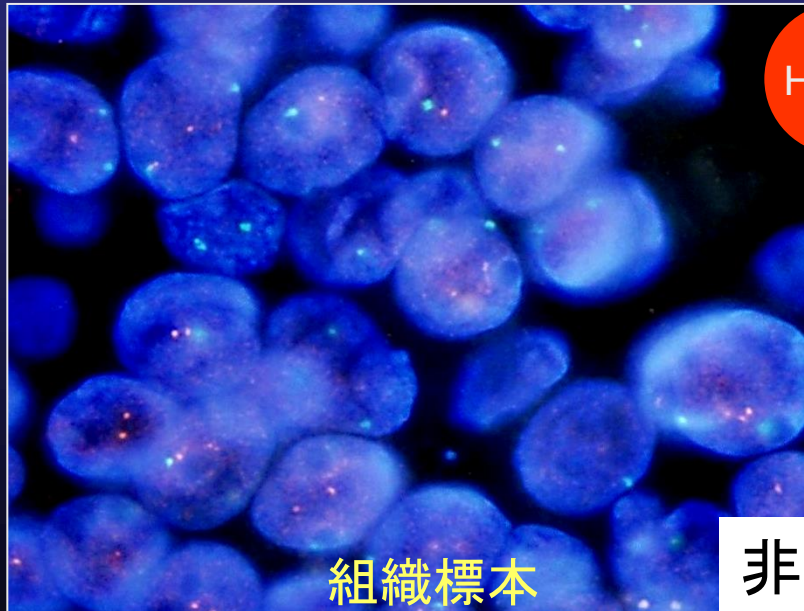
HER2 FISH

増幅



CEP17

HER2



組織標本

非増幅

細胞標本

組織標本と細胞標本のHER2/CEP17比較

症例	HercepTest	組織標本	細胞標本
1	3+	5.89	3.55
2	3+	3.38	4.47
3	3+	3.55	2.56
4	3+	7.07	5.97
5	3+	2.70	2.22
6	2+	11.02	6.38
7	2+	1.15	1.07
8	2+	1.56	1.49
9	2+	1.23	1.08
10	2+	1.17	1.24
11	2+	1.27	1.12
12	2+	1.33	1.13
13	2+	1.53	1.14
14	2+	1.18	1.14
15	2+	1.33	1.28
16	2+	1.30	1.32
17	2+	1.63	1.37
18	2+	1.16	1.26

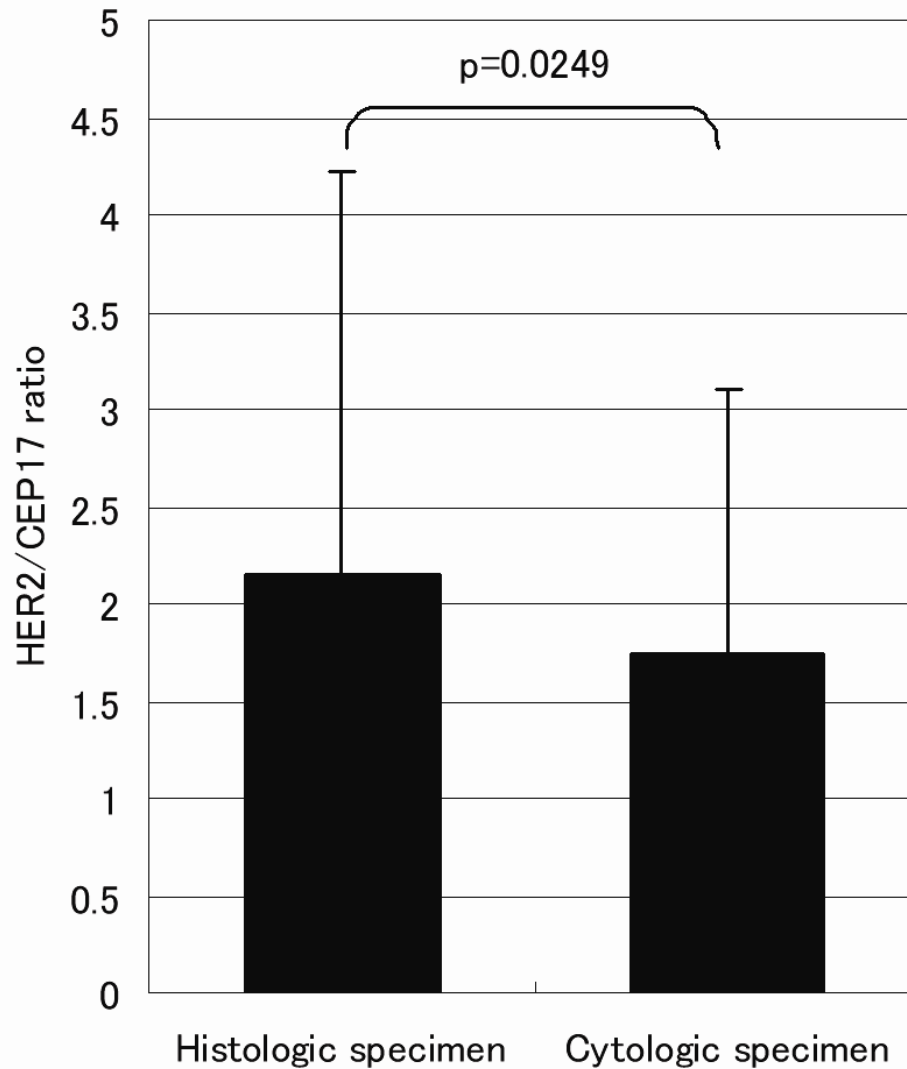
症例	HercepTest	組織標本	細胞標本
19	2+	1.17	1.01
20	2+	1.59	1.11
21	2+	1.61	1.20
22	2+	1.29	1.19
23	2+	1.87	1.26
24	1+	1.11	1.11
25	1+	1.30	1.22
26	1+	1.26	1.04
27	1+	1.24	1.03
28	1+	1.14	1.18
29	1+	1.85	1.23
30	0	1.07	1.02
31	0	1.19	1.08
32	0	1.40	1.37

HER2 / CEP17 > 2.2: 増幅

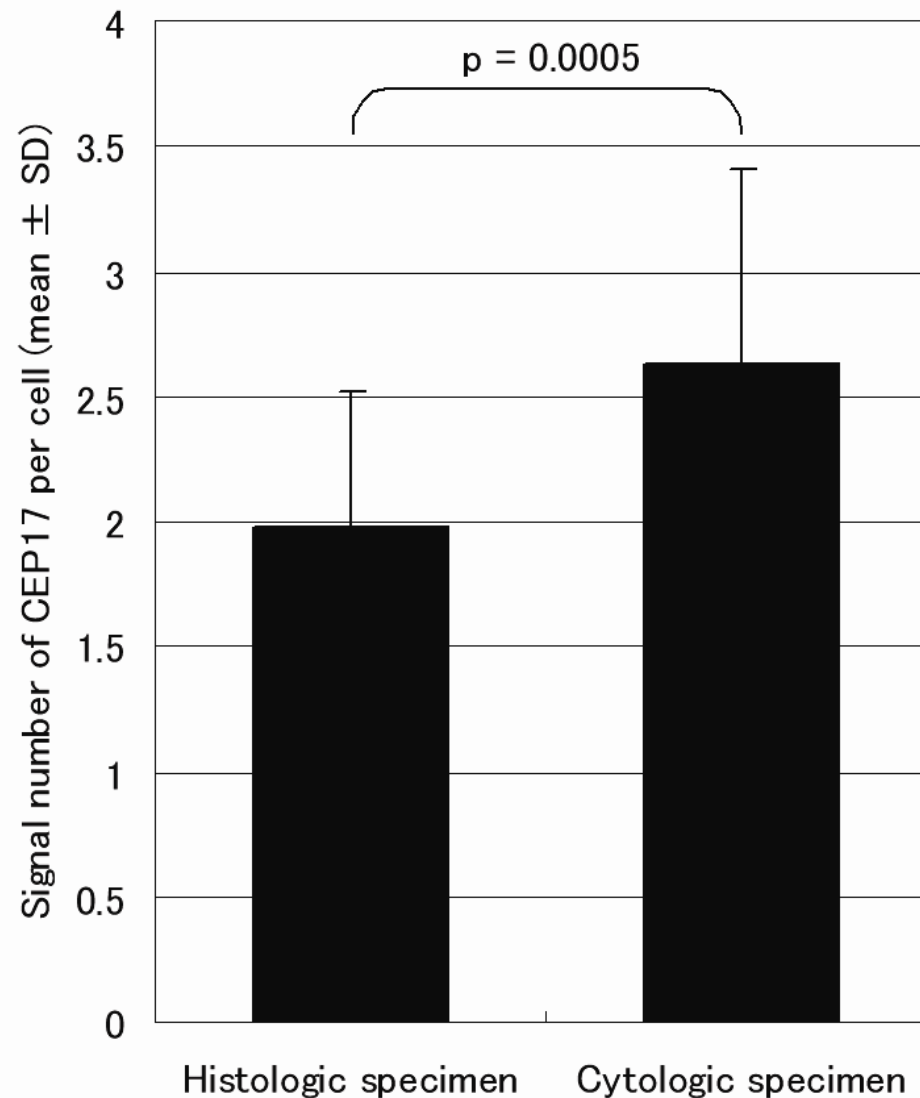
1.8 ≤ HER2 / CEP17 ≤ 2.2: equivocal

HER2 / CEP17 < 1.8: 非増幅

HER2/CEP17の比較



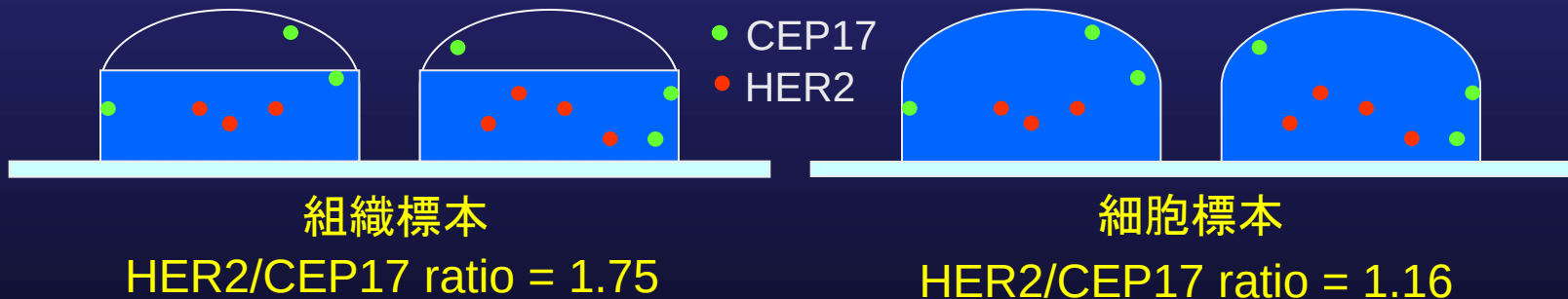
CEP17シグナル数の比較



細胞標本を用いたFISH

組織標本ではCEP17(セントロメア)は核膜近傍(ヘテロクロマチンが多い領域)に位置するため、薄切によって失われやすく、細胞標本を用いたFISH法は、正確なHER2/CEP17判定に有用である.

