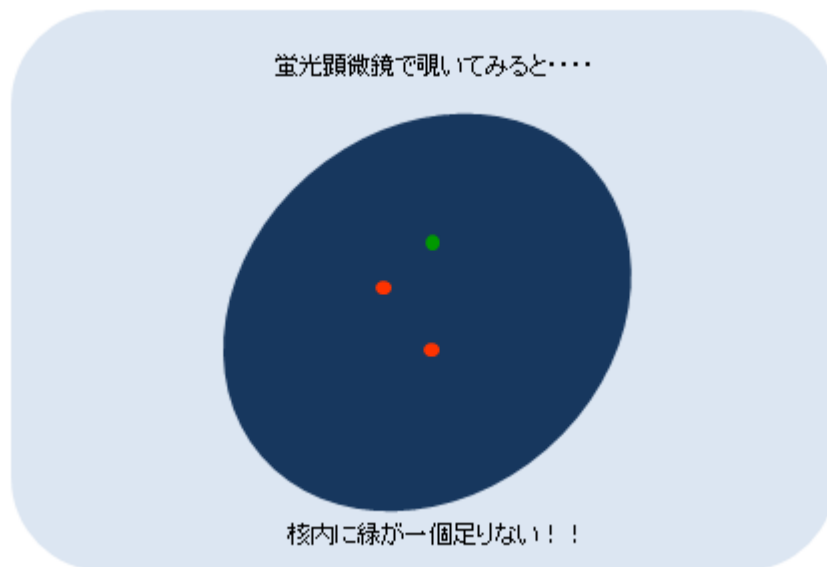
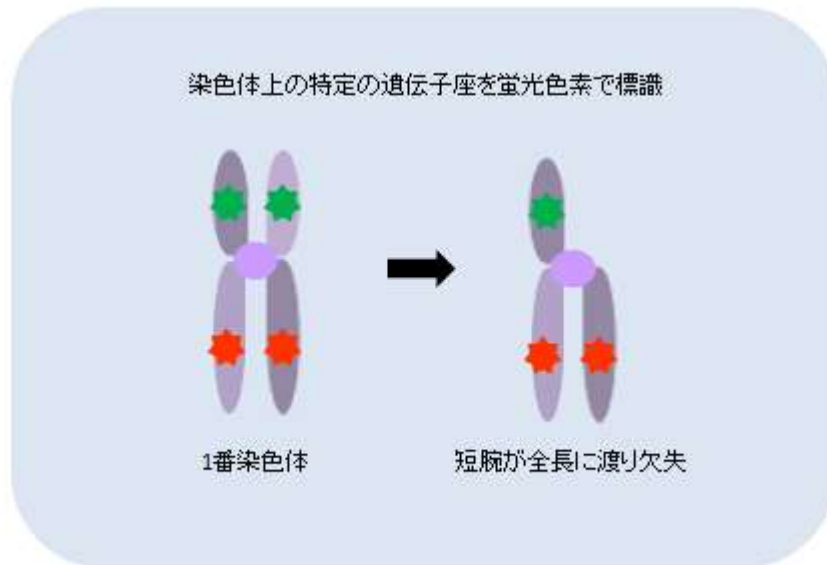


2016年WHO脳腫瘍分類の改訂に伴い、Low grade glioma の診断に IDH 変異と共に 1p/19q LOH の評価が必須となった。組織形態と免疫染色所見のみでは 1p/19q LOH の評価は不可能であり、FISH の他、マイクロサテライト法、SNP array、array CGH 等の方法が必要である。

上記の中で、最も簡便で現在の設備で実現可能な FISH について 1p/19q LOH 評価のためのプロトコルを考案した。



ex. 1p LOH のシェーマ

※本来は全腕の欠失を証明する必要があるが、FISH では特定の遺伝子座しか見ていないことに注意。
また、同一の核内で 1 番染色体短腕と 19 番染色体長腕の欠失を証明したいがそれは原理上ほぼ不可能。
※※diffuse glioma 133 例に対して次世代シーケンサーで 50 例が 1p/19q LOH と判定された。一方、FISH で

1p/19qLOH と判定されたのは 34 例で、さらにその内訳 4 例は次世代シーケンサーでは陰性と判定されたものだった。(κ - value = 0.59) 参考文献 2

