

【背景】 癌の予後予測因子あるいは治療の効果予測因子として、免疫組織学検査だけでなく、RNA 解析により評価されるバイオマーカーが次々と同定されてきた。近年、大腸癌領域では、腫瘍組織から抽出した RNA を用いて複数の遺伝子発現解析結果から癌の予後予測や治療選択を行う Oncotype DX Colon Cancer Assay や ColoPrint 等の方法が開発されている。

従来、手術切除標本の病理組織学評価はホルマリン固定により行われ、RNA も抽出されていた。しかし、ホルマリン固定標本から抽出した RNA は断片化が高度となる。一方、凍結検体からは良質な RNA が抽出できるが、免疫組織染色や長期間の保存には不向きである。今後、バイオマーカーの導入により、免疫組織学検査と RNA 解析の両者に適切である組織保存法の開発が望まれた。

最近ホルマリンを使用せず、良好な RNA を保存し、かつ免疫組織学的染色にも有用な方法として PAXgene tissue system (PAX)が開発された。これまでに動物試料だけでなく大腸癌組織でも PAX から得られた RNA は質、量ともに優れることが報告されているが、大腸癌において個々の遺伝子の発現解析結果にどのような影響を与えるかはこれまでに検討されていない。我々は、大腸癌手術検体を用いて、PAX から得られた RNA が質および量や遺伝子発現にどのような影響を与えるかを凍結検体およびホルマリン固定検体と比較検討した。

【方法】 大腸癌手術症例 10 例を対象とし、切除摘出後直ちに検体を採取し、凍結、ホルマリン固定（6 時間固定、48 時間固定）および PAX の 3 種類の方法で保存し、RNA ならびに病理組織学的解析を行った。RNA の質は、バイオアナライザーを用い RNA integrity numbers (RINs : RIN>7 の時良質な RNA と判断)を測定した。遺伝子発現は、*GPX1*, *VDAC2*, *ABL1*, *EGR1* および内在性コントロールとして *GAPDH* をリアルタイム RT-PCR (SYBR Green 法)にて解析した。

病理組織学的解析は HE 染色を行い、Ki-67、CEA、epidermal growth factor receptor (EGFR) の免疫組織学的染色を実施した。

【結果】RNA の質を評価する RIN はホルマリン検体と比較し凍結検体と PAX 検体において有意に高値であった ($P < 0.001$)。遺伝子発現解析では、リアルタイム RT-PCR による cycle threshold (Ct) 値は凍結検体と PAX 検体では同等だったが、ホルマリン検体では有意に高値となり遺伝子発現が低下していた ($P < 0.001$)。ホルマリン固定を 48 時間行った検体は 6 時間固定検体よりも更に Ct 値が高かった。GAPDH (内在性コントロール) との差である ΔCt 値は、PAX 検体では凍結検体と差を認めなかったが、ホルマリン検体の多くで凍結検体と有意な差を認めた。病理組織学的解析では、HE 染色による組織・細胞形状、および免疫組織染色の染色強度に PAX 検体とホルマリン検体で差を認めなかった。

【考察】本研究により、PAX 検体から得られた RNA はホルマリン検体に比べ高品質で凍結検体と同等の質を保ち、遺伝子発現においても PAX から得られた RNA を用いた解析結果は凍結検体とほぼ同様となったが、ホルマリン検体では凍結検体と異なるケースが少なからず認めた。免疫組織学的検査においても PAX は十分使用できることを示した。

PAX には更に 2 つの長所がある。長時間固定を行ってもホルマリン固定の 6 時間と 48 時間のような差は生じない。また、凍結検体と異なり PAX は室温輸送が可能となる。PAX は凍結保存およびホルマリン固定両者の欠点を補う方法であり、RNA の保存性に優れ、形態学および免疫組織学的検査にも悪影響を及ぼさず、長時間固定による劣化もなく、保存コストや輸送コストもかからないため、ホルマリンに代わる方法の 1 つの候補となりうる。