

資料

組織切片を用いたInterphase cytogenetics（間期細胞遺伝学）の実際

大島 晋¹⁾,瀬山 敦²⁾

はじめに

殆どの腫瘍細胞の染色体には構造異常や数的異常などの様々な異常が見出され、これらの異常が癌の発生に密接に関わっていると考えられる¹⁾。従って腫瘍細胞における染色体異常を解析することによって腫瘍の発生機序に関わる重要な情報を得ることができるとともに、もしその腫瘍に特異的な染色体異常が見出されればそれを診断に応用することもできる。しかしながら従来の染色体検査法によって異常を検出するためには、細胞を培養して得られる分裂期の細胞について解析しなければならず、必ずしも全ての場合に異常を検出できるとはかぎらない。Cremerら^{2,3)}によって開発されたInterphase cytogenetics（間期細胞遺伝学）は、染色体特異的プローブを用いて間期細胞核における染色体数の異常や欠失・転座などの構造異常を解析する方法であり、この方法によって細胞を培養することなく染色体異常の一部を検出できるようになった。既に各方面で応用されており、例えば針穿刺吸引細胞を用いた乳腺腫瘍の診断⁴⁾、尿中細胞を用いた膀胱腫瘍の診断⁵⁾、外科摘出腫瘍材料より単離した細胞を用いた染色体欠失の同定⁶⁾、パラフィン包埋組織より分離した細胞を用いた染色体異常の同定^{7,8)}など、数多くの報告例がある。又、顕微鏡観察用に作成された組織切片にこの方法を用い、組織学的变化との関連において実施する試みも多数報告されている⁹⁻²²⁾。切片上で染色体異常を検出できれば形態学的異常との関連を厳密に検討できるので有利である。しかしながら組織切片、特に病理診断用に作成されたホルマリン固定一パラフィン包埋材料にこの方法を適用する場合は、種々の問題点があり、実施に際して注意が必要である。今回、ヒト子宮頸部の異形成病変ならびに上皮内癌の組織切片を用いてfluorescence in situ hybridization (FISH) 法により染色体数の異常を検出することを試みた結果、実施に際して留意すべきと思われるいくつかの問題点を体験することができたので紹介したい。尚、血液や肺癌細胞診材料などの遊離細胞について

は、既に本学の鈴木らによって実施方法についての検討結果が本誌に報告されている²³⁾ので、合わせて参考にしていただきたい。

材料と方法

1. 材料

1) 試料；被検試料としては、本学附属病院で採取された子宮頸部組織（生検あるいは円錐切除材料および摘出子宮）のホルマリン固定一パラフィン包埋材料を用いた。今回使用した検体は、異形成から微小浸潤癌へ進行した患者2名、および高度異形成と診断された患者1名より採取されたものである。

2) 各種試薬および溶液類

a) X染色体セントロメア用プローブ；Boehringer Mannheim社DNA probe, human chromosome X specific, digoxigenin-labeled（現在この製品は販売されていないが、同様のプローブで直接蛍光標識されたものが他社；VYSIS, Quantum Biotechnologies Inc. 等から販売されている。）

b) 第17番染色体セントロメア用プローブ；ヒト17番染色体を含むmouse hybrid cell²⁴⁾より抽出したDNA（JCRBCell Bankより入手、クローニング名；JCRB 2217D）とヒト染色体セントロメア共通配列を持つプライマー（TCAGAAACTTCTTG, GAATGCTCTGTCTAG-文献25参照）を使用したPCR反応によりプローブを作成し、digoxigenin標識して用いた。

c) ハイブリダイゼーション溶液；以下の成分を含む溶液を使用した。1 g/ml digoxigenin-labeled probe, 60% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 50 g/ml sheared salmon sperm DNA, 2×SSC

d) 切片洗浄液；0.5% Tween 20 / 2×SSC

e) ブロッキング溶液；0.5% Bovine Serum Albumin / 0.5% Blocking Reagent (Roche, Cat. No. 1096176)

f) 抗体溶液；fluorescein標識 - 抗digoxigenin抗体 (Roche, anti-digoxigenin-fluorescein, Fab fragments from sheep, Cat. No. 1207741) 20 g/ml in 0.5% BSA / 0.5% Blocking reagent

g) 核染色-封入溶液；5 g/ml PI (Propidium Iodide) および5% DABCO (1,4-di-azobicyclo-(2,2,2)-octane) を含む50% glycerol / PBS溶液