《準備する試薬・調整・保存法》

Probe mixture

キット：VYSIS LSI 1P36/LSI 1Q25 and LSI 19Q13/19P13 Dual Color Probe
を使用します。-20℃保存 2年間



DAPI II counterstain

10μl ずつ分注して-20℃に保存してあります。



20X SSC solution

調整済み試薬が医局にあります。外気温で保存。保存期間は 6 か月間。

2X SSC solution

20X SSC100ml(pH5.3)を純水 850ml で溶解し NaOH で pH7.0±0.2 に調整した後、
純水で計 1000ml にメスアップ。外気温で保存。保存期間は 6 か月間。

2X SSC / 0.1% NP-40 wash solution

20X SSC100ml(pH5.3)に純水 850ml たして、NP-40 1ml を加える。NaOH で pH7.0±0.2 にして純水で計 1000ml
にメスアップ。外気温で保存。保存期間は 6 か月間。

2X SSC / 0.3% NP-40 wash solution

20X SSC100ml(pH5.3)に純水 850ml たして、NP-40 3ml を加える。NaOH で pH7.0±0.2 にして純水で計 1000ml
にメスアップ。外気温で保存。保存期間は 6 か月間。

Denaturation solutions (70%formamide / 2X SSC)

脱イオン化ホルムアミド 49ml※ + 20X SSC 7ml(pH5.3) + 純水 14ml
pH7.0~8.0 となるように。

遮光して 2~8°で保存。保存期間は 1 週間。

※50ml ファルコンチューブにレジン 2.5g を入れホルムアミドをぎりぎりまで入れる。遮光した状態で 30

分間揺らす。チューブを立てて静置し上澄み 49ml を用いる。



エタノール

100%エタノール + 純水

□70%, 85%, 100%を作成。

外気温で保存。

4%パラホルムアルデヒド/PBS

4度冷蔵庫に保存しています。遮光してください。

0.2N HCL

12N HCL 1.67ml に DDW を加え 100ml にメスアップ。

遮光して保存。塩酸は取扱に注意。

プロテイナーゼ K / PBS

プロテイナーゼ K (10mg/ml)が 0.5ml ずつ分注して - 20℃に保管してあります。

上記 1 本を PBS に溶解して 100ml(50μg/ml)として使用。



《プロトコール》

□検体前処理

1・パラフィン切片(4-8 μ m)をあらかじめ 60℃で 30-60 分インキュベーション。



2・脱パラ：キシレン 5分×3、エタノール（70,85,100% 各 5分）,PBS 5分×3



3・除蛋白：0.2N 塩酸（室温 20分）， DDW で洗浄後 PBS（室温 5分）

この時、塩酸が切片の上の方に残らないようにコプリンジャーの上まで DDW 入れとく。



4・除蛋白：プロイテナーゼ K/PBS（50 μ g/ml 37℃ 15 分間が目安ですが、組織の固定状態で至適時間が異なります。） → PBS 室温 5分×3 で洗浄。

※脱パラ開始時にプロイテナーゼ K を on ice で解凍始めておき、PBS100ml に溶解して使用開始 30 分前（だいたい、エタノール脱水の頃）から恒温槽で 37 度にしておく。



5・後固定：4%PFA/PBS 室温 5分 （使用前から冷蔵庫から出して常温にしとく。遮光。）

6・PBS 5分×3 → 風乾

□検体の準備

Denaturation solution（7%ホルムアミド/2X SSC）を入れたコプリンジャーを 73±1 度の恒温槽に約 30 分間入れる。（検体の除蛋白操作の頃に開始しとく。）



