

## 胃癌凍結切片を用いた17番及び18番染色体の数的異常の解析

著者	大井 章史
雑誌名	平成8(1996)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	1995-1996
ページ	15p.
発行年	1997-12-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/47779">http://hdl.handle.net/2297/47779</a>

胃癌凍結切片を用いた17番及び18番染色体の  
数的異常の解析

07670196

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告

平成9年12月

研究代表者

大井 章史  
金沢大学医学部助教授

KAKHI  
1996  
76

## 研究組織

研究代表者：大井 章史（金沢大学医学部病理学第一講座）

## 研究経費

平成7年度	1,400千円
平成8年度	900千円
計	2,300千円

## 研究発表

(1) 口頭発表 (Ishikawa T, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T, Nakanishi I, Ooi A. Amplification of the *c-erb* B-2 (HER-2/*neu*) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence *in situ* hybridization. 2nd International Gastric Cancer Congress, Munich, April 27-30, 1997.

## はしがき

癌は1個の細胞の癌化に始まり、いくつかの癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常を持った細胞のclonal expansionを繰り返し、完成された癌腫瘍になると考えられる。本研究では癌抑制遺伝子p53と、大腸癌でその欠失が頻発に認められている遺伝子DCCがそれぞれ存在する染色体17, 18の数的異常を胃癌組織切片上で検索し、それぞれの染色体のdisomyからpolysomyあるいはmonosomyへの変化をfollowする。また同時にPCR-LOHを行い、微小な癌細胞巢におけるchromosome17の長腕 (p 53の遺伝子座がある) 及びchromosome18の長腕 (DCCの遺伝子座がある) の相同性の欠失を検索し、chromosome number との比較をみる。

### 1. Chromosome-specific a satellite probeを用いた *in situ hybridization*法の検討

#### (1) 凍結切片とホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いたFISH法の比較

手術切除された胃癌より皮膚移植用トレパン (径1.0cm) を用いて直ちに切り出した組織を凍結切片用包埋材 (O.C.T. COMPOUND, Miles) に包埋、クリオスタッドにて4μmに薄切し、冷アセトンにて30分固定後、乾燥した。残りの胃癌組織は型の如く、20%緩衝ホルマリン固定後、切り出しを行い、アルコール系列により脱水、キシレン系列により透徹を行いパラフィン包埋し、ミクロトームにて4μm切片を作製した。

同一の胃癌組織より作製した2種類の切片を用いて、17番染色体に特異的プローブ (Oncor社) を使ったFISH法を行った。(プロトコール1、2、表1参照)

5例について比較検討を行った結果、3例では両者には大差は認められず、2例では凍結切片でシグナルの輝度が高かったにもかかわらず、組織形態の保存が不良で染色体数の計測はパラフィン包埋切片の方が容易であった。

凍結切片の使用にあたっては、手術後直ちに標本採取を行わなければならないこと、作製標本が小さく広範囲にわたる観察が不可能であること、切片は-20°C以下で保存しなければならないこと、OCT包埋材料は変性する為、保存期間に限界があること等が知られている。一方、ホルマリン固定パラフィン包埋切片ではこれらの短所が克服できるのみならず、連続切片をHE染色することによって組織像との対比が可能で、また標本庫に保存された材料を活用することもできる。通常ホルマリン固定や脱水等の標本作製操作がDNAの変性をきたさない限り凍結切片を用いる利点はない。今回の我々の成績はホルマリン固定パラフィン包埋胃癌組織が染色体数の計測に適した材料であることを示しており、以下の研究は凍結切片のかわりにホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて行った。

#### (2) *In situ hybridization*法の確立 (fluorescein標識かperoxidase標識か)

現在、組織切片を用いたchromosome *in situ hybridization*にはhybridizeしたDNAプローブを蛍光色素で検出する方法 (Wolman, 1994) と、peroxidase反応で検出する方法 (Looijenga et al., 1993) が知られている。本研究では2種類のプロトコールを使って、*in situ hybridization*を行い両者の比較検討を行った。

Chromosome 17 specific probeを用いて10例のホルマリン固定パラフィン包埋胃癌組織を使って検討した。Peroxidase反応を用いる方法ではback stain が強く現れる場合が多く、signal 数の固定が困難であった。一方、蛍光色素による検出では、蛍光の退色があるため、標本の長期保存が不可能であるという制約があった。しかしながら、最近の蛍光顕微鏡の発達と、退色防止剤の併用によって実際の観察に大きな支障は認めなかった。以上の結果より、以下の検討はビオチン標識DNAプローブを用いてFITC蛍光を検出した。尚、1995年以後、ONCOR社のビオチン標識DNAプローブの産生が中止されジゴキシゲニン標識DNAプローブに変わった為、プロトコール3を用いてfluorescence *in situ hybridization*を行った。

## II. Fluorescent polymerase chain reactionを用いたDCC及びp53遺伝子のallelic lossの解析

癌抑制遺伝子DCC及びp53の遺伝子内もしくは、その近傍にあるmicrosatellite polymorphismを利用して、そのallelic lossを検索した。使用したプライマーセットは以下の如くである。

### 1. セットA

p53 MS-1: 5'-AGGGATACTATTCAGCCCCGAGGTG-3'

p53 MS-2: 5'-ACTGCCACTCCTTGCCCCATTC-3'

p53 locus内にあるCA繰り返し配列を増幅 (Jones & Nakamura, 1992)。増幅産物は103-135bp。p53 MS-1の5'末端をFAMで標識。

### 2. セットB

p53 MS-3: 5'-GAATCCGGGAGGAGGTTG-3'

p53 MS-4: 5'-AACAGATCCTTTAATGGCAG-3'

p53遺伝子のイントロン1内にあるAAAATの繰り返し配列を増幅。(Futrealら、1991) 増幅産物は140-175bp。p53MS-4の5'末端をHEXで標識。

### 3. セットC

DCC MS-1: 5'-TCCCTCTAGAAATTGTGTG-3'

DCC MS-2: 5'-TGACTTTATCTCATTGGAG-3'

DCC遺伝子のイントロン内にあるTA繰り返し配列を増幅 (Fearonら、1990; Risinger & Boyd、1992) DCCMS-2の5'末端をHEXで標識して使用。

### 4. セットD

AO DCC-1: 5'-GATGACATTTTCCCTCTAG-3'

AO DCC-2: 5'-GTGGTTATTGCCTTGAAAAG-3'