1) 埼玉医科大学中央研究施設形態部門

2) 埼玉医科大学病理学教室

[平成13年4月26日受付]

2. 方法

- 1) 切片の準備; FISH用には、シランコート付きスライドグラスに貼付した厚さ 5 mのパラフィン切片を用いた。FISH用切片作成と同時に隣接組織観察用切片(4 m)も新たに作成し、HE染色を行なった。
- 2) 前処理; 脱パラフィン後、乾燥した切片を2×SSC中に浸し、マイクロウェーブオーブンを使用して100 °Cで10分間、加熱した。切片を室温まで冷却後、0.4% pepsin - 0.2M HCl溶液中で37 °C-20 ~ 40分間、蛋白消化反応を行なった。消化反応に要する至適時間は検体により異なるので、最初20分間反応させてハイブリダイゼーションを行ない、シグナルが得られなかつた場合にはカバーグラスを外して再度20分間消化反応を行なった。消化反応後、2×SSCで2回、蒸留水で1回ゆすぎ、乾燥した。
- 3) ハイブリダイゼーション反応; ハイブリダイゼーション溶液10 ~ 15 lを切片上に滴下後カバーグラス(22×22 mm)を載せ、ラバーセメント(コクヨペーパーボンド)で周囲を密閉した。次にホットプレート上で80 °C-10分間、熱変性し、氷上で急冷した後、37 °Cのチャンバー内で4時間以上反応させた。
- 4) 洗浄および標識; ハイブリダイゼーション後ラバーセメントを除去し、切片を60% formamide - 2×SSC中で42 °C-10分間、0.1×SSC中で48 °C-15分間×2回、加温して余分なプローブを除去した。次に切片洗浄液で37 °C-10分間加温・洗浄し、ブロッキング溶液中に5分間(室温)置いた後、ブロッキング溶液で20 g/mlに希釈したfluorescein標識-digoxigenin抗体溶液約50 μlを切片上に載せ、37 °Cの湿潤箱内で30分間反応させた。反応後、切片洗浄液で5分間×3回洗浄し、核染色-封入溶液で細胞核染色と封入を同時に行なった。
- 5) 観察および計測; 観察と画像の取り込みは、正立型共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss Axioscop + BIO-RAD MRC-600)を用い、次のように行なった。FITCおよびPIの蛍光は488 nmのレーザー光源で別々に励起し、それぞれ×63の油浸レンズを用いてZ軸方向に0.6 m間隔で取りこんだ画像10枚を重ねて1枚の画像を作成した。その後両蛍光画像に擬似カラー(FITC; 緑, PI; 赤)をつけて合成し、1枚の最終画像とした。次に作成した画像を印刷し、細胞核境界が明瞭な物のみを選んで1枚の画像内で番号を付し、細胞毎のシグナル数を記録した。画像毎に1細胞当たりのシグナル数度数分布を集計し、ヒストグラムを作成した。一部の画像は、冷却CCDカメラ(Photometrics社製 Sensys 0400)を装着した蛍光顕微鏡(Carl Zeiss Axiophot)で記録し、レーザー顕微鏡画像との比較を行なった。
- 6) 結果の評価; 度数分布データより、細胞核1個当たりのシグナル数最頻値(Mode)および細胞核1個当

たりの平均シグナル数(X_{signal})を画像毎に計算した。また、シグナルを3個以上含む細胞の比率(百分率)をChromosome Index - 3C (CI_{3C})、シグナルを4個以上含む細胞の比率(百分率)をChromosome Index - 4C (CI_{4C})とし、同じく画像毎に計算した。

結 果

1. 通常の蛍光顕微鏡を用いて撮影した画像と共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した画像の比較