HER2 / CEP17 組織標本 > 細胞標本



Itoh H, et al: Lower HER-2/chromosome enumeration probe 17 ratio in cytologic HER-2 fluorescence in situ hybridization for breast cancers: three-dimensional analysis of intranuclear localization of centromere 17 and HER-2 signals. Cancer. 2008; 114: 134–140.

分子病理技術

- FISH 法
 - Fluorescence *in situ* hybridization
- DuoCISH 法
 - Dual color chromogenic *in situ* hybridization
- DISH 法
 - Dual color *in situ* hybridization
- PCR 法
 - Polymerase Chain Reaction

DuoCISH

Denaturation &
Hybridization

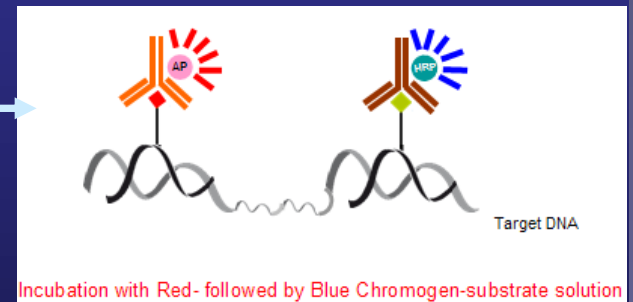
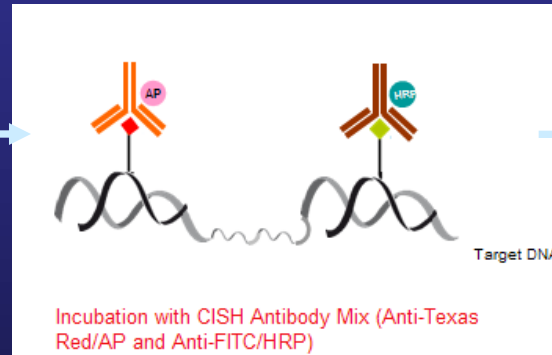
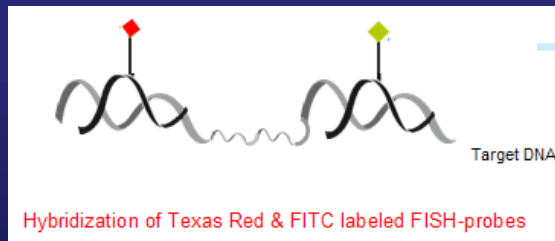
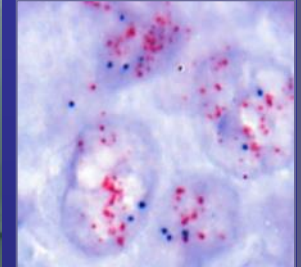


FISH post-
hybridization

→ CISH steps →



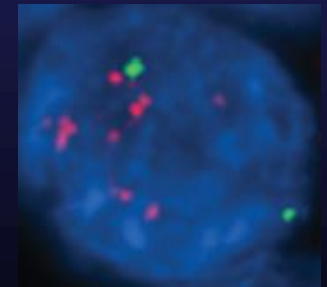
Scoring



FISH



Scoring

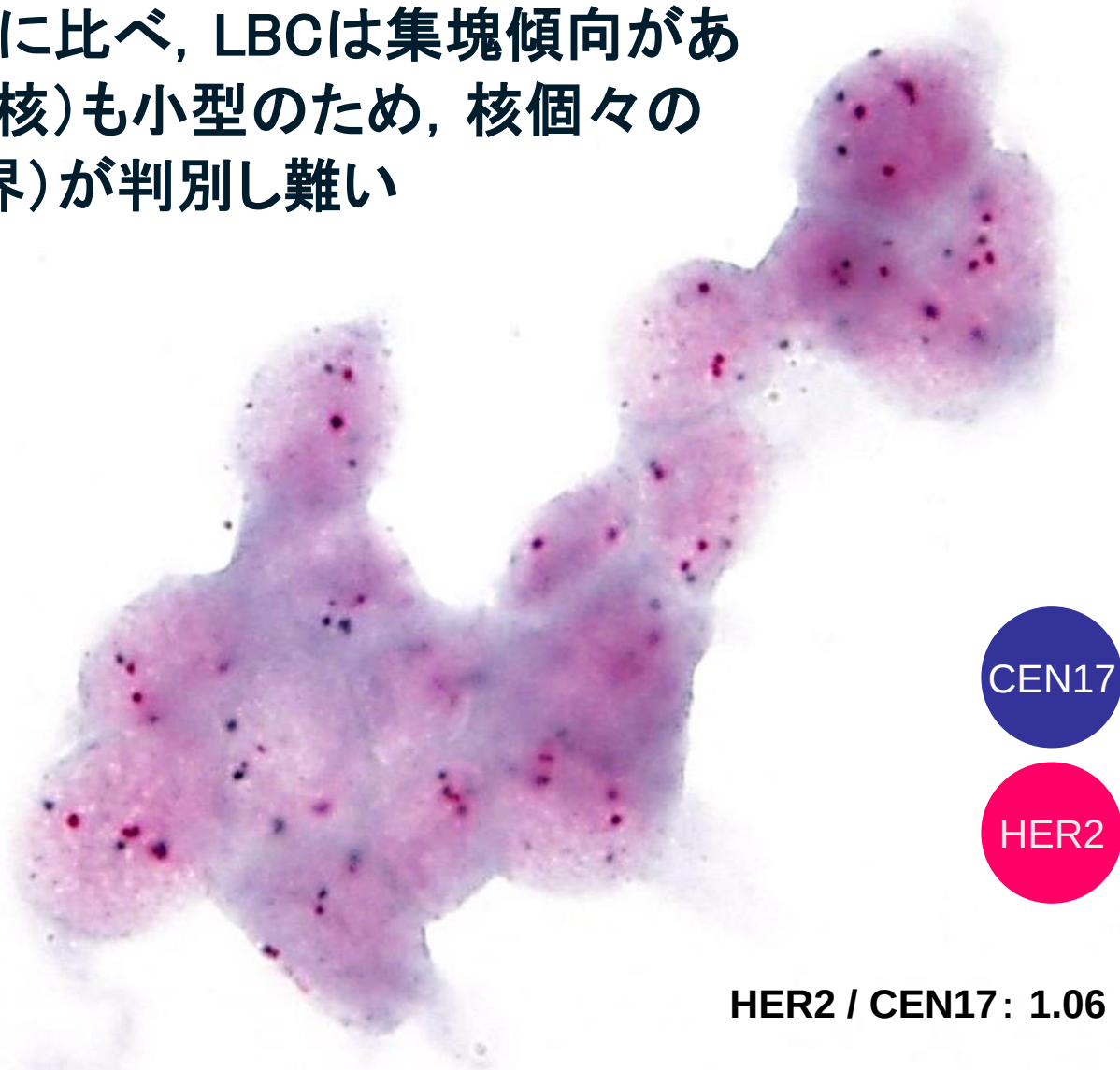


DuoCISH HER2増幅症例



DuoCISH HER2非増幅症例

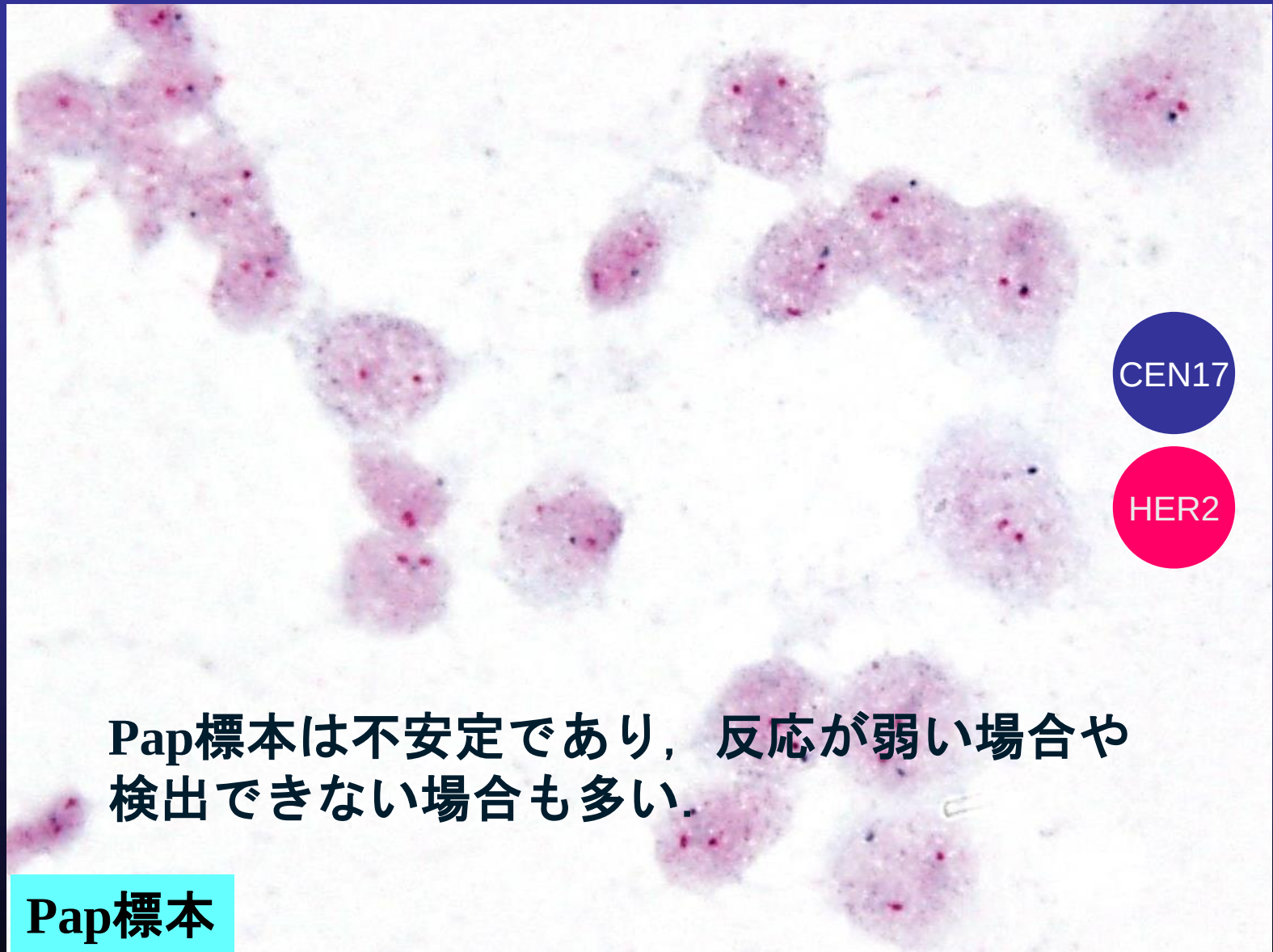
塗抹標本に比べ、LBCは集塊傾向があり、細胞(核)も小型のため、核個々の認識(境界)が判別し難い



