

〔原著〕 松本歯学 40 : 35~39, 2014

key words : 液状化検体細胞診, 口腔粘膜, RNA解析

液状化検体細胞診固定液で保存された口腔粘膜細胞RNAの安定性

田村 愛結子¹, 落合 隆永^{2,3,4}, 嶋田 勝光³, 高野 百合⁴

中野 敬介^{2,3,4}, 長谷川 博雅^{2,3,4}

¹松本歯科大学 歯学部歯学科

²松本歯科大学 口腔病理学講座

³松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

⁴松本歯科大学病院 検査科病理

Stability of oral mucosal cell RNA stored in liquid-based cytology medium

AYUKO TAMURA¹, TAKANAGA OCHIAI^{2,3,4}, KATSUMITSU SHIMADA³,
YURI TAKANO⁴, KEISUKE NAKANO^{2,3,4} and HIROMASA HASEGAWA^{2,3,4}

¹*Department of Dentistry, School of Dentistry, Matsumoto Dental University*

²*Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University*

³*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

⁴*Laboratory of Surgical Pathology, Matsumoto Dental University Hospital*

Summary

We evaluated the stability of RNA stored in liquid-based cytology (LBC) medium for long periods. Specimens were taken from the five volunteers using LBC preparation methods. Experimental samples were preserved at one day, three days, seven days, one month, two months and three months in the medium at room temperature. The RNA was routinely extracted from each specimen, and amplified using human β -actin after reverse transcription method. In all cases, 186 bp β -actin bands were successfully detected until seventh days. However, the detection of RNA was impossible in some cases of one-month, two-month and three-month groups. These results suggest that the LBC method is superior in the preservation of RNA.

緒 言

液状化検体細胞診 (Liquid-Based Cytology: LBC) 法は細胞診における検体の精度管理に有効であり, 米国ではLBC法で採取された検体を用いて細胞採取が行われ, ベセスダシステムにて細胞診の評価が成されている^{1,2)}. また, LBC法の利点は細胞形態の観察に優れるだけでなく, 採取された検体からDNAやRNAを回収することも挙げられている^{3,4)}. 婦人科領域では細胞形態を観察する細胞診断だけでなく, 子宮頸癌の発生に関与するHPVの検索を分子生物学的手法にて行っている^{5,6)}. LBC法は婦人科を筆頭に乳腺, 泌尿器および呼吸器など様々な領域でその有用性の高さが示されている⁷⁻¹⁰⁾.

RNAは唾液や汗などの体液中に含まれるRNaseによって分解される. RNaseはいたるところに存在するため, RNAは非常に分解されやすく不安定であることが知られている. 口腔内は唾液や細菌および真菌等が常に存在しRNaseが多量に存在するため, RNA抽出には不適な環境である. 我々は, このようなRNA抽出が困難な口腔粘膜から, SurePath法を用いたLBC法でRNA抽出が可能であることを報告している³⁾. しかし, LBC法を用いた採取細胞のRNA保存性に関する報告は少なく⁴⁾, LBC保存液中でのRNA保存性に関する検討は行われていない.

そこで本研究は, 口腔粘膜よりLBC法で採取された細胞の保存期間によるRNA抽出への影響について検討した.

材料と方法

本研究は, 松本歯科大学倫理委員会の承認 (許可番号: 第0105号) を受けた後に, 口頭と文書にてインフォームドコンセントを行い同意の得られた健康成人男女計5名を被験者として選定した.

被験者の口腔粘膜を歯間ブラシで擦過し細胞を採取した. 歯間ブラシをSurePath™保存液サイトリッチブルー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) に浸漬し, 歯間ブラシより採取細胞を保存液中に遊離させた. 被験者あたりサンプルチューブ (株式会社イナ・オブティカ, 大阪) 6本の合計30本の検体を採取した. 各検体はCase 1 からCase 5 の番号を無作為に付与し匿名