セットBと同様のTA繰り返し配列を増幅 (Huangら、1992)。増幅産物は150-210bp。AO DCC-2の5'末端をHexで標識して使用。

癌組織及び正常粘膜組織より抽出したDNAをHot Start PCR法で増幅 (78度-10分、1サイクル: 95度-5秒、50度-1分、72度-1分、21サイクル: 95度-30秒、50度-1分、72度-5分、1サイクル) した。PCR産物はDNAシーケンサー (Applied Biosystem 373A) を、用いて電気泳動を行い、Genescan software 672を用いて解析した。

正常DNAに予想されるサイズのピークが2つ認められる場合をheterozygousとし、癌DNAで、この2つのピークのうち一方が著しく減少している場合をallele imbalance陽性とした。(図1) また、正常DNAにピークが1ヶしか認められない場合、homozygousと判定した。(図1) また、癌DNAで正常DNAにみられなかったpeakが出現した場合をmicrosatellite instability陽性とした。この症例はallelic lossに関してはnon-informativeと判断した。正常DNAあるいは癌DNAでピークが現れない場合は、PCR反応の不良と判断した。

p53のallele imbalanceはinformativeであった97症例中33例 (34.0%)、DCCのallelic imbalanceは93症例中20例 (21.5%) に認められた。(表2)

### III. 17番及び18番染色体数と allelic imbalanceの比較

#### (1) Fluorescence *in situ* hybridization 法を用いた17番及び18番染色体数の解析

4 $\mu$ mに薄切したホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いてfluorescence *in situ* hybridizationを行った。プローブはOncor社より購入した17, 18染色体特異的 $\alpha$  repetitiveDNAプローブを用いて表1のプロトコールに従って行なった。

FISH法による解析は 17番及び18番染色体に allelic imbalanceの見られたそれぞれ 33例、20例について施行し、33例中 28例、20例中 18例で成功した。不成功の原因は細胞質の残存によると思われるシグナルの不検出によるものであった。30%以上を占めるパターンをクローナルとした。正常胃粘膜上皮では大部分の細胞に2個ないしは1個のシグナルが認められ(図2) 粘膜リンパ球法のリンパ球でも同様出会った(図3)。胃癌組織の代表的結果を図4にしめす。14例(64%)で17番染色体の polysomyが見られ、そのうち61%が polyclonalであった。また 18番染色体は2例で monosomyのクローンが見つかり、他に polysomyが7例、また 6例が polyclonalであった(表2、3)。

#### (2) 17番及び18番染色体数と allelic imbalanceの比較

17番染色体の monosomyは認められなかったが、18番染色体の monosomyは2例(K63 & G59)で認められた。これらの症例では、同染色体上の遺伝子は必然的に allelic lossを伴っていると考えられる。(Ooi et al., 1996; Kobayashi et al., 1996) また、polysomyの症例のうち trisomyでは必然的に 50%の allelic imbalanceを示すと考えられ(Ooi et al., 1996; Kobayashi et al., 1996)、allelic imbalanceが必ずしも遺伝子の選択的欠失を意味しない。遺伝子のコピー数と allelic imbalanceを解析するためには、遺伝子座に特異的なコスミッドプローブを用いた検索が必要と考えられる。

## 参考文献

Wolman SR. Fluorescence *in situ* hybridization: a new tool for the pathologist. *Hum Pathol* 25:586-590, 1994

Looijenga LH, Gillis AJM, Van Putten WLJ, Oosterhuis JW. *In situ* numerical analysis of centromeric regions of chromosomes 1, 12, and 15 of seminomas, nonseminomatous germ cell tumors, and carcinoma *in situ* of human testis. *Lab Invest* 68: 211-219, 1993

Jones MH, Nakamura Y. Detection of loss of heterogeneity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. *Genes Chromosome Cancer* 5: 89-90

Futreal PA, Soderkvist P, Marks JR, Iglehart JD, Cochran C, Barrett JC, Wiseman RW. Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms. *Cancer Res* 52: 2624-2627, 1992

Fearon ER, Jones PA. Progressing towards a molecular description of colorectal cancer development. *FESEB J* 6: 2783-2790, 1992

Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, McDaniel TK, Newkirk C, Resau JH, Srinidhara R, Reid BJ, Meltzer SJ. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 52:6525-6530, 1992

Ooi A, Huang C-D, Mai M, Nakanishi I. Numerical chromosome alterations in colorectal carcinomas detected by fluorescence *in situ* hybridization. Relationship to 17p and 18q allelic losses. *Virchows Arch* 428:243-251, 1996

Kobayashi M, Kawashima A, Mai M, Ooi A. Analysis of chromosome 17p13 (p53 locus) alteration in gastric carcinoma cells by dual-color fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Pathol* 149:1575-1584, 1996

Ishikawa T, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T, Ooi A. Amplification of the c-erbB-2 (Her-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Pathol* 151:761-768, 1997

Table 1

**Protocol 1**

**FISH on Frozen Sections**

1. Fix in metacarn solution for 10 min.
2. Wash in 2x SSC, 3 times.
3. Digest with pepsin (50 $\mu$ g/ml in 0.01 M HCl).
4. Wash in 2x SSC, 3 times.
5. Dehydrate in 70%, 80%, 90% and 100% EtOH and acetone.
6. Check propidium iodide-stained section.
7. Hybridization: 3  $\mu$ l of biotinylated probe to 10 $\mu$ l of Hybrisol VI.
8. Denature: heat the slides on a hot plate at 69°C for 5 min.
9. Incubate at 37°C, overnight.
10. Post-hybridization washing (4ml of 20xSSC + 16ml of disH<sub>2</sub>O + 20ml of formamide)
11. Wash in 2xSSC at room temperature, for 5min.
12. Immerse in 1% BSA / 4 x SSC for 5min.
13. Add FITC-Str Avidin (x50) at room temperature, for 60min.
14. Wash in PN buffer for 10 min, 3 times
15. Stain the section with propidium iodide.