Fig. 1は子宮頸部粘膜上皮の正常部分についてX染色体プローブを用いて行なったFISHの画像である。aが通常の蛍光顕微鏡で観察した画像をCCDカメラで撮影したもの、bが共焦点レーザー顕微鏡でZ軸方向に0.6 m間隔で取りこんだ画像10枚を重ねて作成した画像である。aの画像とbの画像を比べると、bの方が核の輪郭が鮮明であるとともに1つの核に2個のシグナルが観察できる細胞の数が多い。細胞核1個当たりの平均シグナル数は、aの画像から算出した場合1.1であったのに対し、bの画像から算出した場合は1.4であった。また、aの画像ではシグナルがPIで染色された核からはみ出ているように見えるものもある。a, bともに使用した対物レンズはプランアポクロマート(x63, oil)であり、焦点深度は0.2 m程度である。従って、5 mの切片内にあるシグナルを全て同時に観察することはできないので、bの方法で作成した画像を用いた方がデータの信頼性が高い。

2. 計測例およびデータ

Fig. 2は、高度異形成と診断された子宮頸部粘膜生検材料(Case 1)について、X染色体プローブを用いて行なったFISH解析の例である。aが正常部分、cが異形成病変の画像であり、b, dはそれぞれの画像より作成したヒストグラムである。これらのグラフより細胞核1個当たりのX染色体シグナル数最頻値は、正常部分で2、異形成病変で4であることがわかる。この度数分布より計算したChromosome Index - 3Cは、正常部分で3.9、異形成病変で72.6であった。また、Chromosome Index - 4Cは、正常部分で1.3、異形成病変で40.3であった。Fig.3はFig.2と同じブロックから薄切された別の切片について、第17番染色体プローブを用いて行なったFISH解析の例(a; 正常、c; 異形成)である。b, dのヒストグラムより得られる第17番染色体シグナル数の最頻値は、正常部分で2、異形成病変で3である。Chromosome Index - 3Cは、正常部分で4.1、異形成病変で62.9であった。また、Chromosome Index - 4Cは、正常部分で1.0、異形成病変で8.1であった。

Table 1は今回検討した3例についての結果をまとめたものである。一部の検体に関してはX染色体についてのみ実施した結果である。3例とも異形成病変では両染色体の細胞核1個当たりのシグナル数平均値が

増加していた。Table 1に示されている正常検体全てにおける細胞1個当たりのシグナル数平均値の全平均は、X染色体に関しては1.5, 17番染色体に関しては1.4であったが、異形成あるいはCIS病変における全平均は、X染色体に関しては2.2, 17番染色体に関しては2.0であった。同様に、正常検体全てにおけるChromosome Index - 3Cの平均値は、X染色体に関しては1.9, 17番染色体に関しては1.2であったが、異形成あるいはCIS病変では、X染色体に関しては39.3, 17番染色体に関しては32.1であった。また、正常検体全てにおけるChromosome Index - 4Cの平均値は、X染色体に関しては0.4, 17番染色体に関しては0.1であったが、異形成あるいはCIS病変では、X染色体に関しては18.1, 17番染色体に関しては4.8であった。

考 察

1. 前処理法について

ホルマリン固定 - パラフィン包埋組織から作成した切片を用いてFISHを実施する際、その成否を左右するのはハイブリダイゼーション反応前に行う前処理法である。一般にホルマリン固定 - パラフィン包埋組織では、標的DNAが蛋白に強くマスクされているため、何らかの方法でこの蛋白を除去しなければならない。通常この目的にはTable 2に示したように、0.025% proteinase K (Wolf et al.), 1M sodium thiocyanate + 0.4% pepsin in 0.2 M HCl, 熱処理(沸騰クエン酸緩衝液中)などが用いられている。どの方法が最も良いかは、組織の固定条件などによって異なるので、各施設で検討する必要があると考えられる。前処理が不充分であるとシグナルが得られないが、逆に前処理が強すぎると組織が壊れてしまうことがあるので、組織を破壊しないぎりぎりの条件を見出さなければならない。今回の検討でもいくつかの方法を試してみたが、熱処理(2×SSC中で100 °C-10分間) + 0.4% pepsin in 0.2 M HCl (37 °C, 20~40分間)が最も良い結果を与えた。Southernらが用いている1M-NaSCNによる処理^{18,22}を行なうと切片が剥がれてしまうことが多かったので、今回は行なわなかった。またpepsin消化に関しては、標本によっては20分間では不充分な場合があり、その場合には再度20分間の消化反応を行なった。尚、この後に述べるように、この前処理によって核が膨化し、核の重なりの原因となるのでこの点を改良するための検討が必要かもしれない。尚、藤沢薬品よりパラフィン切片を用いたFISH用の前処理試薬キット；Paraffin Pretreatment Reagent Kit (Vysis社 VYS-32-801200)が販売されており、以下のホームページにてそのプロトコールも紹介されているので参考にしていただきたい。http://www.fujisawa.co.jp/reagent/VYS/index1.html