化を行った. すべての検体は室温 (21°C) で1日, 3日, 7日, 1か月, 2か月および3か月間静置した. 細胞の回収とRNA抽出は落合ら³⁾の方法に従って行った. 期間毎に5例ずつを800G, 10分間遠心分離した後に上清を取り除き, 回収した細胞を実験に用いた. 回収細胞にTRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を750μl加えフェノール・クロロホルム法にてtotal RNAを抽出し, RNase A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて処理しtotal RNAを調整した. 回収したtotal RNAを吸光度計にて測定し定量した. 定量結果より1μgのtotal RNAを用いてSuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) の製品プロトコールに従いcDNAを合成した. PCR反応液は, TAKARA EX Taq® (タカラバイオ株式会社, 大津) の製品プロトコールに従い, EX Taq® を0.125μl, dNTP Mixtureを2μl, 10×EX Taq Bufferを2.5μl混和した後にプライマー各1μl (最終濃度0.4μM) とtemplate DNA各50ngを加え, nuclease不含水で全量25μlに調製した. PCR反応は, 95°Cで3分間予備加熱を行い, 95°Cで10秒間, 60°Cで30秒間, 72°Cで1分間を35サイクルの後に72°Cで7分間伸長反応を行った. プライマーは, Housekeeping Gene Primer Set (タカラバイオ株式会社, 大津) のβ-actin (増幅長186bp) を使用した. 各PCR産物10μlを100bp DNA Ladder (タカラバイオ株式会社, 大津) と共に1.5%アガロースゲル (アガロースME, 岩井化学, 東京) にて100Vで30分間電気泳動 (i-Mupid J, Advance, 東京) の後に, エチジウムブロマイドで染色を施し紫外線照射下で観察した. 電気泳動の結果β-actinの186bpに一致したバンドが認められたものを, mRNAの検出が可能例とし, LBC保存液中でRNAが保存されたものと判定した.

結 果

結果をFig. 1に示す. 固定期間1日群では, 全例でβ-actinの186bpに一致するバンドが得られた. Case 3とCase 5でやや検出感度が良い傾向を認めた (Fig. 1: lane 1). 3日と7日間固定した群でもβ-actinの186bpに全例バンドが確認でき, Case 2とCase 3でやや濃いバンドが得られた (Fig. 1: lane 2, 3). 固定時間1か月群

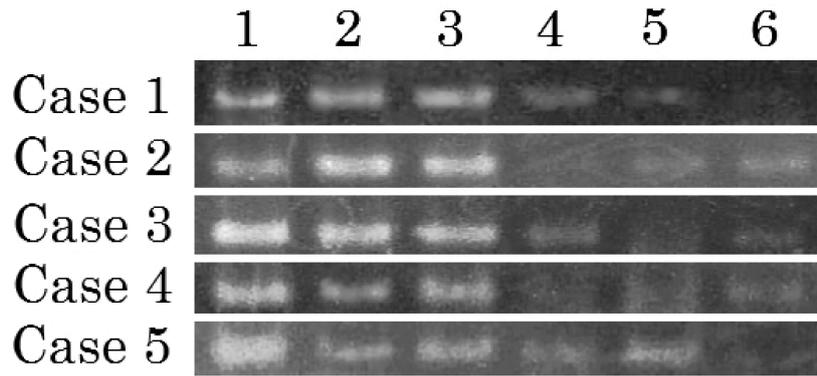


Fig. 1 : RT-PCR法による遺伝子発現の検出

lane 1 : 1日群, lane 2 : 3日群, lane 3 : 7日群, lane 4 : 1か月群,
lane 5 : 2か月群, lane 6 : 3か月群

Table 1 : 各期間での検出率

	1日	3日	7日	1か月	2か月	3か月
検出率	100% (5/5)	100% (5/5)	100% (5/5)	60% (3/5)	40% (2/5)	40% (2/5)

では, Case 1 とCase 3 およびCase 5 で186bpの僅かなバンドが確認されたが, Case 2とCase 4では検出できなかった (Fig. 1 : lane 4). 2か月間固定群はCase 5で186bpにバンドが確認できたが, Case 2では僅かでありCase 1とCase 3およびCase 4では明らかなバンドを認めなかった (Fig. 1 : lane 5). 最長固定期間である3か月群は, Case 2で β -actinの弱いバンドが, またCase 4でも僅かなバンドの発現があったが, 他では確認できなかった (Fig. 1 : lane 6). 検出率の結果をTable 1に示す. 固定期間7日目までは, 全例でRNAの検出が可能であった (Table 1 : 1日から7日). 1か月間固定群は3例でRNAの検出が可能で, 検出率は60%だった (Table 1 : 1か月). 固定期間2か月と3か月では2例のRNAが検出可能で, 検出率は40%であった (Table 1 : 2か月と3か月). 以上のように, 固定期間が1か月を超えると検出率の低下がみられた.