**Protocol 2**

**FISH on paraffin-embedded section**

1. Deparaffinize in xylene.
2. Wash with 100% EtOH.
3. Treat with sodium bisulfate solution ( 8g of sodium bisulfate + 40ml of 2x SSC) at 43°C for 20min.
4. Wash in 2xSSC, at pH 7.0.
5. Dehydrate in 70%, 80%, 90% and 100% EtOH.
6. Treat with proteinase K (25mg/ml) at 37°C for 30min.
7. Wash in 2xSSC, 3 times.
8. Check the slides with propidium iodine-staining.
9. Dehydrate in 70%, 80%, 90% and 100% EtOH, and acetone.
10. Prepare hybridization: solution: 3 $\mu$ l of biotinylated probe to 10 $\mu$ l of Hybrisol VI.
11. Denature: heat the slides on a hot plate at 69°C for 5min.
12. Incubate at 37°C, overnight.
13. Wash in post-hybridization solution (4ml of 20xSSC + 16ml of disH<sub>2</sub>O+ 20ml of formamide) at 37°C for 15min.
14. Wash in 2xSSC at room temperature.
15. Immerse in 1% BSA /4xSSC for 5min.
16. React with FITC-Str Avidin (x50) at room temperature for 60 min.
17. Wash in 4xSSC at room temperature for 10 minutes.
18. Immerse in 4xSSC/0.1% Triton X-100 at room temperature for 10 minutes.
19. Wash in 4xSSC at room temperature for 10 minutes.



20. Wash in PN buffer at room temperature for 10 minutes.
21. Block with PNM at room temperature for 10 minutes.
22. React with Anti-Str Avidin (x100) at room temperature for 10 minutes.
23. Wash in PN buffer for 10 minutes, 3 times.
24. Block with PNM at room temperature for 10 minutes.
25. React with FITC-Str Avidin (x50) at room temperature for 60 min.
26. Wash in PN buffer for 10 minutes, 3 times.
18. Stain with propidium iodide.

### Protocol 3

#### FISH on paraffin-embedded section

1. Deparaffinize in xylene.
2. Wash with 100% EtOH.
3. Treat with sodium bisulfate solution ( 8g of sodium bisulfate + 40ml of 2x SSC) at 43°C for 20min.
4. Wash in 2xSSC, at pH 7.0.
5. Dehydrate in 70%, 80%, 90% and 100% EtOH.
6. Treat with proteinase K (25mg/ml) at 37°C for 30min.
7. Wash in 2xSSC, 3 times.
8. Check the slides with propidium iodide-staining.
9. Dehydrate in 70%, 80%, 90% and 100% EtOH, and acetone.
10. Prepare hybridization: solution: 3µl of biotinylated probe to 10µl of Hybrisol VI.
11. Denature: heat the slides on a hot plate at 69°C for 5min.
12. Incubate at 37°C, overnight.
13. Wash in post-hybridization solution (4ml of 20xSSC + 16ml of disH<sub>2</sub>O+ 20ml of formamide) at 37°C for 15min.
14. Wash in 2xSSC at room temperature.
15. Immerse in 1% BSA /4xSSC for 5min.
16. React with rhodamin-conjugated anti-digoxigenin (x5) at room temperature for 60 min.
17. Wash in 4xSSC at room temperature for 10 minutes.
18. Immerse in 4xSSC/0.1% Triton X-100 at room temperature for 10 minutes.
19. Wash in 4xSSC at room temperature for 10 minutes.
20. Wash in PN buffer at room temperature for 10 minutes.
21. Block with PNM at room temperature for 10 minutes.
22. React with Anti-sheep IgG (x100) at room temperature for 10 minutes.
23. Wash in PN buffer for 10 minutes, 3 times.
24. Block with PNM at room temperature for 10 minutes.
25. React with rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG (x100) for 10 minutes.
26. Wash in PN buffer for 10 minutes, 3 times.
27. Stain with DAPI.

Table 2. Results for allelic imbalance in gastric adenocarcinomas

Case No	A(p53)	B(p53)	C(DCC)	D(DCC)	Case No	A(p53)	B(p53)	C(DCC)	D(DCC)
K4	AI	AI	N	H	G11	N	N	H	H
K5	AI	NA	H	N	G13	H	NA	NA	NA
K8	N	H	N	AI	G15	AI	NA	AI	AI
K12	U	U	N	AI	G18	N	N	H	N
K13	H	H	H	U	G21	N	NA	NA	AI
K15	N	NA	AI	NA	G22	N	NA	N	N
K16	N	N	N	NA	G23	AI	H	N	AI
K19	N	N	H	AI	G24	N	N	N	H
K21	MI	NA	NA	H	G25	NA	N	N	N
K23	H	N	N	NA	G26	AI	AI	N	N
K24	N	H	N	NA	G27	N	N	N	AI
K25	N	H	N	NA	G29	AI	AI	N	AI
K26	U	H	N	AI	G30	H	NA	NA	N
K27	H	H	N	N	G32	N	NA	N	N
K28	H	AI	N	NA	G33	H	N	N	N
K30	N	AI	N	N	G34	N	N	N	N
K31	AI	AI	N	NA	G35	N	AI	NA	N
K32	N	N	N	NA	G1035	N	H	N	N
K33	N	N	H	N	G36	N	N	N	H
K35	N	H	H	H	G37	N	N	N	N
K37	AI	NA	H	N	G38	N	N	H	N
K38	N	N	H	N	G39	AI	H	N	N
K39	N	N	N	N	G40	AI	H	NA	N
K40	N	N	N	N	G40'	N	NA	N	N
K42	N	N	N	H	G41	N	N	N	N
K44	AI	AI	H	H	G42	N	N	N	N
K45	AI	AI	H	N	G43	N	NA	N	N
K47	H	H	NA	H	G44	N	N	N	N
K48	N	N	H	N	G45	N	N	N	N
K49	AI	H	N	N	G46	H	H	N	N
K50	H	N	H	N	G47	N	N	N	NA
K51	AI	H	H	N	G48	AI	H	N	N
K53	H	H	H	N	G4x	H	AI	AI	AI
K54	N	NA	NA	H	G50	H	H	N	H
K55	N	H	N	N	G51	NA	N	N	N
K56	NA	NA	NA	NA	G55	H	N	N	NA
K57	H	H	H	N	G56	N	N	N	H
K58	H	AI	NA	N	G57	N	NA	A	H
K60	N	N	NA	N	G59	N	N	AI	NA
K61	AI	NA	N	N	G64	NA	AI	N	N
K62	H	NA	AI	AI	G65	H	AI	H	H
K63	N	AI	AI	N	G68	N	NA	N	N
K65	H	N	NA	N	G70	AI	AI	H	NA
K68	N	NA	NA	NA	G71	N	N	H	H
K69	H	N	NA	N	G72	N	N	AI	AI
K71	H	NA	NA	H	G74	H	NA	N	AI
K72	N	H	NA	H	G76	NA	AI	N	N
K73	N	AI	NA	H	G77	AI	N	AI	ND
K74	N	N	NA	N	G77'	N	N	N	ND
K75	H	N	N	N	G78	N	N	N	ND
K76	N	NA	NA	NA					
K77	AI	AI	N	N					
K78	H	AI	N	N					
K79	N	H	H	N					
K80	H	NA	N	H					
K81	H	H	H	H					
K82	AI	NA	N	AI					
K83	N	N	NA	NA					
K84	AI	H	NA	AI					
K85	H	N	N	N					
K87	H	AI	N	H					
K89	N	H	N	NA					
K90	N	H	AI	AI					
K91	N	N	NA	H					