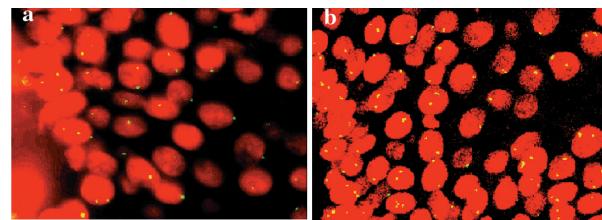


Fig. 1. FISH analysis of a tissue section of normal cervical epithelium using a centromere probe for chromosome X. *a*. An image acquired with a conventional fluorescent microscope equipped with a cooled CCD camera. *b*. An image acquired with a confocal laser scanning microscope. This image was constructed by projection of 10 optical section images acquired in 0.6 m steps along Z axis.

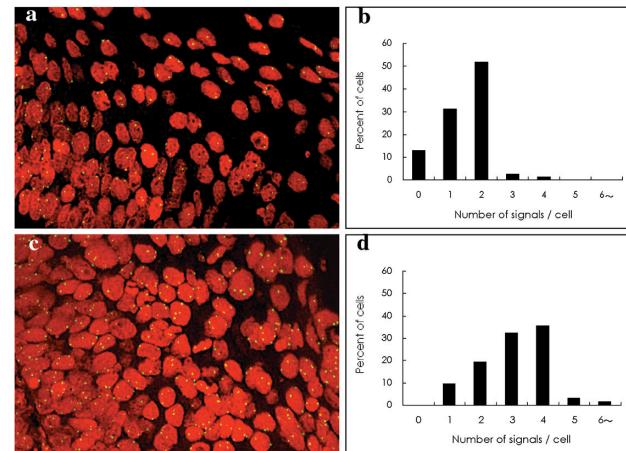


Fig. 2. Representative examples of interphase cytogenetic analysis using a centromere probe for chromosome X. *a*. FISH image of a normal epithelium of case 1. *b*. Histogram derived from an image a (Mode; 2, X_{signal} ; 1.5, CI_{3C}; 3.9, CI_{4C}; 1.3). *c*. FISH image of a dysplasia lesion of case 1. *d*. Histogram derived from an image c (Mode; 4, X_{signal} ; 3.0, CI_{3C}; 72.6, CI_{4C}; 40.3).

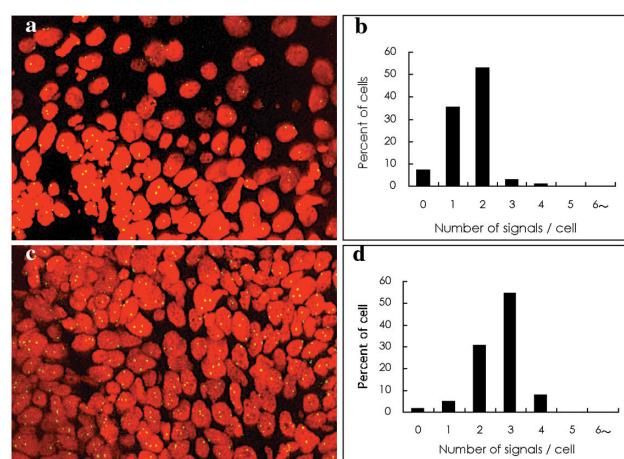


Fig. 3. Representative examples of interphase cytogenetic analysis using a centromere probe for chromosome 17. *a*. FISH image of a normal epithelium of case 1. *b*. Histogram derived from an image a (Mode; 2, X_{signal} ; 1.6, CI_{3C}; 4.2, CI_{4C}; 1.0). *c*. FISH image of a dysplasia lesion of case 1. *d*. Histogram derived from an image c (Mode; 3, X_{signal} ; 2.6, CI_{3C}; 62.9, CI_{4C}; 8.1).