考 察

細胞検査において世界的に普及しつつあるLBC法は, 形態観察だけでなく様々な検査への応用が検討されている. 腫瘍の診断における遺伝子解析の重要性は非常に高く, 肺癌に代表されるanaplastic lymphoma kinase (ALK) の融合遺

伝子を分子生物学的に検索し分子標的薬の適応を評価することで癌治療に大きな効果が示されている^{11,12}. このように遺伝子検査の適応は感染症, 造血器や固形腫瘍および遺伝性疾患の診断のみでなく腫瘍性疾患の治療法選択にまで拡大している¹³. 口腔領域における病変でも今後遺伝子解析に基づく診断や治療が行われることが期待される. 本研究は, 細胞診検体から遺伝子検索を行う際に問題となる遺伝子の保存期間について検討したものである.

組織中のRNAを抽出する際には, 組織採取後直ちに抽出作業に入るか, それができない場合には急速に凍結し, -80°C 以下で保存することが推奨されている¹⁴. 遺伝子解析が必要とされる病理検査, 細菌検査およびウイルス検査でも検体の保存は液体窒素, -80°C および 4°C と低温保存が推奨されている^{15,16}. しかし日常の歯科臨床において, 細胞採取後直ちに遺伝子抽出作業を行うことや, 超低温で細胞を保存するための設備を設置することは困難であろう. そこで, 検体の保存方法や運搬に関して検出目的や検体別に様々な報告がなされている^{16,17}. RNAの抽出を目的とする検体の取扱いは, RNaseの変性処理やRNA劣化防止を目的としてグアニジンチオシアネートなどで処理した後に -80°C で保存するとしている¹⁸. 本研究では採取細胞に特別な前処理を行わずLBC保

存液のみを用いて保存したが, 7日群までは全例で, さらに3か月群でもRNAの検出が可能であった。自然尿を用いて温度条件を変えて遺伝子保存性を検討した報告では, 4℃ないし-20℃では11日間保存した検体からRNAが検出できると報告されている¹⁹⁾。本研究では室温(21℃)で行ったが, 自然尿よりも長期間の保存性が確認された。また, 培養細胞の保存にLBC保存液を使用した場合, 実験的に7日間まではDNAとRNAの検出が可能であると報告されている⁴⁾。口腔から採取した細胞であってもこれらの研究と同様に7日間までは安定してRNAの検出が可能であった。この結果からLBC保存液が細胞形態の保存のみでなく遺伝子に関しても優れた保存性を有することが明らかになった。また, 7日以内であればRNA抽出が可能であることから, 歯科診療所で採取された細胞を専門の検査機関へ運搬した後でも遺伝子解析が可能となるであろう。

LBC保存液中で長期間保存した細胞からgenome DNAやHPVを検出する研究が行われ²⁰⁾, 最長期間で2年半経過した症例からでもDNAの検出は可能であったと報告されている²¹⁾。しかし, 1か月以上の長期間室温保存した細胞からRNAを検出した報告は, 我々が検索した範囲ではみられなかった。本研究の特徴はLBC保存液中で3か月間という長期の保存期間について検討した点で, 1か月を経過するとRNA検出率が低下することを明らかにした。一般に低温保存でも1か月以内に抽出作業を行うことが推奨されているが, これはRNAがきわめて分解されやすい性質を有していることに基づいている。しかし, この実験では3か月間経過後もRNAの検出が可能であった例が存在した。このことは極めて興味深いがどのような条件がRNA保存性に影響するかは不明である。採取条件, 採取細胞の量, 固定までの時間および保存温度等が影響すると考えられる。今後は, 温度条件, 採取細胞量および固定までの時間などがRNAの保存性に与える影響を検討する必要がある。

結 語

LBC法で採取された口腔粘膜細胞は, 室温で7日間まではRNA抽出に影響がなかった。この期間は, 医療機関と検査機関での輸送および保存

期間の目安として応用が可能であると思われる。今後, 温度条件等を検討することで, より精度の高い保存条件を設定することが可能となり, 検体の精度管理の改善につながると考えられる。