AI, allelic imbalance; N, no allele imbalance; H, homozygous  
 NA, no amplification; MI, microsatellite instability;  
 U, uninterpretable; ND, not done.

Table 3. Chromosome 17 copy number determined by FISH analysis

Case No	Copy No	Case No	Copy No
K4	3/4	G15	3/4
K5	2	G23	2
K28	4/3	G26	2
K30	2	G29	3/2
K31	3/2	G35	3/2
K37	4/3	G39	3/2
K44	4/5/6	G40	3
K45	3/4	G48	2
K49	2	G4X	US
K51	3/4	G64	3
K58	2	G65	US
K61	4/3	G70	2
K63	2	G76	4
K73	US	G77	3
K77	US		
K78	US		
K82	3/2		
K84	4/3		
K87	2		

US, unsuccessful

Table 4. Chromosome 18 copy number determined by FISH analysis

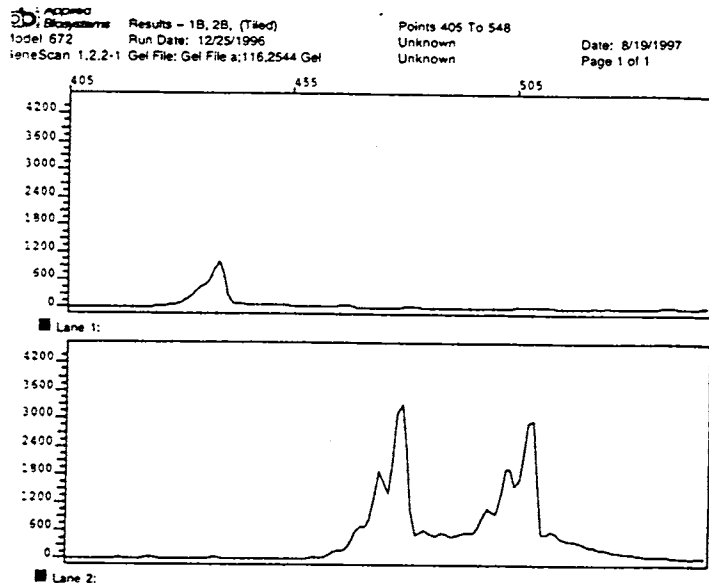
Case No	Copy No	Case No	Copy No
K8	US	G15	3/2
K12	2	G21	2
K15	2	G23	2
K19	3/4	G27	3/2
K26	2	G29	2
K62	3	G4X	3/2
K63	1/2	G59	2/1
K82	3	G72	4/3/2
K84	2	G74	2
K90	US	G77	2
K26			

US, unsuccessful

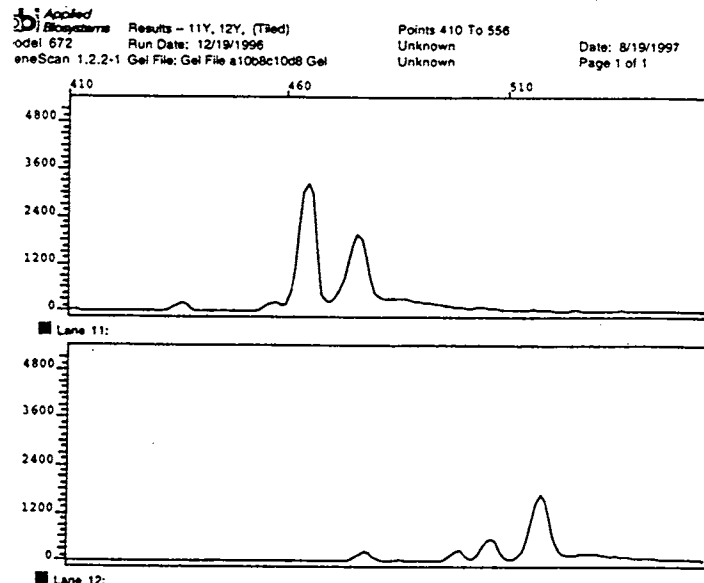
図1 Fluorescent polymerase chain reaction を用いたp53遺伝子のallelic lossの解析

症例 K4

(A)

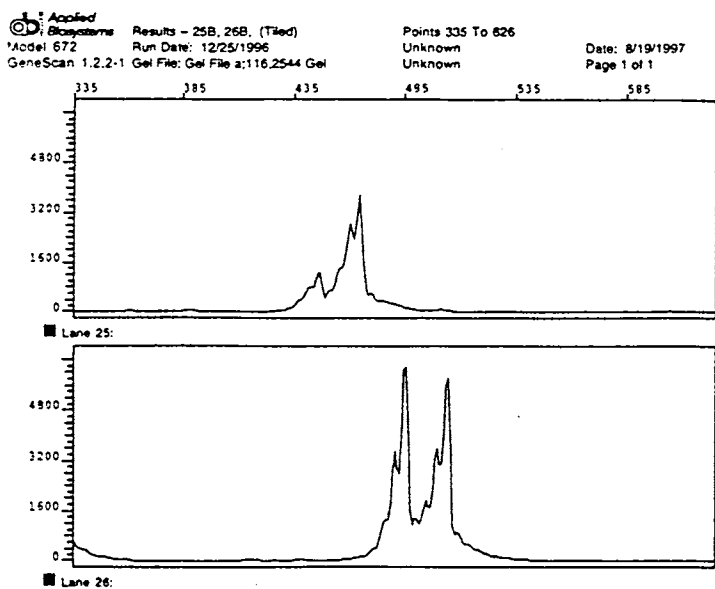


(B)