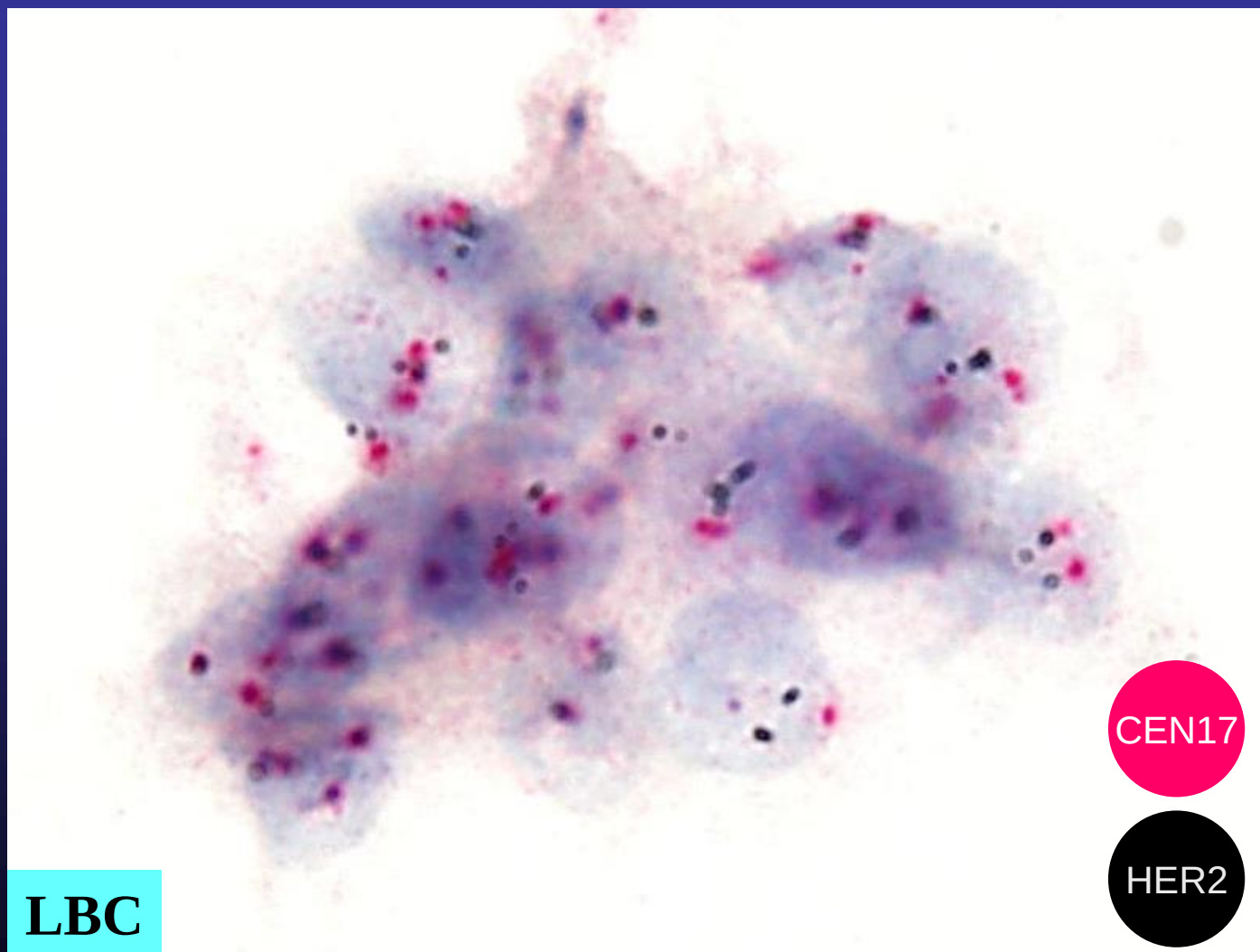
LBC

HER2 / CEN17: 1.06

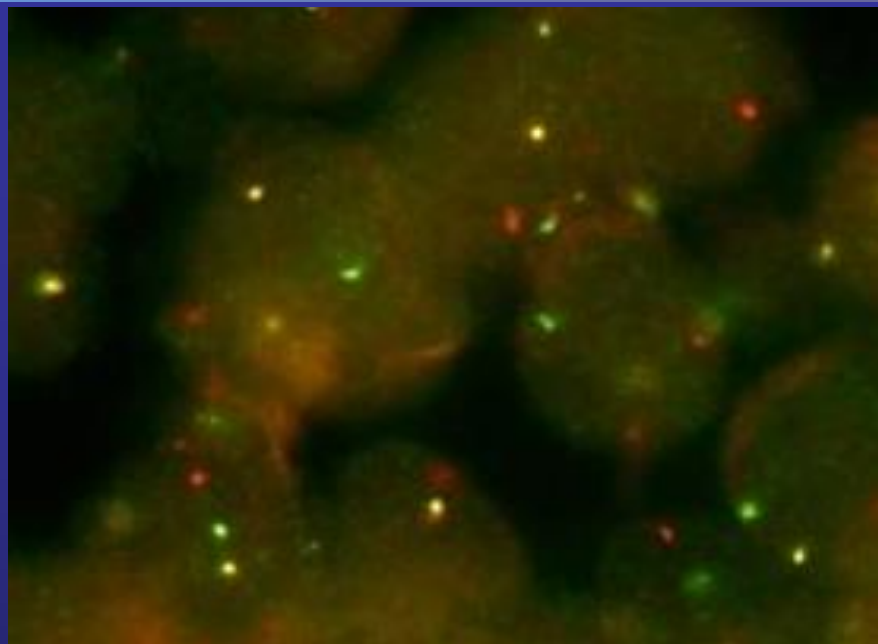
DuoCISH HER2非増幅症例



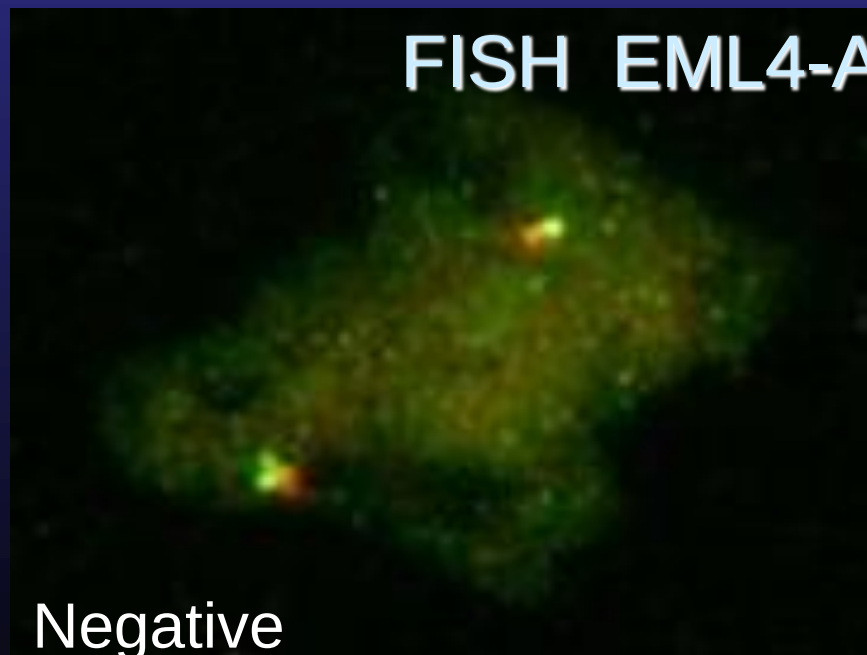
DISH HER2(非増幅症例)



FISH 肺腺癌における
転座・逆位 EML4-ALK
break apart probe



FISH EML4-ALK (Pap標本)

