

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 ^3H 、 ^{35}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「構造を数理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

ある特殊なウイルスであり、プロコアの突然変異がその特殊性を担っているものと考えられた。しかし、その後の我々の研究結果から劇症肝炎の発症に、このプロコア変異の存在は必須ではないことが明らかとなったが、この PCR 法を応用した一連の研究は、HBV の突然変異がウイルス肝炎の多様な病態を規定している可能性を示唆するものとして、意義あるものと考えられた。

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

遺伝子工学とマウス胚操作の融合により、動物個体レベルにおいて遺伝子を改変することが可能となった。すなわち、遺伝子をゲノム上の望む部位に、また、ランダムに挿入してゲノムを改変することにより数々の疾患モデルマウスの作製ができるようになっていく。このように動物個体の改変が可能となったことは、脊椎動物の形態形成機構の解明のみならず、ヒトの形態形成異常を示す遺伝的疾患の解明に重要な貢献をしつつある。

脊椎動物の形態形成は、初期に対称な胚より前後、背腹、左右が決定されることにより始まる。この中で、左右に異常をきたす遺伝的変異体は、マウス、ヒトにおいて知られており、内臓逆位として知られている。しかしながら、その遺伝的決定機構は不明である。

我々は、チロシナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの一家系において、ヘミ接合同士の交配において、内臓逆位を示す変異マウスを発見した。他のチロシナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの家系には、このような変異は認められなかったため、この内臓逆位変異は左右を決定する遺伝子が導入されたチロシナーゼ遺伝子によって破壊されたことによる挿入変異によって生じたと考えられた。さらに、挿入遺伝子近傍をクローニングしたところ、内臓逆位変異は挿入遺伝子がホモ接合になった時に起こり、導入された遺伝子はマウス第4番染色体上にあることがわかった。また、ホモ接合マウスにおいては、常に左右非対称性の異常が起きることから、左右の決定に関与する遺伝子は挿入遺伝子の近傍にあると考えられた。

本シンポジウムにおいて、このマウスを紹介し、左右の形成機構について述べるとともに、遺伝子より変異モデルへ、変異モデルより遺伝子へ、といったアプローチについて話したい。

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

癌は遺伝子の病気であり、特に癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異と発癌の関連が次第に明らかになってきた。それには癌細胞の増殖、分化、異型、不安定性、死の制御、血管増生や浸潤性格などと関係のある癌関連遺伝子群との対応がある。

これまでの研究で明らかになったのは、単一の遺伝子の異常だけでは遺伝子病としての癌を説明することはできないことである。

正常細胞から発癌への過程には癌遺伝子を始めとする癌関連遺伝子の複数の遺伝子が関与しており、点突然変異、増幅、欠損、挿入、再構成、転座などというような形での多段階的構造変化の蓄積が必要であることが明らかになっている。したがって、一つの遺伝子の異常を検出することがそのまま癌としての診断に有用であるとは限らない。しかし、一定の遺伝子の異常をマーカーと考え癌の診断や悪性度の判定の補助手段として利用することができる。

方法論としても遺伝子解析技術の進歩により PCR 法を始めとし、微量の材料からも遺伝子異常を容易に検出できるようになった。またアイソトープを用いなくとも標識 luminol 化学発光法による増幅の検出や、ダイブライマーシーケンシング法による塩基配列構造解析も有用で、これらの技術を応用して材料は病理組織診断により確かめられた保存材料パラフィン包埋組織を用いての DNA 診断に限定した。

遺伝子異常の解析結果と病理診断、特に良性腫瘍、悪性腫瘍、浸潤性との接点および整合性について、最近の我々の研究室においての成果をもとに実用可能と考えられるものをピックアップし、次の5点について概説する。

1. 母斑細胞性母斑 (NCN) では非常に高率に Codon 61, c-Ki-ras, c-N-ras, c-H-ras の点突然変異が認められ、さらに、c-myc の増幅異常の合併が認められる。NCN は良性腫瘍と考えられているが、悪性化に必要な遺伝子の初期変化は進行している。

2. 肺胞壁を間質とし基底膜を保持した状態で置換進展する肺胞上皮癌と浸潤性増殖を示す肺腺癌をモデル対象とし、基底膜の分解に関与する MMP-3 と間質のコラーゲンの分解に関与する MMP-1 の遺伝子増幅の差異について検討した。MMP-3 の遺伝子増幅は浸潤転移の予測に重要な因子であることが判明した。