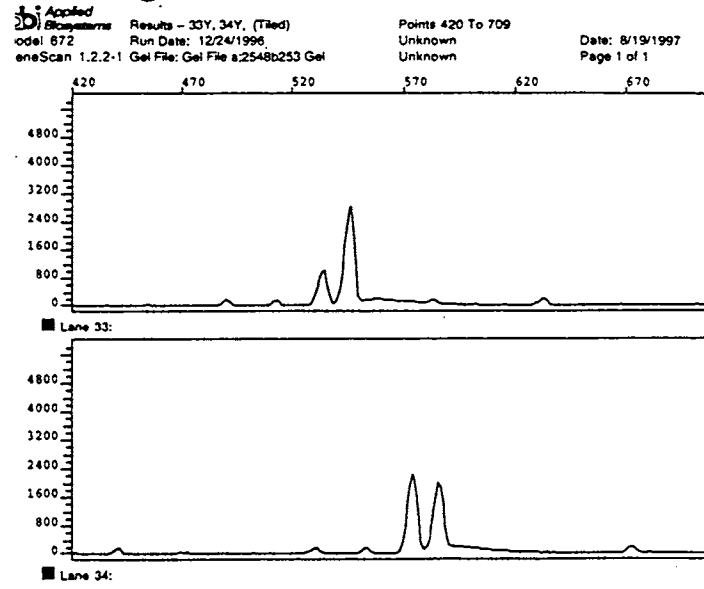


症例 K31

(A)

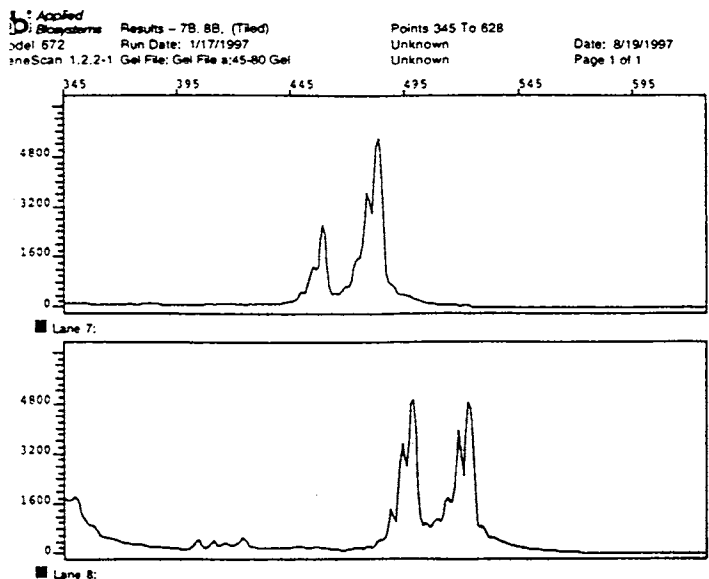


(B)

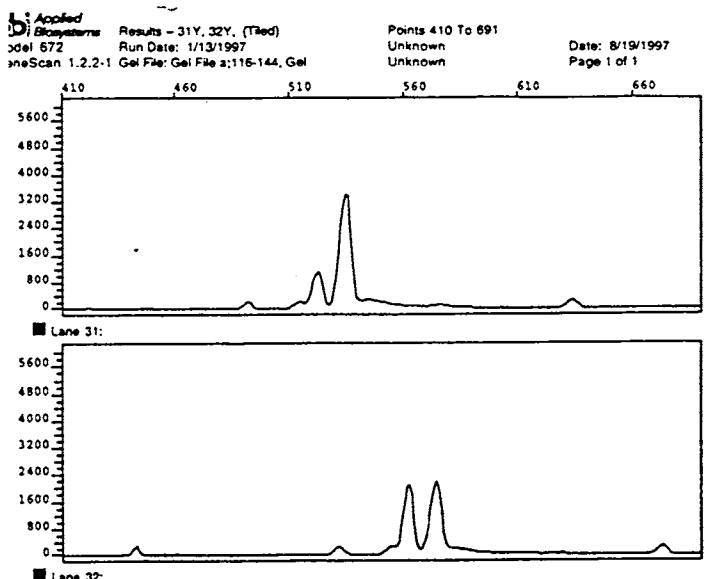


症例 K44

(A)



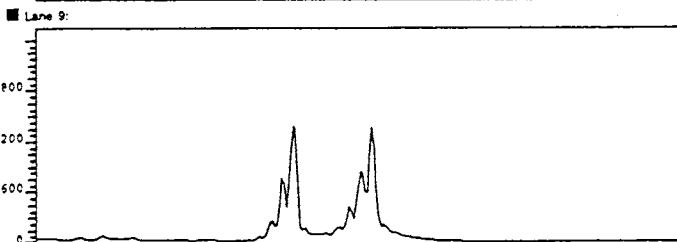
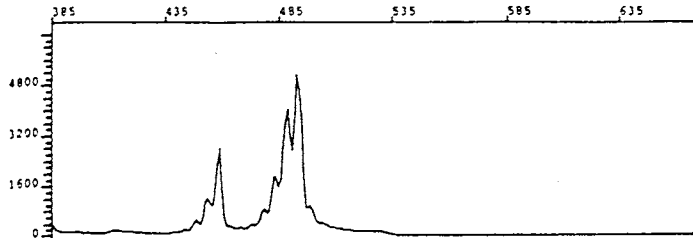
(B)



### 症例 K45

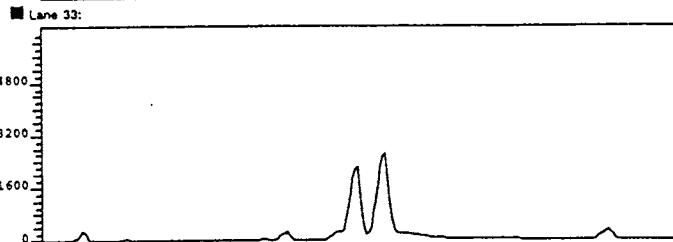
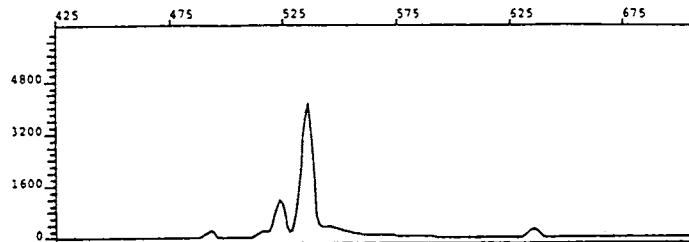
(A)