Table 1. Specimen data and results of interphase cytogenetics

Case No.	Material	Date of operation	Pathological Diagnosis	Chromosome X		Mean [SD]		Chromosome 17		Mean [SD]			
				Analysed area (# of images used)	Mode	X _{signal}	CI _{3C}	CI _{4C}	Analysed area (# of images used)	Mode	X _{signal}		
1	Cervical biopsy	94/7/12	Severe dysplasia	Normal ^a	2.0	1.6	3.6	1.1	Normal ^c	2.0	1.5	2.1	0.5
				(3)	0.0	0.1	2.2	1.0	(2)	0.0	0.2	3.0	0.7
				Dysplasia ^b	2.7	2.6	49.0	21.4	Dysplasia ^d	2.7	2.3	45.5	7.5
2	Cervical biopsy	94/11/14	Severe dysplasia	Normal	1.0	1.3	0.0	0.0	Normal	2.0	1.6	2.0	0.0
				(1)					(2)	0.0	0.1	1.1	0.0
				Dysplasia	2.3	2.2	41.5	18.2	Dysplasia	2.3	2.1	30.9	1.1
3	Cervical conization	94/12/13	Microinvasive carcinoma	Normal	2.0	1.6	3.1	0.0					
				(2)	0.0	0.1	3.0	0.0					
				CIS	3.0	2.9	64.0	31.2					
Hysterectomy		94/11/16	Microinvasion suspected	Normal	2.0	1.3	0.5	0.0	Normal	1.0	1.3	0.0	0.0
				(1)					(2)	0.0	0.1	0.0	0.0
				Dysplasia	2.0	1.6	19.3	9.6	Dysplasia	2.0	1.6	17.2	1.9
3	Hysterectomy	96/9/18	Severe dysplasia	Normal	2.0	1.4	0.0	0.0					
				(1)									
				Dysplasia	1.6	1.8	19.5	5.3	Dysplasia	2.6	2.1	33.2	8.2
				(5)	0.5	0.5	17.3	7.2	(5)	0.5	0.6	27.6	8.3

CIS; Carcinoma In Situ, Mode; Modal signal number / cell, X_{signal}; Mean signal number / cellCI_{3C}; Chromosome Index - 3C (Percentage of cells with 3 signals or more), CI_{4C}; Chromosome Index - 4C (Percentage of cells with 4 signals or more)

a Representative data is shown in Fig. 2-a,b

b Representative data is shown in Fig. 2-c,d

c Representative data is shown in Fig. 3-a,b

d Representative data is shown in Fig. 3-c,d

Table 2. Representative publications and employed methods for interphase cytogenetics with formalin-fixed paraffin embedded tissue section

First author	Year	Tissue	Pretreatment	Thickness	Detection	Microscope	Chromosomes studied	Abnormalities detected	Reference No.
Van de Kaa CA	1991	Hydatidiform mole	1M NaSCN + 0.4% pepsin	6 µm	PO	BF	3, X	Trisomy in hydropic abortion tissues	9
Kim SY	1993	Lung	0.4% pepsin	4 - 6 µm	PO	BF	7, 17	Gain of signals in tumor cells	10
Miranda RN	1994	Bone marrow	0.025% PK	5 µm	FITC	FL	8	Trisomy or tetrasomy in AML cells	11
Thompson CT	1994	Melanoma	0.4% pepsin	20 µm	FITC	CF	1	Trisomy in tumor cells	12
Wolf NG	1996	Ovary	30% NaSO ₃ + 0.025% PK	6 µm	FITC	CF	8, 12, 17	Aneusomy in tumor cells	13
Southern SA	1996	Cervix	1M NaSCN + 0.4% pepsin	6 µm	PO	BF	17, X	Trisomy or tetrasomy in tumor cells	14
Aubel M	1997	Prostate	Pronase E	5, 15 µm	FITC, Cy3	CF	7, 12	Trisomy or tetrasomy in tumor cells	15
Hopman AHN	1997	Bladder	1M NaSCN + 0.4% pepsin	4 - 6 µm	PO + AP	BF	1, 7, 15, 18	Not specified	17
Southern SA	1997	Cervix	1M NaSCN + 0.4% pepsin	6 µm	PO	BF	11, 17, X	Trisomy or tetrasomy in tumor cells	18
Southern SA	1997	Cervix	1M NaSCN + 0.4% pepsin	6 µm	PO	BF	1, 3, 11, 17, 18, X	Tetrasomy in basal cells	19
Graham DA	1998	Cervix	1M NaSCN + 0.4% pepsin	6 µm	PO	BF	1, 3, 11, 17, 18, X	Aneusomy or tetrasomy in tumor cells	20
Bulten J	1998	Cervix	1M NaSCN + 0.4% pepsin	3 µm	PO	BF	1, 3, 6, 7, 8, 11, 17, X	Gain of signals in tumor cells	21
Giannoudis A	2000	Cervix	1M NaSCN + 0.4% pepsin	6 µm	PO	BF	1, 3, 4, 6, 10, 11, 17, 18, X	Tetrasomy in basal cells	22