1.Diamond tipped scribe で「イブリダグ」させる領域にマークする（スライドの裏）

2.denaturation solution の温度が 73±1℃であることを確認すること。



3.スライドを denaturation solution に 5 分間浸漬。ただし、4 枚以上のスライドを同時に浸漬しないこと。

4.すぐにスライドを冷 70%エタノール→85%エタノール→100%エタノールの順に各 1 分間ずつ浸漬し脱水する。



□Probe mixture の準備

1. 検体の除蛋白操作頃に on ice で解凍しとく。1 検体に 10μl ずつ。

2. Probe mixture 10μl を 1～3 秒間遠心分離にかける。

3.vortex して再度遠心分離にかける。

4.チューブを 73±1℃の恒温槽で 8 分間加温する。

5.チューブを恒温槽からとりだし氷上で急冷する。

※probe の準備が済んだ時点でスライドの準備が既に整っている場合は、すぐに probe を apply することが可能。操作は遮光して行う事。



□ハイブリダイゼーション

1. スライドを 100%エタノールからとりだす。
2. ペーパータオルでスライドの底辺の縁から水分を吸収し裏面を拭き取り乾燥させる。
3. スライドを 73°Cのウォーマー上に置いて残存したエタノールを蒸発させる。
4. 10 μ L の probe mixture を滴下し速やかにカバースリップで被覆する。



5. ペーパーボンドでカバースリップを seal する。



6. スライドをモイストチャンバー内に並べ 37°Cで 6~16 時間インキュベーションする。十分なシグナルを得るには 12~16 時間からやってみること。



□スライドの洗浄

70ml 0.4X SSC/0.3% NP-40 wash solution をコプリンジャーにいれ、最低 30 分間 73 \pm 1°Cの恒温槽で温めておく。



70ml 2X SSC/0.1% NP-40 wash solution をコプリンジャーに入れる。これは外気温で良い。

※0.4X SSC/0.3% NP-40 wash solution の温度を確実に 73 \pm 1°Cに維持する事。4 枚同時に洗う事。

1.検体スライドのカバーリップを外し、すぐに 0.4X SSC/0.3% NP-40 wash solution に浸漬し、1～3 秒間揺する。残りのスライドも同様に行う。

2.2 分後にスライドを取り出す。

※wash solutions の温度を確実に $73 \pm 1^\circ\text{C}$ にする。

3. 2X SSC/0.1% NP-40 wash solution に浸漬し 1～3 秒間揺する。5 秒～1 分後に取り出す。

遮光した状態でスライドを風乾させる。



□ビジュアライゼーション

10 μL の DAPI II counterstain をスライドの標的領域に apply しカバーリップをかける。

マニキュアでシーリングする。



・・・終了！

医局病理室の顕微鏡で観察できます

→電源を ON



Leica Application を click



①、②の順にスイッチを入れて、



📷を蛍光用に切り替え



光顕“BF” → 蛍光“FLUO”に切り替え



camera を DFC 360FX – 442840310 に切り替え

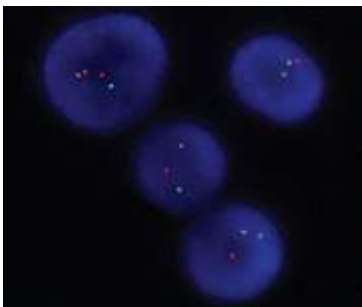


光源を on



顕微鏡本体のタッチパネルで IL-shutter を開き、フィルターを選択。

フィルターは、A4 → DAPI、 L5 → spectrum green、 N3 → spectrum orange が観察できるように対応しています。各フィルターで検鏡した画像を marge すると・・・。



※ 多くの文献では全体の 75% に LOH がみられる場合陽性と判定しているようです (参考文献 1)。

以上を 1 番染色体 (1P36/1Q25 プローブ)、19 番染色体 (19Q13/19P13 プローブ) でそれぞれ評価して両者に LOH がみられれば oligodendroglial tumor と診断されます。

参考文献

1. Whitmore RG, Krejza J, Kapoor GS, Huse J, Woo JH, Bloom S, et al. Prediction of oligodendroglial tumor subtype and grade using perfusion weighted magnetic resonance imaging. *Journal of neurosurgery*. 2007;107(3):600-9.
2. Hendrikus et al. Molecular classification of anaplastic oligodendroglioma using next-generation sequencing: a report of the prospective randomized EORTC Brain Tumor Group 26951 phase III trial. *Neuro-Oncology* 18(3),388-400,2016
3. 菱川善隆、小路武彦 : In situ ハイブリダイゼーションの基礎と応用. 組織細胞化学 2010 (日本組織細胞化学会編)、pp.47-60, 2010