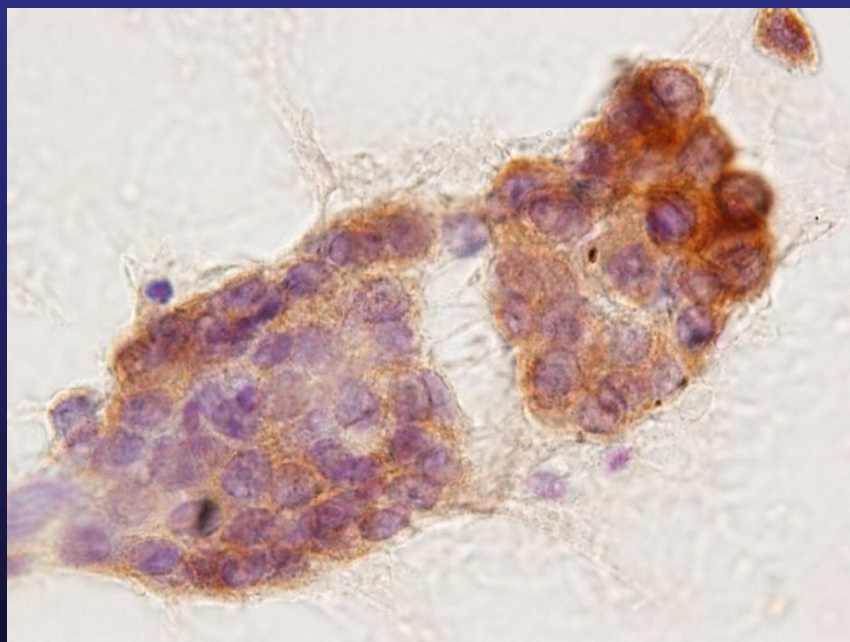


Negative



Positive

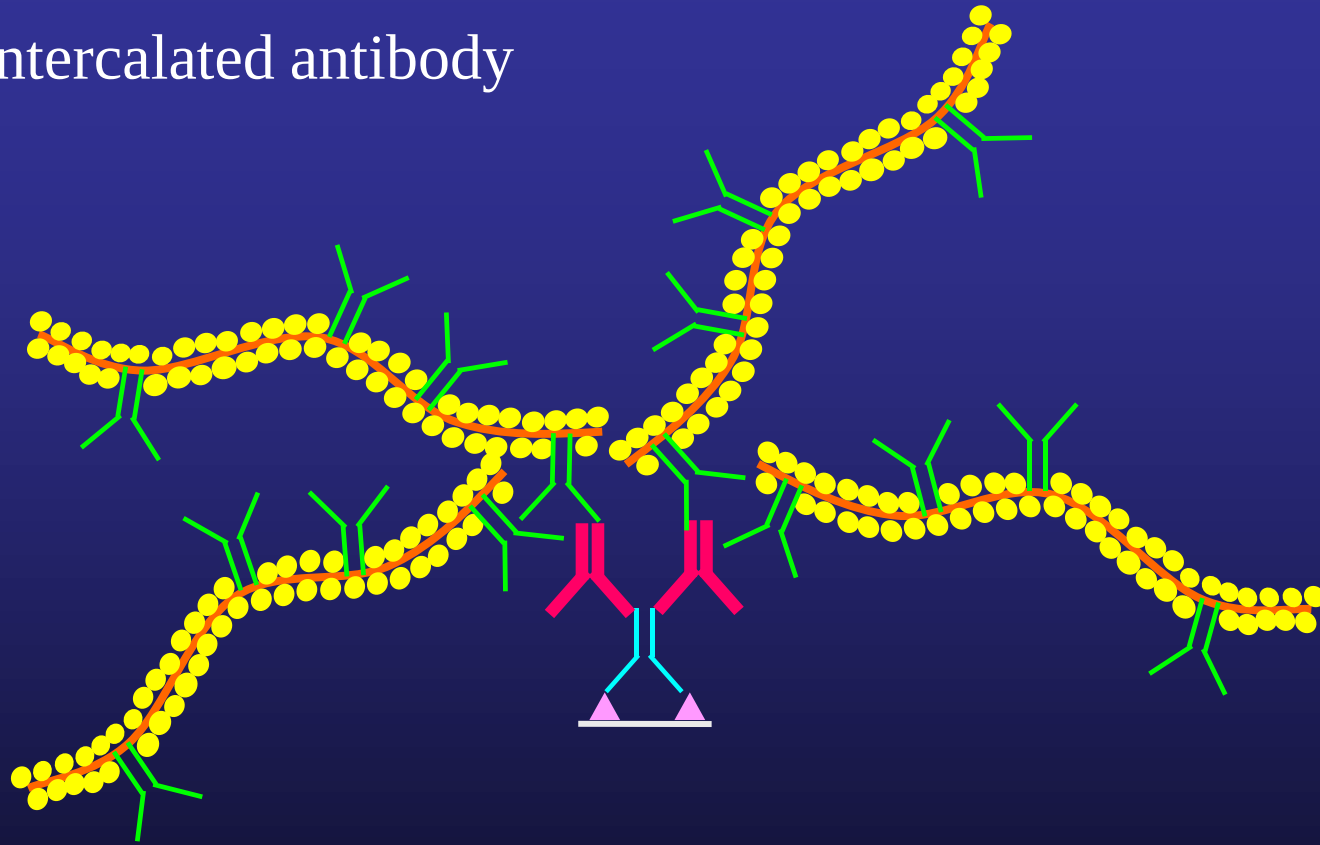
細胞標本のEML4-ALK 免疫染色 iAEP法 (intercalated antibody-enhanced polymer)