文 献

- 1) Solomon D, Davey D, and Kurman R (2002) Forum group members; Bethesda 2001 workshop: The Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* **287**: 2114-9.
- 2) Solomon D, and Nayar R (2004) *The Bethesda system for reporting cervical cytology* Second ED, Springer, New York.
- 3) 落合隆永, 中野敬介, 木村晃大, 相澤聡一, 福澤正人, 上松隆司, 古澤清文, 川上敏行, 長谷川博雅 (2010) 口腔粘膜病変における液状化細胞診の検討. *松本歯学* **36**: 193-8.
- 4) 野坂大喜, 甲賀洋光, 奥沢悦子, 鷺谷清忠, 三浦富智, 中野 学, 方山揚誠, 佐藤達資 (2009) 婦人科液状細胞診におけるReverse dot blot in situ hybridization法を用いたhuman papillomavirus検出. *弘前大保健紀* **8**: 83-91.
- 5) 丹後正紘, 金谷太郎, 橋本 茂, 前川信政, 浮田俊彦, 小山 信, 丘村 誠, 井上正樹 (2008) 子宮頸がん検診におけるHPV検査の導入とその有用性. *日臨細胞誌* **47**: 1-6.
- 6) 香坂信明, 岡崎隆行, 稲葉未知世, 稲葉不知之, 亀森 哲, 坂本尚徳, 北澤正文, 渡辺 博, 深澤一雄, 稲葉憲之 (2011) HPV感染状況と子宮頸癌検診における細胞診とHPV検査併用の意義. *Dokkyo J Med Sci* **38**: 59-64.
- 7) 井村穰二, 内田好明, 富田茂樹, 市川一人, 藤盛孝博 (2009) 液状化細胞診 (Liquid Based Cytology) の現状と今後. *病理と臨床* **27**: 1144-51.
- 8) 平 紀代美, 松林 聡, 東 学, 中島真奈美, 今井直樹, 鈴木宏明, 田村 元, 竹原めぐみ, 山城勝重 (2006) Liquid-based cytology (Thin-layer標本) による乳腺穿刺針洗浄細胞診の評価. *日臨細胞誌* **45**: 77-83.
- 9) 野坂大喜, 水戸郁子, 奥沢悦子, 鷺谷清忠, 三浦富智, 方山揚誠, 佐藤達資 (2009) 乳腺細胞診におけるLBCの評価. *弘前大保健紀* **8**: 73-81.
- 10) 高久忠一, 幸野俊之, 池田俊一, 大塚重則, 是松元子, 扇田智彦, 山内一弘, 田中 昇, 羽山忠良 (2007) 尿細胞診でLiquid-based cytologyは有効か. *日臨細胞誌* **46** (S2): 367.
- 11) Soda M, Choi Y L, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe

- H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, and Mano H (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448** : 561-6.
- 12) Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW and Iafrate AJ (2010) Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **363** : 1693-703.
- 13) 増本純也, 末廣聡美 (2013) 分子病理診断の現状と未来. *臨床検査* **57** : 236-9.
- 14) 上野一郎 (2012) 今日から役立つ遺伝子検査実践マニュアル, 遺伝子関連検査 実践編 遺伝子関連検査における精度管理・制度保証. *Med Technol* **40** : 1557-61.
- 15) 宮路勇人, 増川敦子, 浅井さとみ (2004) DNA, RNA抽出法と取扱い上の注意点. *臨床病理レビュー* **128** : 139-48.
- 16) 増川敦子, 宮地勇人 (2007) 検体サンプリングと保存・運搬. *臨床検査* **51** : 1287-92.
- 17) 東野功嗣 (2005) 郵送検診におけるサンプリングと運搬. *臨床病理* **53** : 1122-8.
- 18) 宮地勇人 (2007) 検体前処理・核酸抽出法. *臨床検査* **51** : 1293-8.
- 19) 鍵弥朋子, 中村美砂, 森 一郎, 谷口恵美子, 西上圭子, 尾崎 敬, 覚道健一 (2008) 尿中細胞のDNA, RNAおよび細胞形態の経時的変化. *日臨細胞誌* **47** : 183-8.
- 20) Castle EP, Solomon D, Hildeshim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman EM, Rodriguez CA, Alfaro M, Hutchinson LM, Dunn TS, Kuypers J, and Schiffman M (2003) Stability of archived liquid-based cervical cytologic specimens. *Cancer Cytopathol* **99** : 89-96.
- 21) Agreda MP, Beitman HG, Gutierrez CE, Harris MJ, Koch RK, LaViers DW, Leitch VS, Maus EC, McMillan AR, Nussbaumer AW, Palmer LRP, Porter JM, Richart AG, Schab JR, and Vaughan ML (2013) Long-term stability of human genomic and human papillomavirus DNA stored in BD SurePath and hologic preservcyt liquid-based cytology media. *J Clin Microbiol* **51** : 2702-6.