Applied Biosystems Results - 9B, 10B, (Tiled) Points 385 To 669  
Model 672 Run Date: 1/17/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File a:45-80 Gel Page 1 of 1



(B)

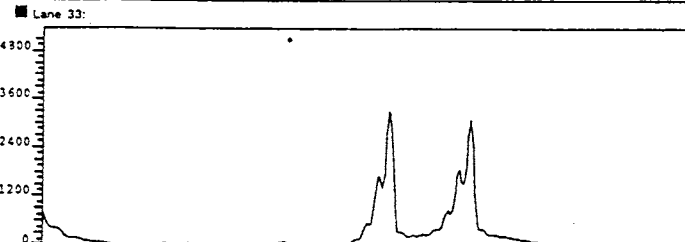
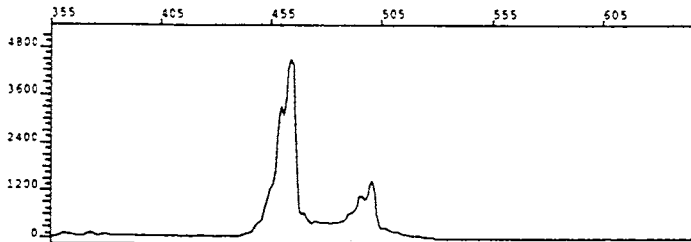
Applied Biosystems Results - 33Y, 34Y, (Tiled) Points 425 To 707  
Model 672 Run Date: 1/13/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File a:116-144, Gel Page 1 of 1



### 症例 K77

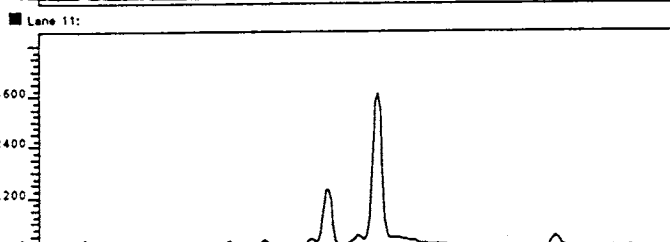
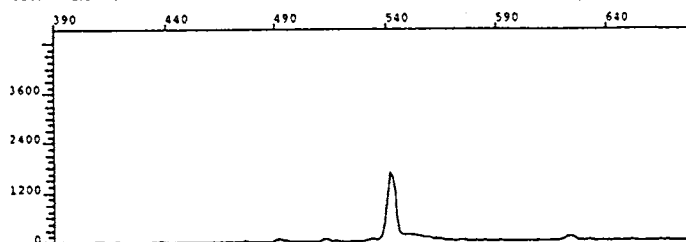
(A)

Applied Biosystems Results - 33B, 34B, (Tiled) Points 355 To 647  
Model 672 Run Date: 1/6/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File a:81-106 Gel Page 1 of 1



(B)

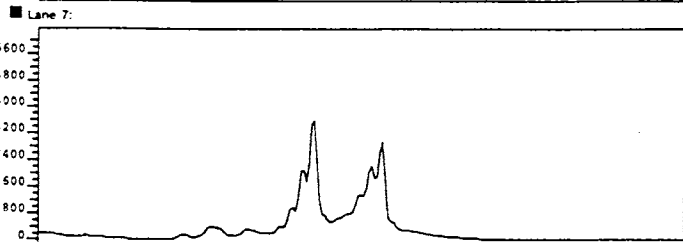
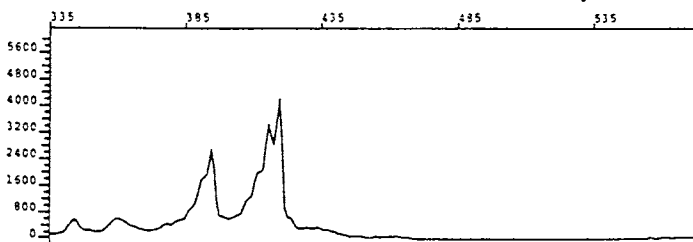
Applied Biosystems Results - 11Y, 12Y, (Tiled) Points 390 To 680  
Model 672 Run Date: 1/13/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File b4:93-128 Gel Page 1 of 1



### 症例 G29

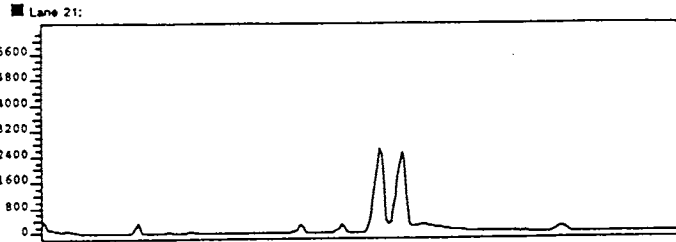
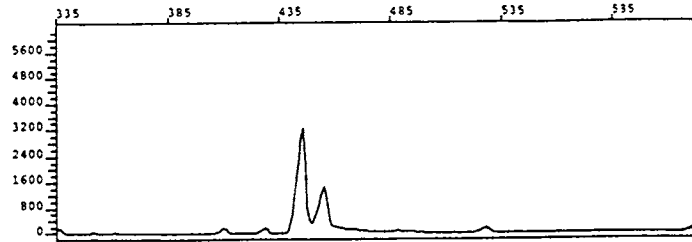
(A)

Applied Biosystems Results - 7B, 8B, (Tiled) Points 335 To 573  
Model 672 Run Date: 2/6/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File a:129-163 Gel Page 1 of 1



(B)

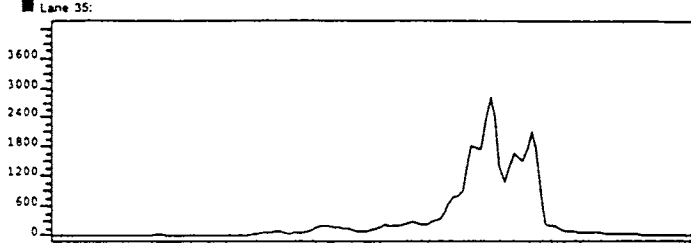
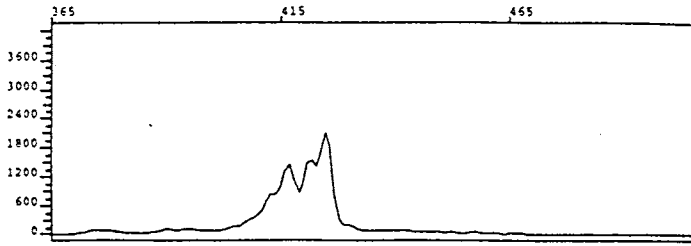
Applied Biosystems Results - 21Y, 22Y, (Tiled) Points 335 To 624  
Model 672 Run Date: 2/6/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File a:163-178, Gel Page 1 of 1



