

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織標本アーカイブ(第2報)

50年前のFFPE組織ブロックを用いた分子病理学的解析

©斎藤 彩香¹⁾、五十嵐 久喜¹⁾、北山 康彦¹⁾、石川 励²⁾、山田 英孝²⁾、梶村 春彦²⁾
静岡済生会総合病院 病理診断科¹⁾、浜松医科大学 腫瘍病理学講座²⁾

(はじめに) 昨年の学会発表において50年前のFFPE組織標本を用いた免疫組織化学を含む分子病理学的な検査を行い今後の有効活用の可否についての検討結果を報告した。免疫染色、FISHにおいては概ね良好な結果を得ることができたが、今回はさらにDNA及びRNAの品質分析をはじめシーケンス等遺伝子解析の可否について検討した。

(方法) 1971年のFFPEブロックからp53免疫染色3+の腫瘍症例6例を10 μ m \times 3~5枚で薄切後、GeneRead DNA FFPE Kit(QIAGEN)にてDNAを、AllPrep DNA/RNA抽出キット(QIAGEN)よりRNAを抽出し、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)にて濃度を測定した。また、TapeStation(Agilent)によるDNAとRNAの分解度(DIN値、RIN値)を測定した。次に、PCR法にてp53 Exon 4~7領域で増幅の有無を確認した。増幅の認められた症例についてはBigDye Terminator v3.1/1.1 Cycle Sequencing Kitを用い、Applied Biosystems 3130 x1(Thermo Fisher Scientific)にてSangerシーケンス解析を行った。

(結果) DNAはO.D.比 A260/A280で1.4~1.8、濃度60~

330ng/ μ l、RNAはO.D.比 A260/A280で1.8~1.9、濃度450~1145ng/ μ lで抽出することができた。DIN値は1.1~1.7、RIN値は1.8~2.4だった。PCRは200bp以上では増幅することができなかったものが多く、概ね170bp以下に分けることが必要であった。Ex5を2分割した後半領域ではすべてのサンプルで増幅することができた。Sanger法にて、増幅を認めたすべてのサンプルで配列を解読することができた。また、複数個所で変異を確認することができた。

(考察) 50年前のFFPEブロックからでもある程度のDNA、RNAが抽出できたと思われたが、品質的には想定以上に経年による核酸の分解が進んでいたことがわかった。NanoDropでの測定においては濃度、O.D.比は十分だったが、260nmに近い吸光度を持つ夾雑物の影響が大きいと考えられた。それでも、条件次第でPCRによる増幅、シーケンス解析も可能であったことから、長期保管FFPEブロックの分子病理学的有用性は大きいと考える。今回の検討は、当院の倫理委員会の承認(No.2-13-01)を得て行った。連絡先 054-285-6171 (2644)