PK; Proteinase K, PO; Peroxidase, AP; Alkaline Phosphatase, BF; Bright field, FL; Fluorescence, CF; Confocal

2. 切片の厚さ

組織切片にInterphase cytogeneticsを応用する場合に最も留意しなければならないのは切片の厚さである。切片作成過程において、当然のことながら切片表面に位置する細胞核は切断される。従って切片が薄ければ薄いほど切断される細胞核数の割合が高くなり、細胞核1個当たりに得られるシグナル数の平均値は減

少する。一方、切片を厚くすれば切片内に細胞核全体が取まる割合が高くなり、細胞核1個当たりのシグナル数の平均値は真の値に近づく。しかしながら今度は切片内で重なり合う細胞核の割合が高くなり、細胞密度が高い組織では正確なシグナル数のカウントができなくなる。例えばFig. 2-aの写真にみられるように図の右上方、即ち扁平上皮の上層部分では細胞密度が比

較的低いために核の重なりは殆ど無いが、図の左下方、即ち基底層に近い部分では細胞密度が高く、核が重なり合って細胞核境界が不明瞭なためにこの部分のシグナル数をカウントすることは困難である。ホルマリン固定—パラフィン包埋組織では前に述べたように Hybridization 前の酵素処理が必要不可欠であるが、この酵素処理によって核が膨化するので通常の組織標本よりも核の重なりが多くなる。今回の検討ではレーザー顕微鏡で取りこんだ Z 軸方向の断層画像を重ね合わせて 1 枚の画像を作成しているので、個々の断層画像を詳細に検討すれば核の重なりの有無をある程度知ることができる。しかし全ての画像について断層像を確認するのは非常に手間のかかる作業なので、多数検体について処理する場合にはあまり現実的ではない。又、切片が厚くなるとプローブが浸透しにくくなるという問題も生じる。切片の厚さがデータに与える影響について検討した報告がいくつかある^{12,15)}が、現在、多くの論文では 4 ~ 6 m の厚さを採用している。中には 3 m の切片を用いているもの²¹⁾や、15 m や 20 m の厚切り切片を使用し、レーザー顕微鏡により 3 次元的に観察しているもの^{12,15)}もある。どの程度の厚さにするかは検索対象組織の細胞密度と細胞の大きさや、観察方法を考慮して決めなければならない。また、細胞密度や細胞の大きさが検索対象の領域内で不均一な場合や病変の有無によって異なる場合には、細胞密度の高い部分での細胞の重なりが最小限になるように切片の厚さを選択するか、あるいは細胞の重なった部分を除外して検索する必要が生じる。今回の検討では Southern らの論文^{14,18,19)}を参考にして 5 m (Southern らは 6 m) の切片を使用したが、この厚さでは彼らが注目した基底細胞層については核の重なりが多すぎて殆どシグナル数のカウントはできなかった。これには前処理方法の違いも影響しているかもしれないが、彼らの観察との違いについて詳しい原因は不明である。

3. 共焦点レーザー顕微鏡使用の必要性

Table 2 に見られるように、多くの研究者は通常の厚さの組織切片に対しては従来の光学顕微鏡を用いており、必ずしも共焦点レーザー顕微鏡を用いていない。しかし結果 1 で述べたとおり、通常の厚さの組織切片を用いる場合でも共焦点顕微鏡を用いた方が信頼性の高いデータを得る事ができるのは明らかである。ただし共焦点顕微鏡を用いてデータを取るためにそれなりの手間がかかるので、多くの検体を処理するには向きである。従って目的によって使い分ける必要があると思われる。