iAEP 法



intercalated antibody



▲
抗原

Y
一次抗体

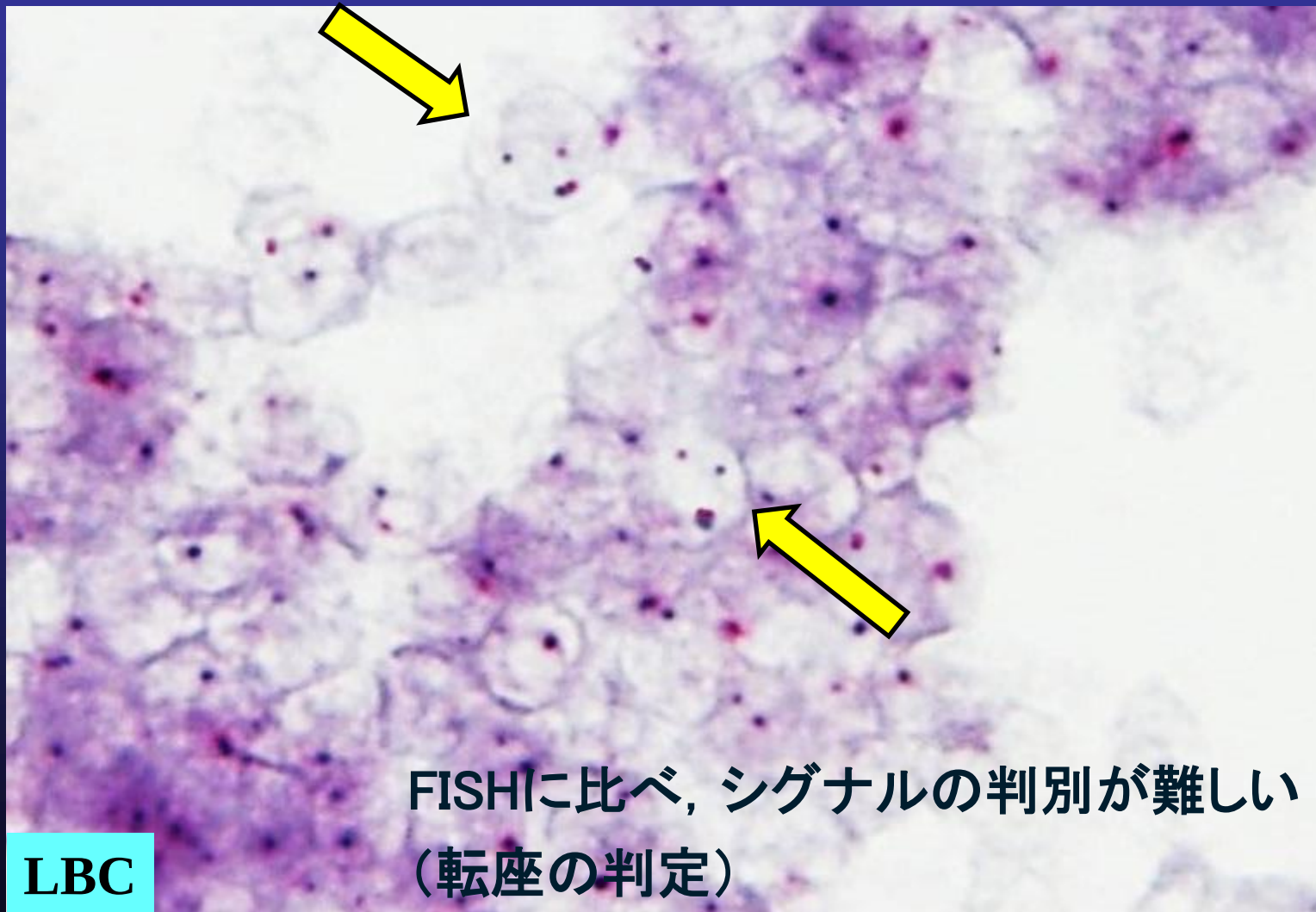
Y
二次抗体

●
ペルオキシダーゼ

~~~~~  
ポリマー

# FL (G1-2) における染色体異常 IgH/bcl2 t(14;18)転座

Duo CISH 法 IGH-BCL2 break apart probe



LBC

FISHに比べ, シグナルの判別が難しい  
(転座の判定)

# 細胞標本を用いた場合の特徴

1. 真のシグナル数が得られる.
  - ポリソミーの判定に有用.
2. 染色性: アルコール固定標本  $\geq$  LBC  $>>>$  既Pap標本.
  - 既Pap標本は不安定
3. LBCは集塊傾向があり, 細胞が小型であるため, 細胞個々が判定し難い.
4. 集塊状の場合, シグナルが観察し難い.
  - 大型では内部はほとんど反応なし(特にHER2)
5. 細胞の同定, 浸潤部の判定などが難しい.
6. 立体的なためシグナルのフォーカスが異なり, カウントしにくい.

# 分子病理技術

- FISH 法
  - Fluorescence *in situ* hybridization
- DuoCISH 法
  - Dual color chromogenic *in situ* hybridization
- DISH 法
  - Dual color *in situ* hybridization
- PCR 法
  - Polymerase Chain Reaction

肺腺癌の細胞診検体を用いた  
全自動SNPs測定装置 i-densy による  
EGFR変異検出



# 全自動SNPs測定装置 i-densy (Arkray)



# i-densyの操作

## 簡単操作で手軽に測定

※操作方法は検体の種類により異なります。

検体をアプライした試薬パックを装置にセットし、スタートキーを押すだけで簡単に遺伝子解析が可能です。



