

## 東京女子医科大学学会第304回例会

## シンポジウム 病理領域における新しい解析方法の導入

日 時 平成7年11月9日(木) 午後4:00~6:30

会 場 東京女子医科大学 臨床講堂II

司 会 小林 榎雄教授(第一病理学)

笠島 武教授(第二病理学)

1. 免疫組織化学—内分泌病理の立場から—……………(第二病院病院病理科) 相羽元彦
  2. 形態学領域における in situ hybridization 法の利用……………(第一病理学) 加藤陽一郎
  3. 画像解析……………(病院病理科) 河上牧夫
  4. PCR 法—肝炎ウイルス遺伝子の変異の検出と  
臨床応用へのアプローチ……………(消化器内科学) 長谷川潔
  5. 疾患動物モデル—トランスジェニックマウスを  
用いた形態形成機構の解析—……………(解剖学・発生生物学) 横山尚彦
- シンポジウム関連講演  
「包埋材料からの DNA 診断  
—主として腫瘍診断への貢献—」……………(香川医科大学病理学教授) 大森正樹

## 1. 免疫組織化学—内分泌病理の立場から—

(第二病院病院病理科) 相羽元彦

免疫組織化学は、抗原と抗体の特異的な結合を利用し、組織・細胞中の抗原または抗体の局在と量を半定量的に知る技法である。逆に血清中の「組織細胞構成成分」に対する(自己)抗体の有無の評価と半定量も免疫組織化学的に行われてきた。単クローン抗体の作製技術や、分子遺伝学的方法による蛋白・ペプチドの特定部位のアミノ酸配列の合成とそれを抗原としての多クローン抗体の作製技術の開発は、抗体の種類著しい増加と安定供給をもたらした。染色技術も、光学・蛍光・電子顕微鏡などに合った様々な標識法(非標識法を含めて)、組織細胞の固定技術、ホルマリン固定パラフィン包埋材料の抗原賦活法、各染色段階の工夫などが開発され組み合わせられて利用されている。さらに、高感度を維持しつつ染色段階の少ない簡便な方法の開発や、biotinyl tyramide を基質として、標識酵素の触媒反応により多分子の biotin を生成し、これを検出する catalyzed signal amplification (CSA) 法といった新しい染色法も開発されている。これらの技術の進歩により、従来ホルマリン固定パラフィン包埋

材料では染色できなかった分子も染色可能となりつつある。ホルモン・増殖因子やその受容体、種々の産生物質、臓器・組織・細胞・細胞内小器官の marker 物質(酵素を含む)、細胞増殖の marker や接着分子、細胞外 matrix や線維分子などが分子またはその一部の構造が染色可能となり、形態学と分子遺伝学的知見を結合する分子病理学の大きな部分を占めるとともに、任意の組織・細胞形態の解析に役立っている。日常の病理診断でも検体から多くの情報を臨床科に提示できる。一方、免疫染色標本の読みには多くの pitfall が潜んでいることも指摘されている。非特異的な染色、非免疫化学的な染色性、cross-reactivity、酵素の免疫染色性と酵素活性の解離などである。これらの点を考慮にいられて、ここでは主として内分泌領域における免疫組織化学について報告する。

## 2. 形態学領域における in situ hybridization 法の利用

(第一病理学) 加藤陽一郎

病理形態学の分野においては、その研究手段として H & E のような一般的な染色、あるいは酵素組織化学、免疫組織化学的手法を用いて目的とする蛋白質の

組織内での局在を観察し、形態学的な変化と疾患との関わりを観察してきた。これらの研究手段は、大変有用な方法であり種々の情報を我々に提供してくれる。しかし、免疫組織化学の場合、組織上で反応させる有用な抗体の入手が困難であったり、ある種のホルモンのように合成部位と作用部位が異なり、病変を必ずしも反映しないことも考えられる。他方、多種類の細胞中の特定の細胞が、転写制御をしている状態をその場で証明できれば、細胞間コミュニケーションの研究に威力を発揮することになる。このように mRNA のレベルでの *in situ hybridization* (ISH) は、目的物質の産生を組織切片上で推定する有力な研究手段の一つとなる。