4. 染色体数評価の意義

今回の検討では、染色体特異的プローブを用いて染色体数の異常を検出する方法について検討した。腫瘍細胞における染色体数異常検出の意義については、最初に述べたように、腫瘍の発生機序に関する情報を得

るという意味と、それを診断に応用するという 2 つの側面がある。殆どの腫瘍細胞では染色体数の異常が見られるが¹⁾、この染色体数の変化が腫瘍の発生過程を持つ意味については、今日においても尚その詳細は不明である。多くの腫瘍では、その初期段階で 4 倍性細胞の集団がみられ、病変の進行と共に異数性細胞の集団が現れることが報告されている^{18,19,22,26,27)}。例えば Southern らは、子宮頸部の low-grade cervical squamous intraepithelial lesion の基底細胞層では調べた 6 種の染色体全てが tetrasomy を示した¹⁹⁾が、浸潤癌細胞では 11 番および 17 番染色体の数が X 染色体の数に比べて相対的に減少していることを報告している¹⁸⁾。今回の我々の検討でも、dysplasia あるいは CIS 病変において 17 番染色体の Chromosome Index - 4C (平均 4.8) が X 染色体の Chromosome Index - 4C (平均 18.1) に比べて低い傾向がみられた。これは 17 番染色体の数が X 染色体に比べて相対的に少ないことを意味しており、Southern らの観察結果と一致している。又、実験的にも 4 倍性細胞は遺伝的に不安定で、異数性細胞に移行すること^{28,29)}や、放射線で誘発された遺伝的に不安定な細胞は、その多くが染色体異数性を示すことが報告されている³⁰⁾。従って、染色体数の変化が遺伝的に不安定な phenotype と密接に関連していることは明らかであるが、その分子生物学的意義は不明である。しかし最近では細胞に遺伝的不安定さを誘発する遺伝子異常³¹⁾や、細胞分裂時における染色体複製および分離を制御する分子生物学的機序³²⁾に関する知見も集積されつつあるので、腫瘍の発生過程における染色体数変化が持つ意味も次第に明らかにされるものと期待される。また、今回検討した組織切片上での Interphase cytogenetics を様々な実際の腫瘍について行なえば、各腫瘍の組織学的变化に対応した染色体数の変化について解析することができ、腫瘍の発生機序解明に貢献できるものと思われる。

文 献

- Gray JW, Collins C. Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 2000;21:443-52.
- Cremer T, Landegent J, Bruckner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive *in situ* hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Human Genetics* 1986;74:346-52.
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manvelidis L. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by *in situ* hybridization using chromosome-specific library