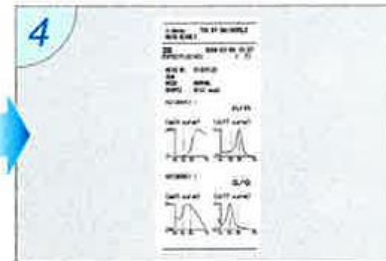
1 検体を試薬パックにアプライする



2 試薬パック、チップ、反応チューブを装置にセットする



3 スタートキーを押す



4 65～90分後に測定結果出力



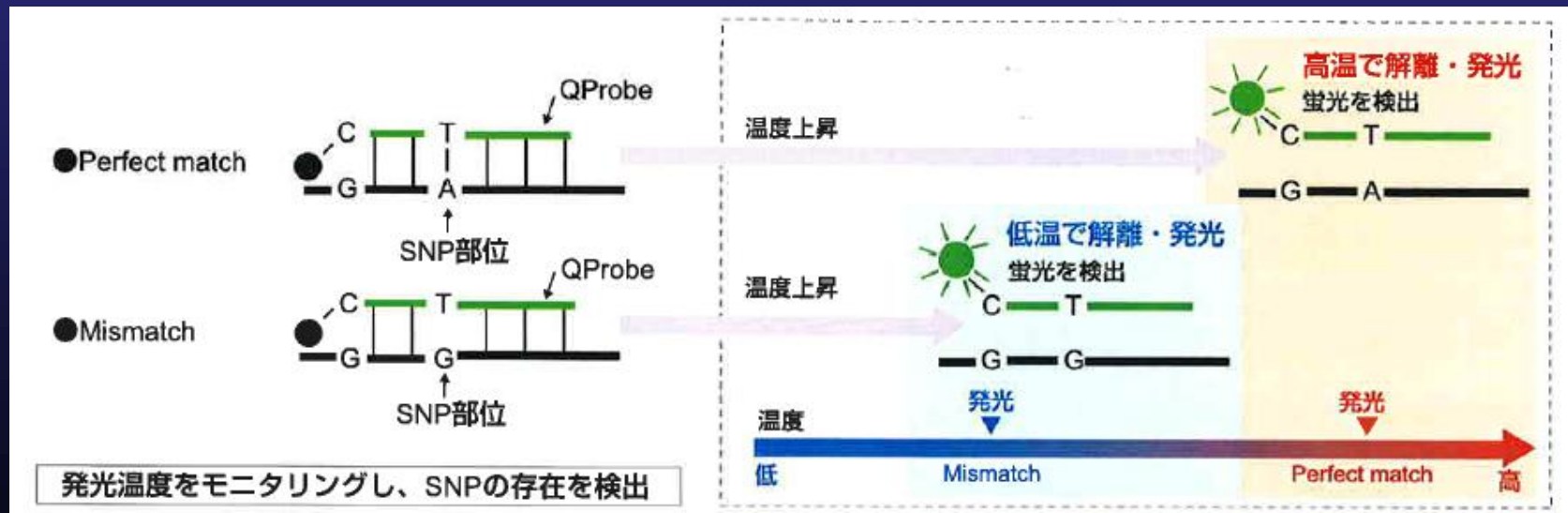
# 測定原理

## 1. PCRによりDNAを増幅

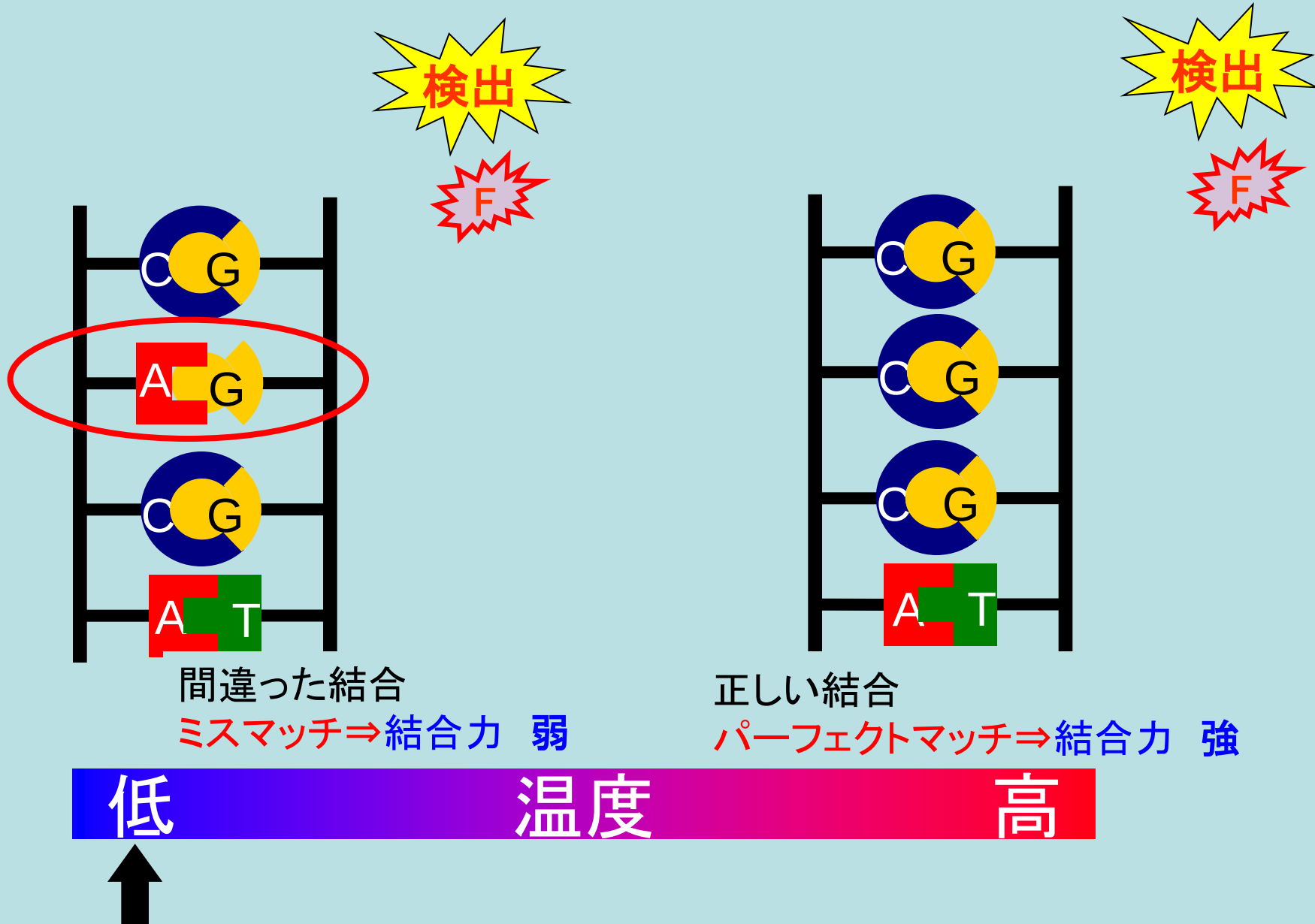
増幅領域を短く設計し、短時間で処理が可能。

通常のPCR 90～120分→約60分

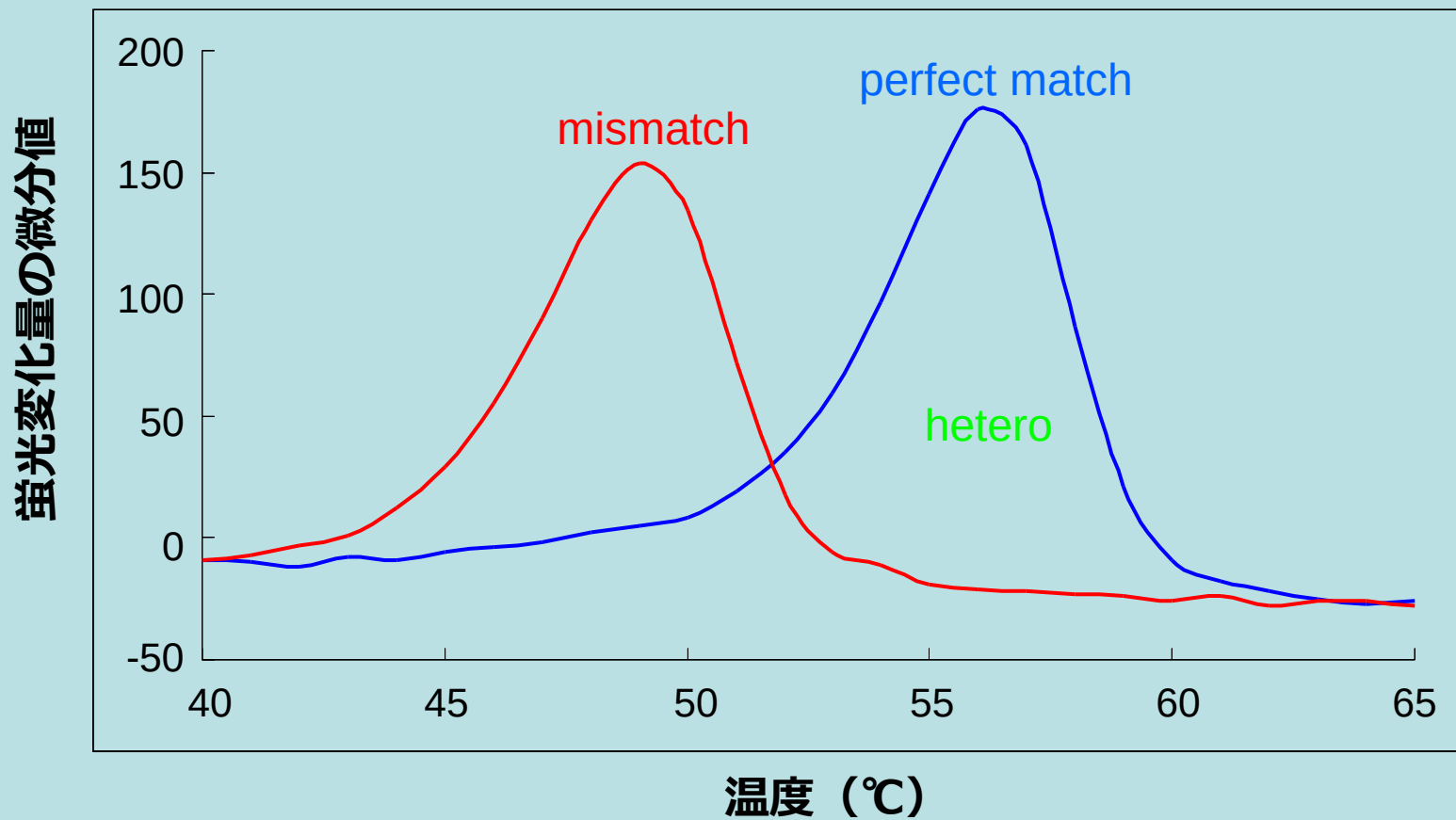
## 2. 増幅後に蛍光消光プローブ (Quenching Probe: Q-Probe) と PCR増幅産物を結合させ、野生型配列と変異型配列の解離温度 ( $T_m$ 値) の違いを利用し変異を検出 ( $T_m$ 解析法)



# DNAの結合の強さ



# SNP Typing 結果

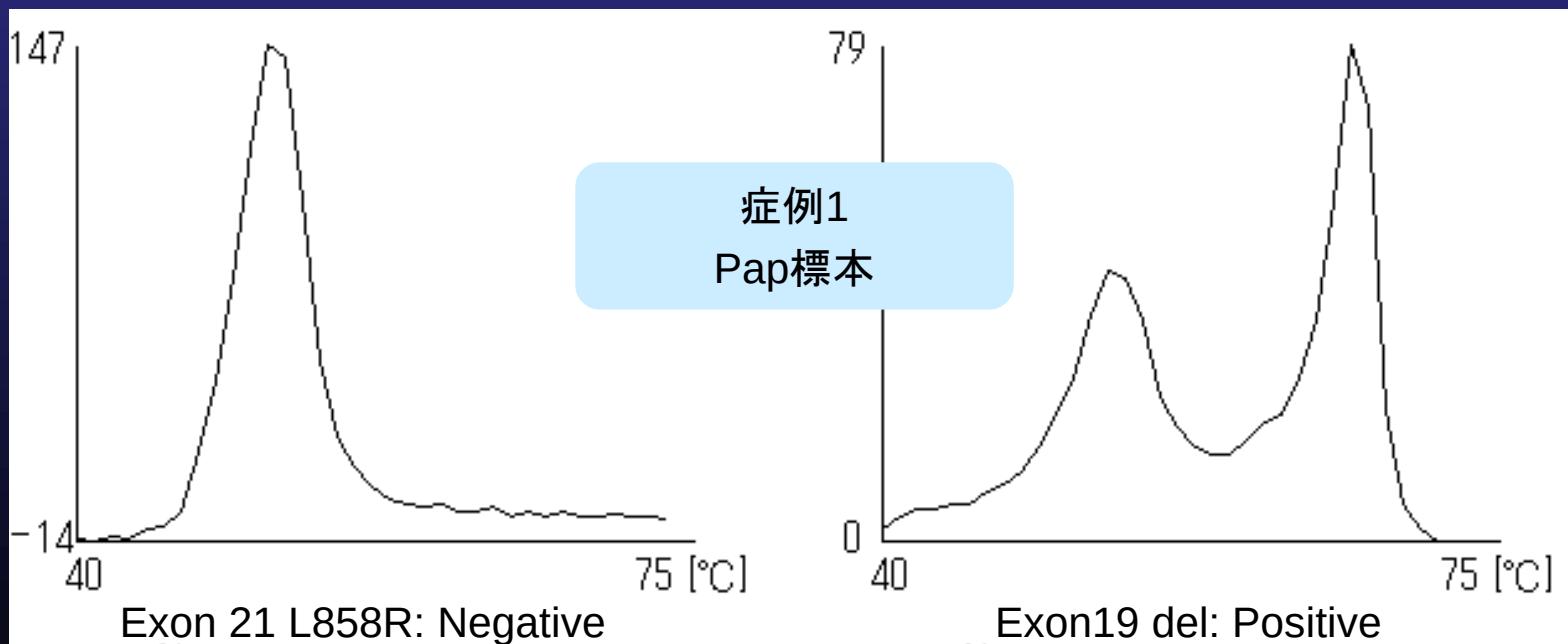
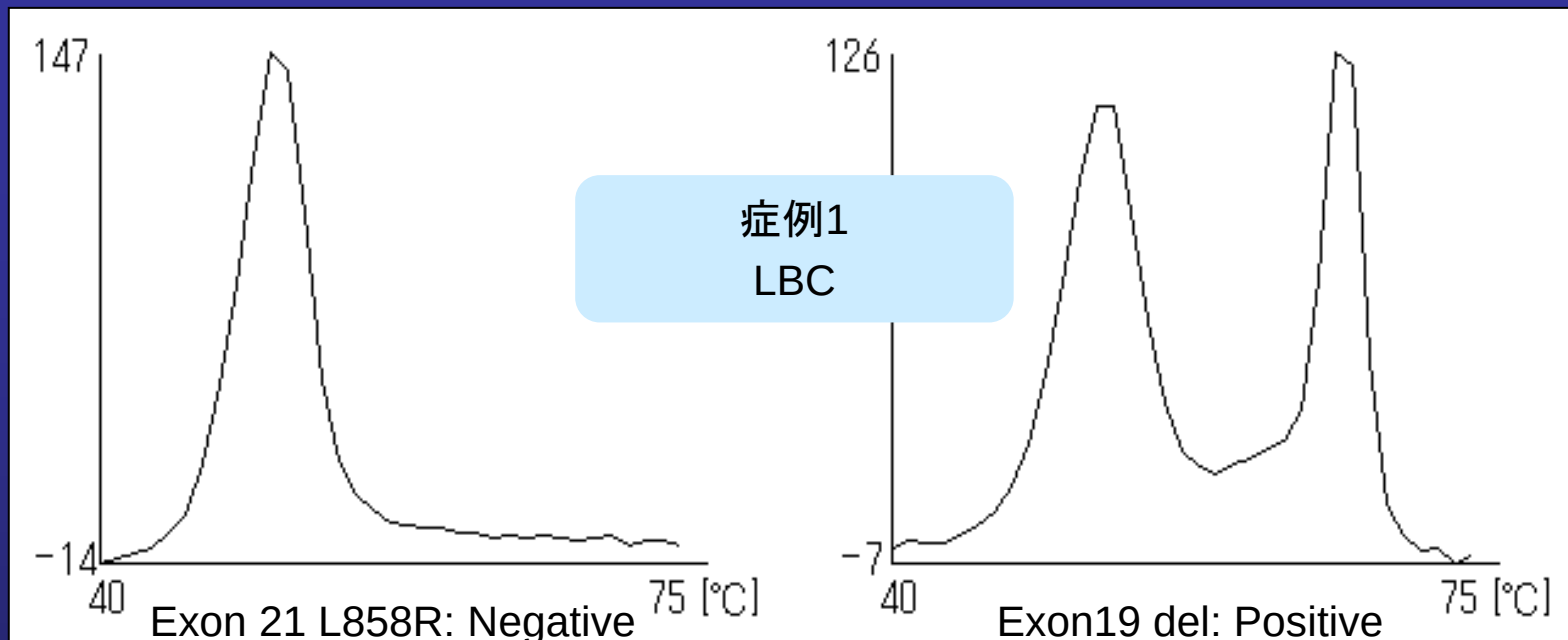


# EGFR 変異が陽性(サイクリーブ法)の 肺腺癌12症例を用いて検討

## LBC検体(肺胞・気管支洗浄液)

1. 洗浄液沈査をCytoLyt処理, 遠沈(2回).
2. 沈査をPreservCytに入れる(15分以上).
3. 遠沈後, 沈査を2回水洗.
4. 20 $\mu$ lの沈査をi-densyへ.





# Papanicolaou標本

癌細胞を確認

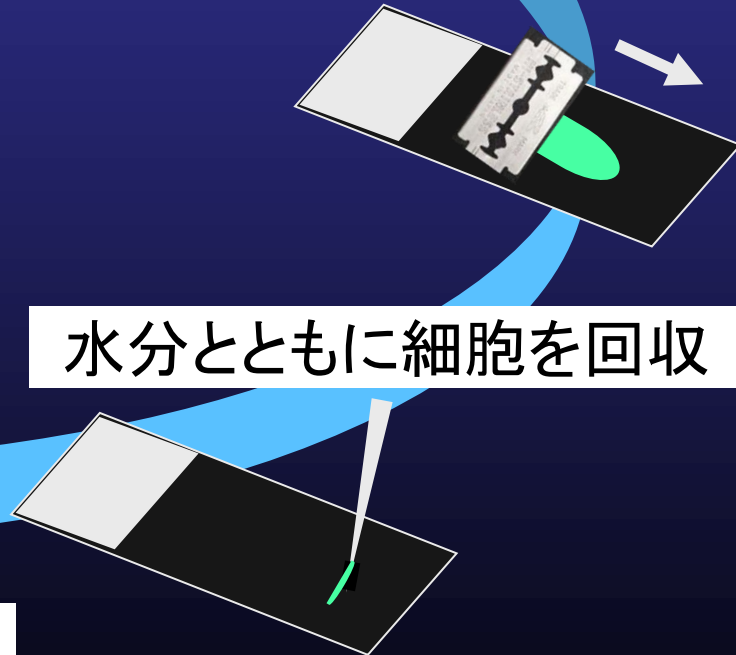
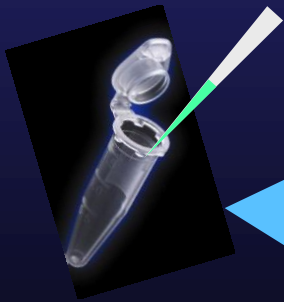
カバーガラスを外す

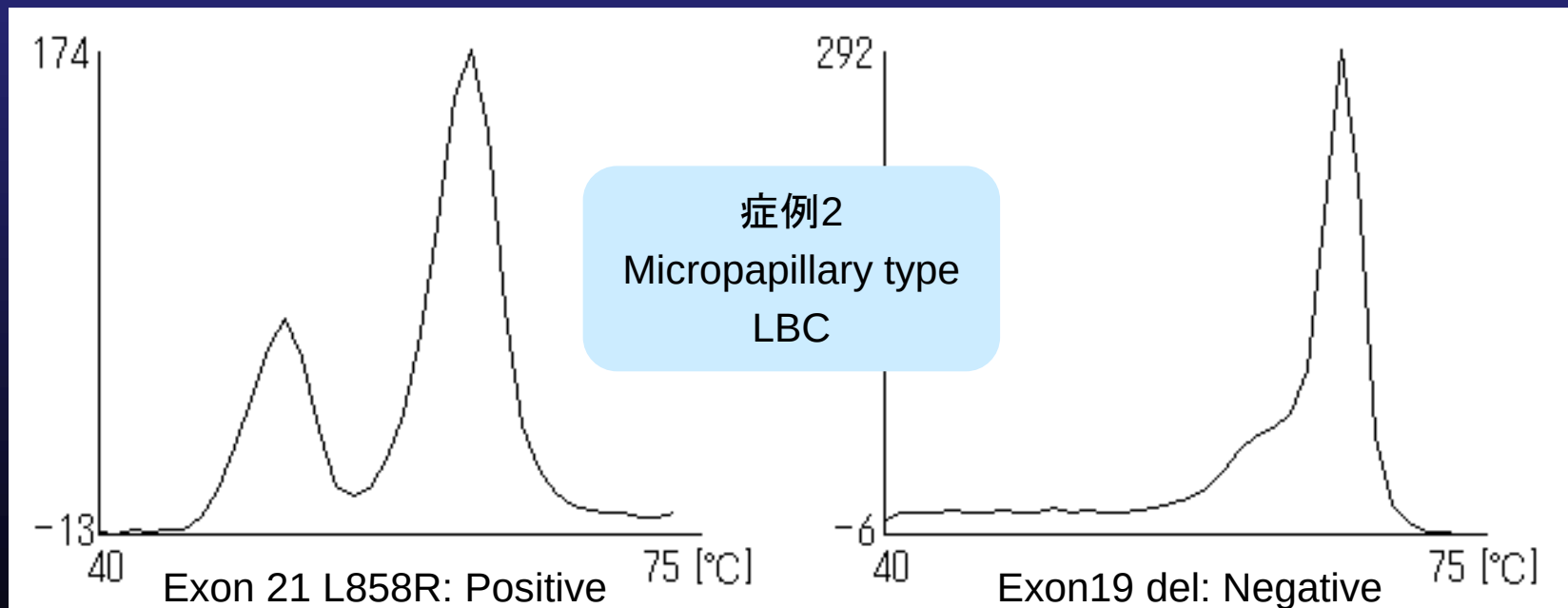