ISH で用いるプローブとなる核酸は、一本鎖 DNA、二本鎖 DNA、RNA、合成オリゴヌクレオチドなどが利用されている。また、プローブの標識には放射性同位元素である  $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、あるいは非放射性物質であるビオチン、ジゴキシゲニン、T-T ダイマーなどが用いられている。プローブおよび標識方法にはそれぞれ長所、短所があり、一概に良し悪しは決められない。

我々の研究室では、非放射性標識物質であるジゴキシゲニンで標識した cDNA をプローブとして ISH 法での mRNA の検出を行っている。今回、2 型パゾプレッシンレセプターのラット組織での局在を RT-PCR 法と ISH 法で検討した結果について紹介したい。

### 3. 画像解析

(病院病理科)

河上牧夫

生体部分を考える際、機能と形態は「貨幣の両面」の如く互いに切り離すことはできない。歴史的には形態無視の液性病理学はるかに先行し、形態を問題視するようになったのは漸く 18 世紀以降のことである。嚆矢となった Bichat の組織分類論は顕微鏡の発明により形態的思考の差し水となり、その後の一世紀にわたって描画、または造形組織復構法による三次元観察の成果が著しく集積された。

一方、現代確率論の展開は応用面で金属組織学に開花したが、三次元空間の構造を二次元のパラメータから推測するという幾何確立による手法は莫大な手間と時間を要する復構に比べてはるかに簡易である利点もあって、この形態計測学 (morphometry) はそのまま生体構造の解析に転用されるようになり、ここにいたって「構造を数値パラメータで記述する」ことが可能となった。

形態は線、面、体積、形状、位置、間隔、密度の尺度に分解できるので、それらの部分パラメータ群によって概ね記述可能である。当初は一定の点、または線を組織像にあて、得られた確率変数の平均値とバラツキを検する方法が主体であった。

しかし今日はコンピュータの性能向上により求める形態の三次構造を自在に抽出させ、しかも微分求積法にて迅速に直接計測できるようになった。その応用力は飛躍的に増大している。今後は形態を扱う際の止時間性の制約が取れ、通時的 (diachronic) 形態解析への展望が開けてこよう。

DNA 還元主義に代表される生化学的液性病理学が流行する世紀末にあつて血液内科学者 Heilmeyer の「血清は形態のモザイクである」や米国心臓生理学を代表する Katz の「心不全の在り方を決めるのは shape & form である」といった非形態学者からの表出は期せずして生命現象の解明にあつての形態認識の不可欠性を指摘したものとして銘記すべきであろう。

### 4. PCR 法—肝炎ウイルス遺伝子の変異の検出と臨床応用へのアプローチ—

(消化器内科学)

長谷川潔

B 型肝炎の診断は通常血清中のウイルス抗原、抗体の検出により行われている。ところが B 型肝炎ウイルス (HBV) の遺伝子診断が行われるようになって、ウイルスの存在が血清学的診断と一致しない症例が存在することが明らかとなった。HBV の遺伝子診断の方法は、まず、PCR 法により微量な HBV の存在を検出することである。この方法で、従来 HBV が存在しないとされていた HBs 抗原陰性の血液からも HBV が検出され、B 型肝炎の診断方法が大きく変わった。これらの症例から採取した HBV の遺伝子配列を PCR 法に続く direct sequence や、クローニング法を用いた sequence 解析を行ったところ、これらのウイルスは HBs 抗原を規定する領域である HBV の envelope 領域に、遺伝子欠失や突然変異を有する変異株であることが明らかとなった。

この PCR を用いた遺伝子解析は、突然変異の検出に威力を発揮する。例えば、肝臓病領域で最も激烈な、しかも今なおその病因が明らかでない劇症肝炎の病態の解明に飛躍的な進歩をもたらした。我々は、B 型劇症肝炎患者から採取した HBV DNA の塩基配列を解析したところ、HBV のプレコア領域に、ある特定の突然変異を認めた。この変異は、劇症肝炎患者のほとんどに認められることから、劇症肝炎を起こす HBV は