短 報

細胞材料からの遺伝子検索

——単一細胞 PCR への工夫——

和歌山県立医科大学第2病理学教室

谷口恵美子 張 志強 中村 美砂 横井 豊治
覚道 健一

I. はじめに

近年、細胞診断に細胞の遺伝子診断が導入され、多くの知見が明らかとされている。しかし、目的とする細胞一個を用いての検索は細胞を確実に取り扱う技術開発が必要であり、遺伝子量が少ない1個の細胞からスタートするには、少量の遺伝子を扱う技術的問題点の解決が必要であった。今回われわれは、プレパラート上の塗抹された細胞から、目的の細胞のみを確実に取り出す方法としてマウントクイック封入剤を用い、よい結果を得たので報告する¹⁾。この方法により細胞を顕微鏡下で確認し、確実にコンタミのない1個の細胞を取り出すことが可能となった。転写材料はピンセットで扱うことも可能であり、目的とする細胞一個のみの遺伝子を検索するのに便利な方法であると思われる。

II. 材料と方法

材料は肺癌培養細胞株 A-549 と甲状腺髄様癌培養細胞株 TT 細胞を用いた (写真1)。細胞を回収後、沈渣をプレパラートにストリッヒで塗抹し 99% エタノールで固定の後パパニコロウ染色を行った。目的の

細胞にマーカーペンでプレパラートの下面からマークし、カバーガラスをはずした後、マウントクイック封入剤 (大迫産業) を適量塗布し、プレパラートを水平に保った状態で 50°C で一晩置く。封入剤が乾燥したあと、封入剤の上からさらにマークをし、次に 50°C の温水に 2 時間浸し、軟化した封入剤をナイフでガラス面よりはがす (図1)。細胞は封入剤薄膜内に転写されているのでこれを細切し、その断片を顕微鏡にて観察し、目的とする細胞が含まれていることを確認した後、1.5 ml のマイクロチューブに移し、キシレンにて封入剤を除く。細胞からの DNA 抽出はボーリング法で行った。抽出した DNA を 5 μ l の純水に懸濁し、その 5 μ l を用いて PCR を行った。遺伝子増幅の成否はゲルに PCR 産物を抽入し、電気泳動後特異バンドの有無をみることにより判定した。

III. 結 果

A-549 と TT の一個の細胞から抽出した DNA を

写真1 甲状腺髄様癌培養細胞 TT 細胞。単個の視野を選んで検索した。腫瘍細胞は細胞質が顆粒状の特色をもつ

One cell PCR on cytological specimen

Emiko TANIGUCHI, C.T., I.A.C., Zhiqiang ZHANG, M.D., Misa NAKAMURA, Ph.D., Toyoharu YOKOI, M.D., Kennichi KAKUDO, M.D., Ph. D., F.I.A.C.

Department of Pathology, Wakayama Medical College

論文別刷請求先 ☎ 640 和歌山市九番丁 27 和歌山県立医科大学第2病理学教室 谷口恵美子

平成8年3月7日受付

平成8年6月14日受理

図1 マウントクイック封入剤を用いた細胞転写と細胞分離の手順

カルシトニンレセプターのプライマー ①: $5'\text{CTAGTGATCACGATACTGTC}3'$, プライマー ②: $5'\text{ATTCA GTTGAAC CAGCGTTGG}3'$ を用いて PCR を行い, 電気泳動を行った結果, 両サンプル 228 bp の PCR 産物を検出することができた (写真 2)。

IV. 考 察

われわれは, 喀痰細胞材料を用い, DNA を抽出し, これまでに K-ras 遺伝子の突然変異を 2 例において検出した²⁾。しかし, これは検体中の全細胞よりの検索であり, その検出感度に問題があった。喀痰中に含まれる癌細胞の比率は 1/600~1/50 まであり, 150 の正常細胞に平均 1 個の癌細胞を含んでいるといわれている³⁾。そのため, 細胞材料からの遺伝子診断には常に正常細胞のコンタミと検出感度が問題となる。そこで細胞材料から遺伝子診断を行うためには目

写真2 一細胞 DNA を用いてカルシトニンレセプターのプライマーで PCR を行い, 得られた PCR 産物の電気泳動結果. 228 bp の PCR 産物を検出

的とする細胞一個から確実に DNA を抽出することが必要となるが, 多くの方法論上の制約があり, 簡単には行われていない。本論文ではこの技術の開発を目的とし, 基礎的検討を加えた。その結果確実に一個の細胞のみをチューブ内に入れ PCR 操作が可能となった。マウントクイックが遺伝子抽出に悪影響がないと考えられるので, 今までの限界希釈法が用いられない領域や, 細胞材料を用いての遺伝子検索にはこの方法による DNA の抽出, PCR 解析が, より詳細な遺伝子研究に有用であると思われる。

文 献

- 1) 広川満良, 有安早苗, 鐵原拓雄, 岩知道伸久, 鞍津輪優子. マウントクイック封入剤を用いた細胞転写法の免疫細胞化学および電子顕微鏡的検索への応用. 日臨細胞誌 1995; 34: 1236~1237.
- 2) Zhang, Z., Nakamura, M., Taniguchi, E., Shan, L., Yokoi, T., Kakudo, K. Late occurrence of K-ras gene mutations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of lung: analysis in sputum. Anal Quant Cytol Histol (印刷中)
- 3) Mao, L., Hruban, R., Boyle, J.O., Tockman, M., Sidransky, D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. Cancer Res 1994; 54: 1634~1637.