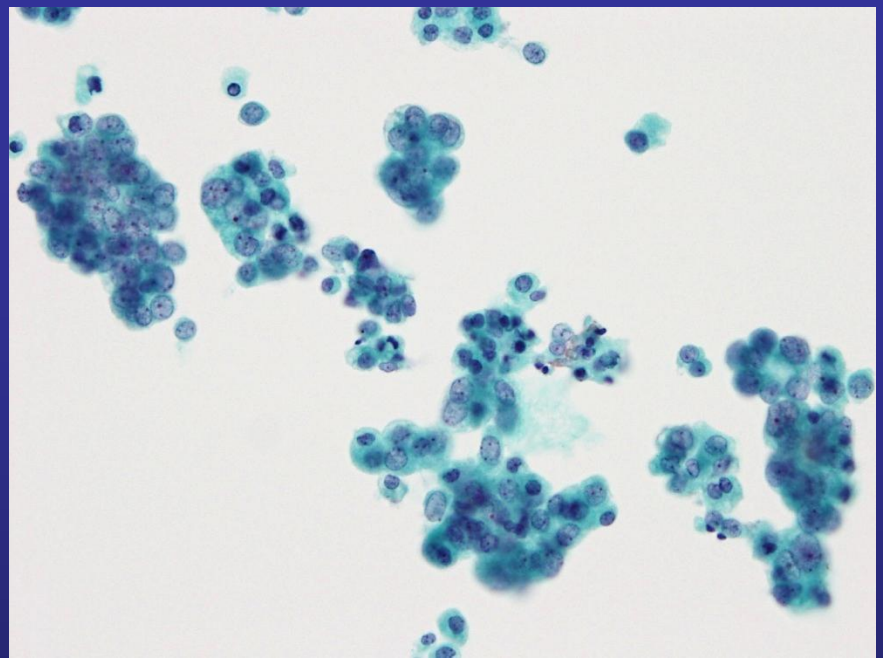
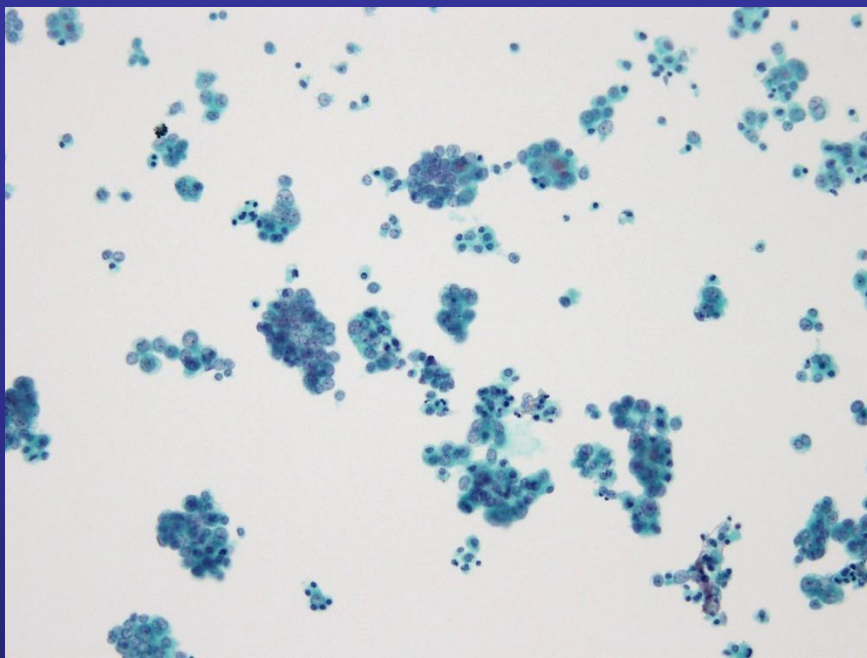
キシレン→アルコール→水洗1h

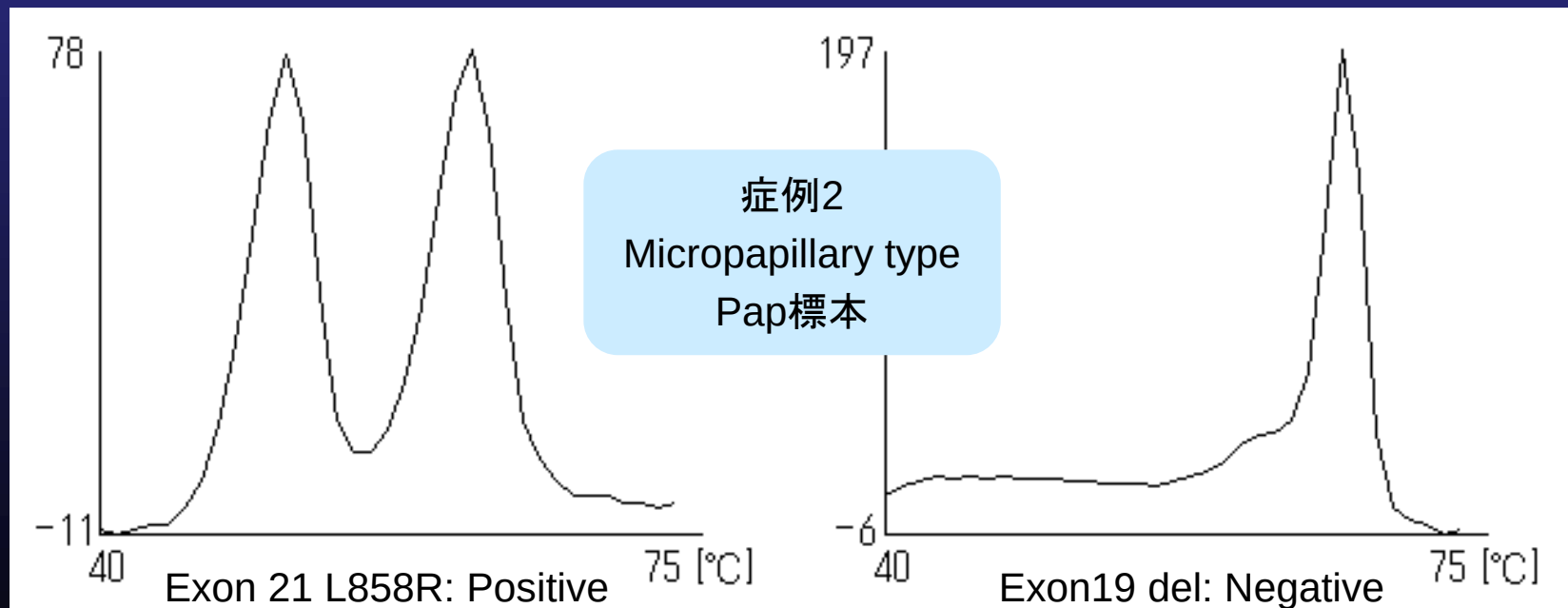
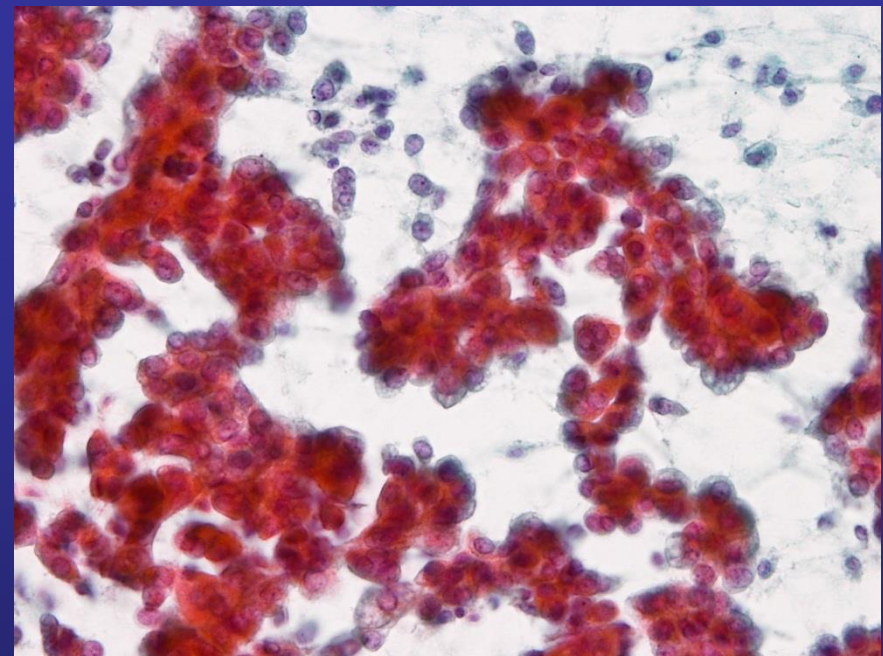
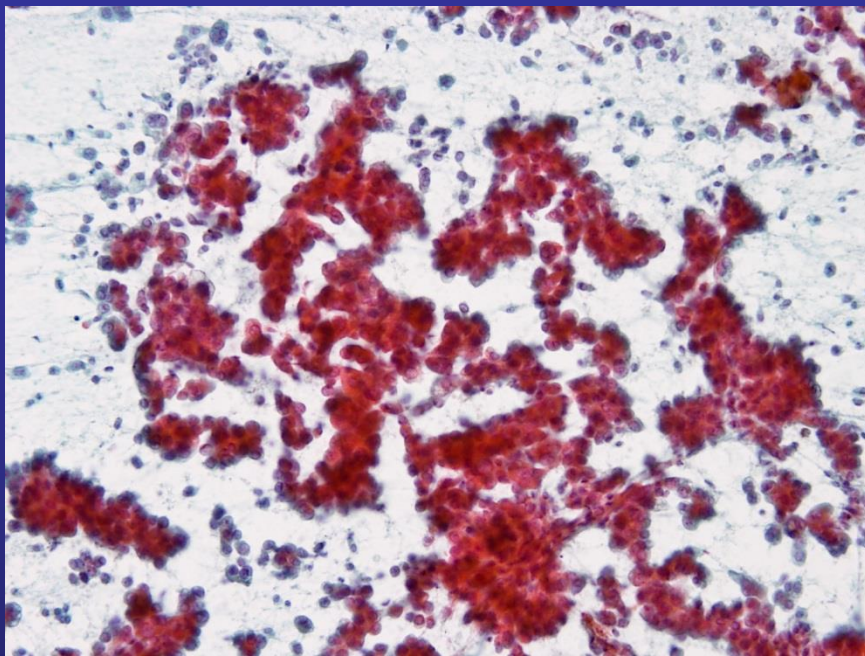
カミソリで細胞を削ぎ落とす

水分とともに細胞を回収

マイクロチューブに入れ遠心

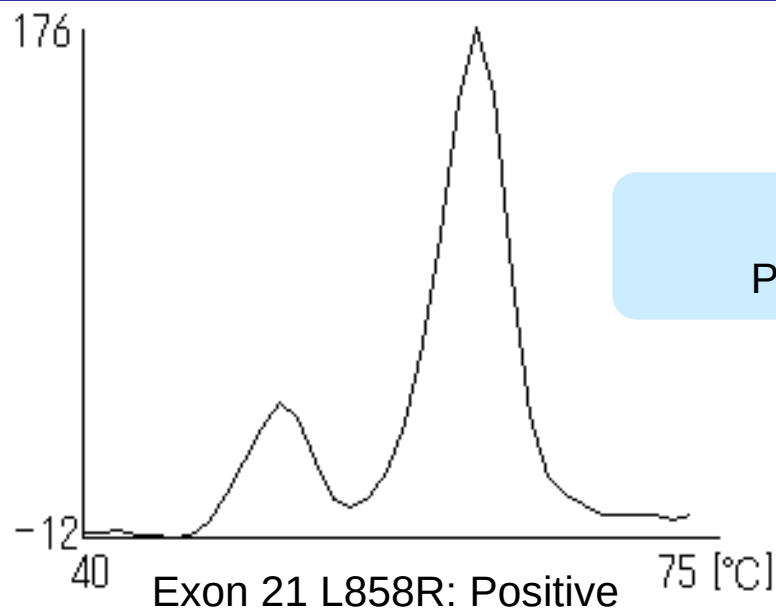




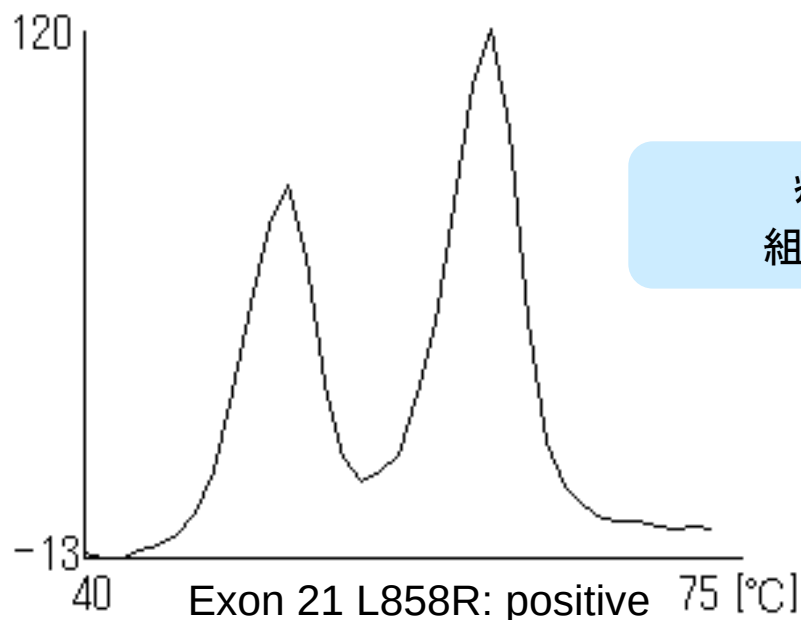
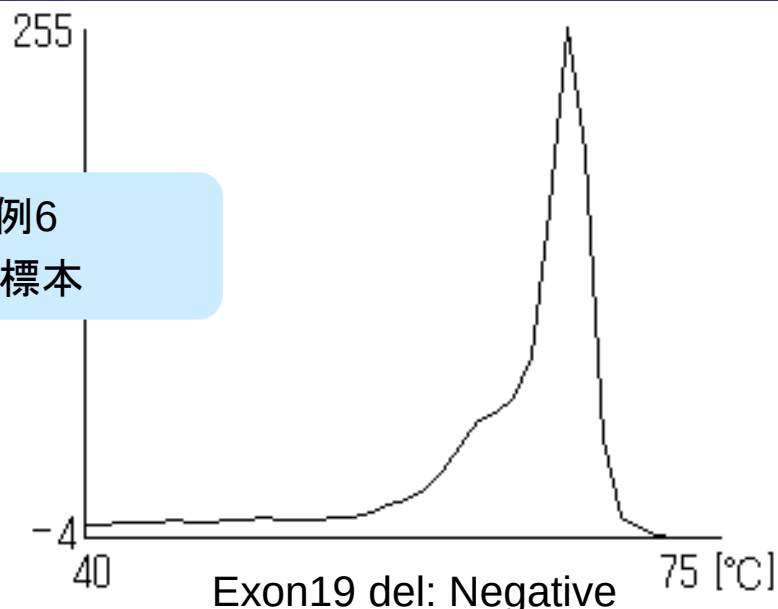


# 結 果

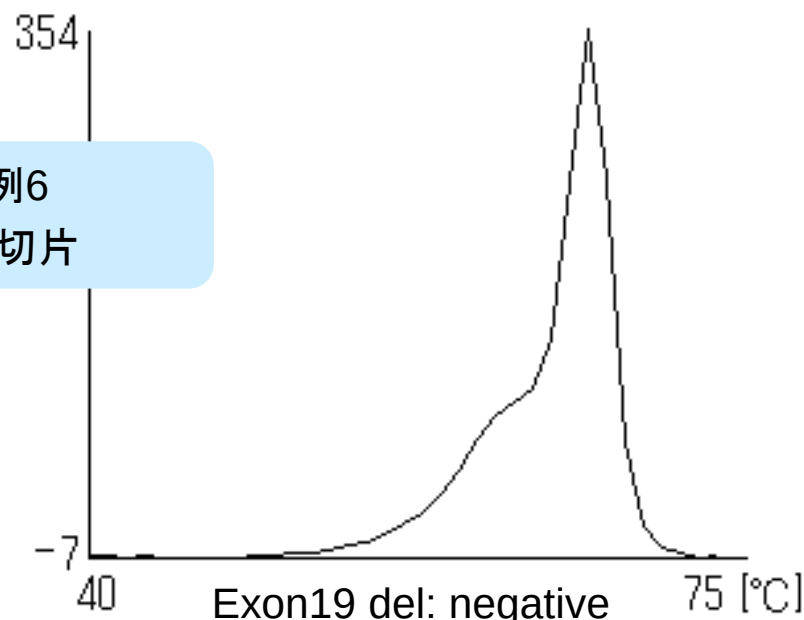
| 症例 | i-densy          |                | サイクリーブ法        |
|----|------------------|----------------|----------------|
|    | LBC              | Pap            | 洗浄液            |
| 1  | Ex 19 deletion   | Ex 19 deletion | Ex 19 deletion |
| 2  | Ex 21 L858R      | Ex 21 L858R    | Ex 21 L858R    |
| 3  | Ex 19 deletion   | Ex 19 deletion | Ex 19 deletion |
| 4  | Ex 19 deletion   | Ex 19 deletion | Ex 19 deletion |
