

|            |   |
|------------|---|
| 氏 名 ・ (本籍) | 廣嶋 優子 (秋田県)   |
| 専攻分野の名称    | 博士 (医学)   |
| 学位記番号      | 医博甲第 902 号  |
| 学位授与の日付    | 平成 28 年 3 月 22 日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当  |
| 研究科・専攻     | 医学系研究科医学専攻  |
| 学位論文題名     | <b>Rapid immunohistochemistry of IDH-1 for<br/>the intraoperative diagnosis of gliomas</b><br>(膠腫手術における術中迅速 IDH-1 免疫組織化学染色) |
| 論文審査委員     | (主査) 教授 石川 和夫<br>(副査) 教授 寺田 幸弘 教授 大森 泰文   |

## 学位論文内容要旨

論文題目 Rapid immunohistochemistry of IDH-1 for the intraoperative diagnosis of gliomas

(論文題目の和訳) 膠腫手術における術中迅速 IDH-1 免疫組織化学染色

申請者氏名 廣嶋 優子

### 研究目的

IDH1 に特異的な突然変異は、星状細胞腫、乏突起膠腫などの脳腫瘍（膠腫）で確認されている。IDH1 変異陽性膠腫において、グリオーシスとの鑑別に IDH1 免疫組織化学染色(以下 IHC) が有用であり、術中の切除範囲の決定にその応用が期待されている。従来の IHC は 2-3 時間を要するが、電界非接触攪拌技術を用いた迅速免疫組織化学染色法(以下 R-IHC)を用いることによって、20 分程度での染色が可能となった。今回我々は、この技術・染色法を用い、脳腫瘍のなかの膠腫の術中迅速診断時に IDH1 の R-IHC を行い、永久標本での通常の IHC および遺伝子解析の結果を比較し、術中迅速 IDH-IHC の妥当性・有用性を検討した。

### 研究方法

臨床的に膠腫と診断され、当院で術中迅速診断が行われ、R-IHC を併用した 16 症例を対象とした。術中に提出された腫瘍組織から凍結切片を作製、アセトン固定後に、内因性ペルオキシダーゼを除去し、一次抗体を加え、電界非接触攪拌装置を使用して高電圧 (4.0kV, offset 2.4kV), 低周波 (5Hz) の電界を 5 分間にわたって負荷した。二次抗体反応も同様の電界を負荷して行い、DAB にて発色、ヘマトキシリンにて核染色を行って標本を作製した。IDH-1 染色の他に、GFAP、Olig2、Ki-67 (MIB-1) 染色を同時に施行した。術中迅速診断に使用した組織検体のパラフィン包埋永久標本(以下 FFPE 標本)を作製し、通常の IHC を施行した。染色の評価は、病理医 2 名にて行い、判定は、5%をカットオフ値とし、MIB-1 に関しては labeling index を算定した。FFPE 標本から腫瘍範囲を選択し削り取り、キットを用いて各サンプルから DNA を抽出、PCR を行い、電気泳動にてバンドを確認した後、増幅遺伝子産物をシークエンスに提出し、その結果と R-IHC、通常の IHC との結果を比較・検討した。

### 研究成績

IDH-1 の R-IHC 染色の感度は 83%、特異度は 70%、陽性的中率は 63%、陰性的中率は 88%、精度は 75%であった。IDH-1 遺伝子変異 (IDH1-R132H) は Grade I-III の膠腫 9 例のうち 6 例で確認された。R-IHC, 通常の IHC とともに IDH-1 染色陽性を示した 5 例はいずれも遺伝子変異を認めた。遺伝子変異を伴わない 3 例で、非特異的 R-IHC 陽性像が見られた。この偽陽性の原因として、腫瘍壊死の影響が考えられた。また、偽陰性症例も存在したが、抗原の賦活化

不足の可能性が考えられた。

### 結論

今回我々は、現時点における術中迅速診断における IDH-1 の R-IHC の有用性および限界を示した。IDH1 遺伝子変異陽性膠芽腫は、それを伴わない退形成性の星細胞腫よりも予後が良いとする報告や、IDH1 遺伝子変異を伴わない低異型度膠腫で、変異を有する低異型度膠腫や膠芽腫よりも予後不良であるといった報告がなされている。術中に IDH1 の変異の有無が予測できれば、手術法の選択に有用と考えられる。現在、R-IHC に使用可能な抗体は限定されているが、今後は、IDH-1 とともに、他の変異特異的抗体の開発により、術中における遺伝子学的診断がより進歩する可能性が考えられる。

## 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：石川 和夫

申請者：廣島 優子

論文題名：Rapid immunohistochemistry of IDH-1 for the intraoperative diagnosis of gliomas

(膠腫手術における術中迅速 IDH-1 免疫組織化学染色)

### 要旨

免疫組織化学は、各種腫瘍の病態を把握し治療に反映させるものとして、臨床  
上、極めて重要な役割を果たしている。本論文では、脳神経領域の膠腫を対象  
として、より迅速且つ正確な術中迅速診断の可能性について詳細な検討を行い、  
将来的展開が期待される結果を提示している。即ち、最近当大学で開発され  
た新しい電界非接触攪拌技術を用いた迅速免疫組織化学染色法 (R-IHC) を導  
入して、検鏡までの時間を従来法 (IHC) の 1/6～1/9 の 20 分に短縮し  
て、従来法と比較するとともに、遺伝子解析も施行して、その有用性を確認し  
ている。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りで  
ある。

### 1) 斬新さ

従来の免疫組織化学法 (IHC) では、検鏡までに 2～3 時間を要したが、新  
しく電界非接触攪拌技術を用いた迅速免疫組織化学染色法 (R-IHC) を開発  
して、これを 20 分程度と大幅に短縮し、術中に、より正確な腫瘍性病変の  
病態に関わる診断が可能である事を示した。

### 2) 重要性

免疫組織化学的検討を加えた、より正確かつ信頼性のある腫瘍性病変の質的

診断を、術中に短時間に行うことができるようになる。このことの臨床的  
意義は非常に高く、腫瘍性病変の適正な切除範囲の確認や、治療成績、ひい  
ては各種腫瘍疾患の生存率の向上等を導くことが期待される。

### 3) 研究方法の正確性

迅速免疫組織化学染色法の正当性を評価するために、1) この新しい迅速染  
色法による結果を、従来法と比較するだけでなく、2) GFAP、Olig2、Ki-67  
(MIB-1) と言った各種マーカーの染色も同一標本で行って比較検討し、更に、  
3) FFPE 標本から腫瘍部分を削り取って詳細な遺伝子変異の確認も行うと  
ともに、4) 検鏡の判断も複数の病理医によって施行するなど、慎重にデザ  
インされて進められた研究とすることができる。

### 4) 表現の明瞭さ

临床上極めて重要な術中迅速診断に関して、膠腫例を対象に今回新しい検査  
器機を導入して R-IHC を可能とし、より短時間に、より正確に行う事がで  
きることを具体的に示した。

本検査法 (R-IHC) の導入は、膠腫の難しい術中の外科処置の適否の判断に  
際して一光を投ずるもので、臨床的意義は高い。かつ、将来色々な腫瘍性疾患  
の取り扱いにも影響を与えるものとなり得るものである。

上述の如く、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定される。