- probes. *Human Genetics* 1988;80:235-46.
- 4) 野口眞三郎, 塚本文音, 三好泰雄, 稲治英生, 綿谷正弘, 笹三徳, 他. 遺伝子診断の乳癌診察への応用 -穿刺細胞診検体を用いた乳癌のFISH診断-. 癌と化学療法 1999;26:2127-30.
 - 5) 浦野俊一. 尿中脱落細胞を用いたFISH法による膀胱癌診断. 安部達生監, 稲澤譲治編. 臨床FISHプロトコール. 東京:秀潤社;1997. p.169-71.
 - 6) 橋本直哉. ダブルターゲットFISH法による染色体欠失の同定. 安部達生監, 稲澤譲治編. 臨床FISHプロトコール. 東京:秀潤;1997. p.148-52.
 - 7) Lee W, Han K, Harris CP, Shim S, Kim S, Meiner LF. Use of FISH to detect chromosomal translocations and deletions. Analysis of chromosome rearrangement in synovial sarcoma cells from paraffin-embedded specimens. *Am J Pathol* 1993;143:15-9.
 - 8) Hytytinen E, Visakorpi T, Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Isola JJ. Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* 1994;16:93-9.
 - 9) Van de Kaa CA, Nelson KAM, Ramaekers FCS, Vooijs PG, Hopman AHN. Interphase cytogenetics in paraffin sections of routinely processed hydatidiform moles and hydropic abortions. *J Pathol* 1991;165:281-7.
 - 10) Kim SY, Lee JS, Ro JT, Gay ML, Hong WK, Hittelman WN. Interphase cytogenetics in paraffin sections of lung tumors by non-isotopic *in situ* hybridization. *Am J Pathol* 1993;142:307-17.
 - 11) Miranda RN, Mark HFL, Medeiros LJ. Fluorescent *in situ* hybridization in routinely processed bone marrow aspirate clot and core biopsy sections. *Am J Pathol* 1994;145:1309-14.
 - 12) Thompson CT, LeBoit PE, Nederlof PM, Gray JW. Thick-section fluorescence *in situ* hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissue provides a histogenetic profile. *Am J Pathol* 1994;144:237-43.
 - 13) Wolf NG, Abdul-Karim FW, Schork NJ, Schwartz S. Origins of heterogeneous ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 1996;149:511-20.
 - 14) Southern SA, Herrington CS. Assessment of intratumoral karyotypic heterogeneity by interphase cytogenetics in paraffin wax sections. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996;49:M283-9.
 - 15) Aubele M, Zitzelsberger H, Szucs S, Werner M, Braselmann H, Hutzler P, et al. Comparative FISH analysis of numerical chromosome 7 abnormalities in 5- m and 15- m paraffin-embedded tissue sections from prostatic carcinoma. *Histochem Cell Biol* 1997;102:212-6.
 - 16) Werner M, Wilkens, L, Aubele M, Nolte M, Zitzelsberger H, Komminoth P. Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Histochem Cell Biol* 1997;108:381-90.
 - 17) Hopman AHN, Claessen S, Speel EJM. Multi-colour bright field *in situ* hybridization on tissue sections. *Histochem Cell Biol* 1997;108:291-8.
 - 18) Southern SA, Herrington CS. Interphase karyotypic analysis of chromosomes 11, 17 and X in invasive squamous-cell carcinoma of the cervix: morphological correlation with HPV infection. *Int J Cancer* 1997;70:502-7.
 - 19) Southern SA, Evance MF, Herrington CS. Basal cell tetrasomy in low-grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with high-risk human papillomaviruses. *Cancer Res* 1997;57:4210-3.
 - 20) Graham DA, Southern SA, McDicken IW, Herrington CS. Interphase cytogenetic evidence for distinct genetic pathways in the development of squamous neoplasia of the uterine cervix. *Lab Invest* 1998;78:289-96.
 - 21) Bulten J, Poddighe PJ, Robben JCM, Gemmink JH, Wilde PCM, Hanselaar AGJM. Interphase cytogenetic analysis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 1998;152:495-503.
 - 22) Giannoudis A, Evance MF, Southern SA, Herrington CS. Basal keratinocyte tetrasomy in low-grade squamous intra-epithelial lesions of the cervix is restricted to high and intermediate risk HPV infection but is not type-specific. *Br J Cancer* 2000;82:424-8.
 - 23) 鈴木美穂, 宮下ひとみ, 高濱素秀. 染色体セントロメアについての共焦点レーザー走査顕微鏡によるFISH法の基礎的検討. *埼玉医大誌* 1995;22:203-9.
 - 24) Tanabe H, Nakagawa Y, Minegishi D, Hashimoto K, Tanaka N, Oshimura M, et al. Human monochromosome hybrid cell panel characterized by FISH in the JCRB/HSRRB. *Chromosome Res* 2000;8:319-34.
 - 25) Koch JE, K(o)lvraa S, Petersen KB, Gregersen N, Bolund L. Oligonucleotide-primer methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma* 1989;98:259-65.
 - 26) Galipeau PC, Cowan DS, Sanchez CA, Barrett MT, Emond MJ, Levine DS. 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1220-5.

- Sci USA 93;1996:7081-4.
- 27) Shackney SE, Shankey TV. Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. *Cytometry* 29;1997:1-27.
- 28) Levine DS, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Reid BJ. Formation of the tetraploid intermediate is associated with the development of cells with more than four centrioles in the elastase-simian virus 40 tumor antigen transgenic mouse model of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 88;1991:6427-31.
- 29) Andreassen PR, Martineau SN, Margolis RL. Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. *Mutat Res* 371;1996:181-94.
- 30) Little JB, Nagasawa H, Pfenning T, Vetrov H. Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenic effects of X rays and alpha particles. *Radiat Res* 1997;148:299-307.
- 31) Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.
- 32) Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, et al. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 58;1998:3974-85.