症例 G70

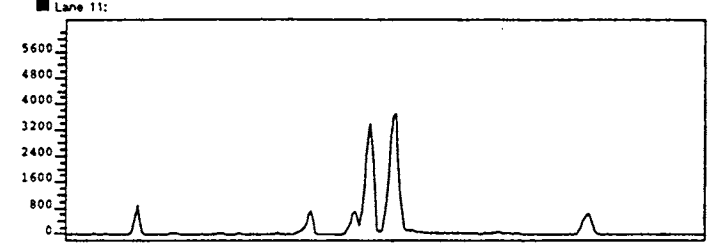
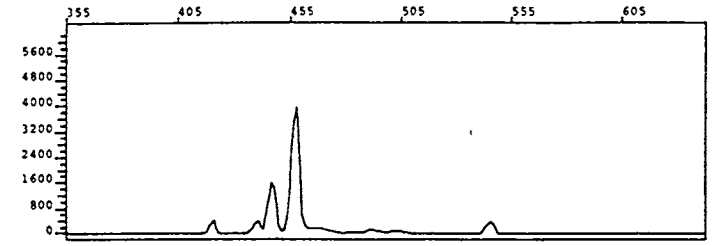
(A)

Applied Biosystems Results - 35B, 36B, (Tiled) Points 365 To 506  
 Model 672 Run Date: 2/6/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
 GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File a:129-163 Gel Unknown Page 1 of 1



(B)

Applied Biosystems Results - 11Y, 12Y, (Tiled) Points 355 To 643  
 Model 672 Run Date: 2/7/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
 GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File b:193-206 Gel Unknown Page 1 of 1

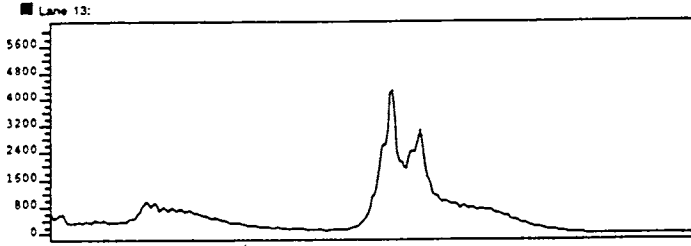
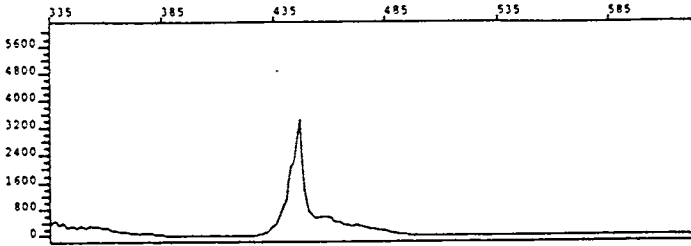


Fluorescent polymerase chain reactionを用いたDCC遺伝子のallelic lossの解析

症例 K62

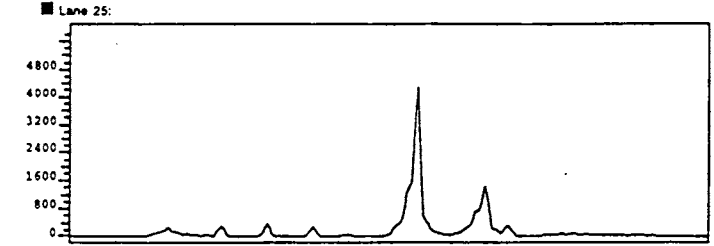
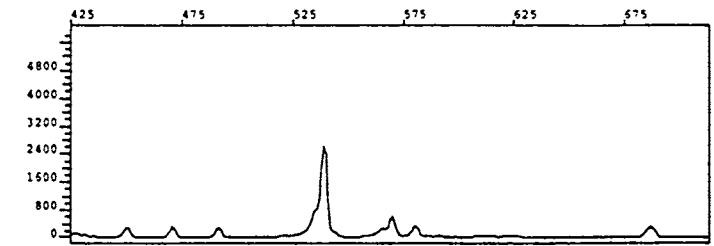
(C)

Applied Biosystems Results - 13B, 14B, (Tiled) Points 335 To 624  
 Model 672 Run Date: 1/13/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
 GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File c:57-92 Gel Unknown Page 1 of 1



(D)

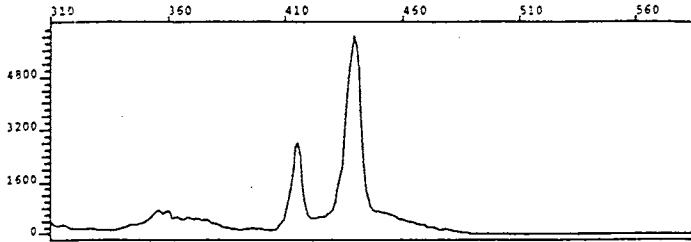
Applied Biosystems Results - 25Y, 26Y, (Tiled) Points 425 To 714  
 Model 672 Run Date: 2/7/1997 Unknown Date: 8/19/1997  
 GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File d:61-94 Gel Unknown Page 1 of 1



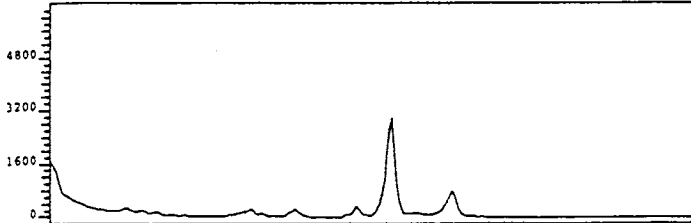
### 症例 K90

(C)

Applied Biosystems Results - 21B, 22B, (Tiled) Points 310 To 586  
Model 672 Run Date: 1/14/1997 Unknown  
Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File c:93-128 Gel Page 1 of 1