| 5  |                  | Ex 19 deletion | Ex 19 deletion |
| 6  | Ex 21 L858R 組織切片 | Ex 21 L858R    | Ex 21 L858R    |
| 7  |                  | Ex 21 L858R    | Ex 21 L858R    |
| 8  |                  | Ex 21 L858R    | Ex 21 L858R    |
| 9  |                  | Ex 19 deletion | Ex 19 deletion |
| 10 |                  | —              | Ex 19 deletion |
| 11 |                  | —              | Ex 21 L858R    |
| 12 |                  | Ex 19 deletion | Ex 19 deletion |



症例6  
Pap標本



症例6  
組織切片





# 結 果

- LBC4/4およびPap標本4/4でサイクリーズ法と一致した.
- Pap標本のみ8症例
  - 1例は色素が残存で測定不可
  - 1例は細胞過少
- 組織切片でも抽出操作なく検出可能であった(1例).

# まとめ

- 細胞の欠損のない細胞標本では、真のシグナル数が得られるため、正確な遺伝子検索に有用であると考えられた.
- FISH, DuoCISH, DISH法は、すべてLBC標本へ応用可能であり、Pap標本よりも染色性が優れており、LBCの有用性が確認された.
- i-densyは、簡便、短時間で、EGFRの変異を検出でき、特に病院病理における遺伝子解析に至適であると考えられた.

# 第26回日本臨床細胞学会 関東連合会学術集会

COI disclosure

筆頭演者氏名：伊藤 仁

今回の演題に関して開示すべきCOIは  
ありません。