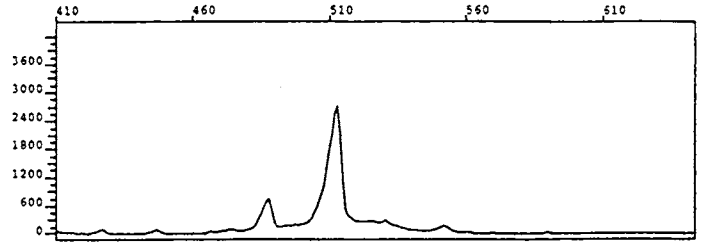
■ Lane 21:



■ Lane 22:

(D)

Applied Biosystems Results - 33Y, 34Y, (Tiled) Points 410 To 644  
Model 672 Run Date: 2/7/1997 Unknown  
Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File d:95-130 Gel Page 1 of 1



■ Lane 33:

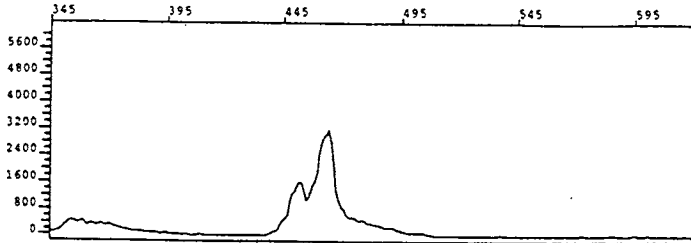


■ Lane 34:

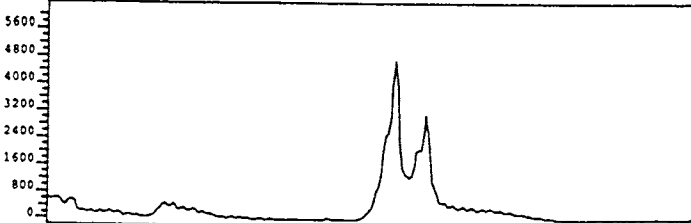
### 症例 G15

(C)

Applied Biosystems Results - 29B, 30B, (Tiled) Points 345 To 622  
Model 672 Run Date: 1/14/1997 Unknown  
Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File c:93-128 Gel Page 1 of 1



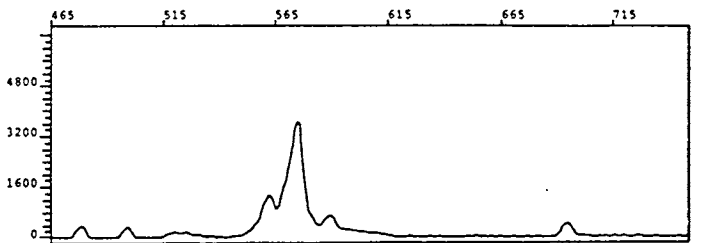
■ Lane 29:



■ Lane 30:

(D)

Applied Biosystems Results - 21Y, 22Y, (Tiled) Points 465 To 750  
Model 672 Run Date: 2/21/1997 Unknown  
Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File c:213-228, Gel Page 1 of 1



■ Lane 21:

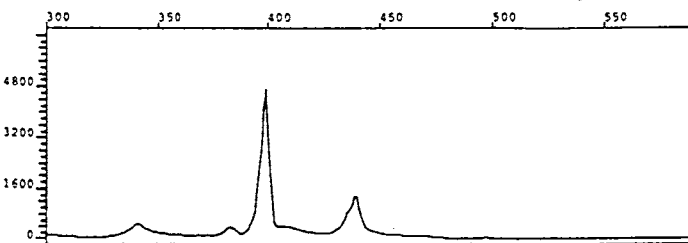


■ Lane 22:

### 症例 G4X

(C)

Applied Biosystems Results - 17B, 18B, (Tiled) Points 300 To 590  
Model 672 Run Date: 2/20/1997 Unknown  
Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File c:177-212 Gel Page 1 of 1



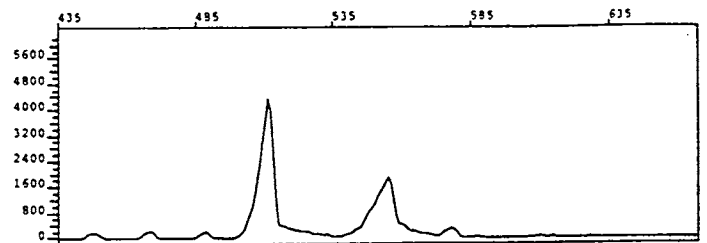
■ Lane 17:



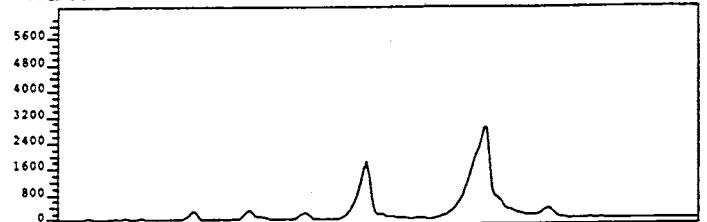
■ Lane 18:

(D)

Applied Biosystems Results - 9Y, 10Y, (Tiled) Points 435 To 668  
Model 672 Run Date: 2/21/1997 Unknown  
Date: 8/19/1997  
GeneScan 1.2.2-1 Gel File: Gel File d:185-220 Gel Page 1 of 1



■ Lane 9:



■ Lane 10:

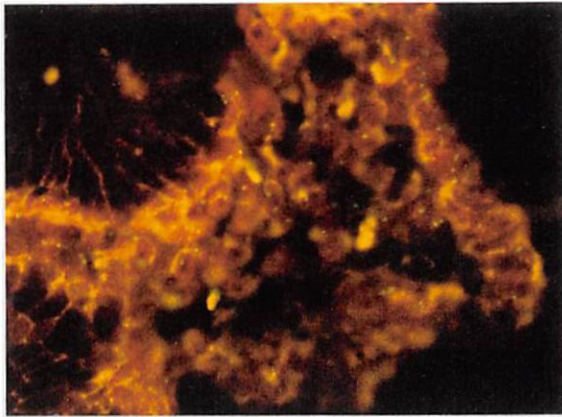


図2 正常胃粘膜上皮のFISH。  
染色体17を示す2個のシグナルが  
みられる。

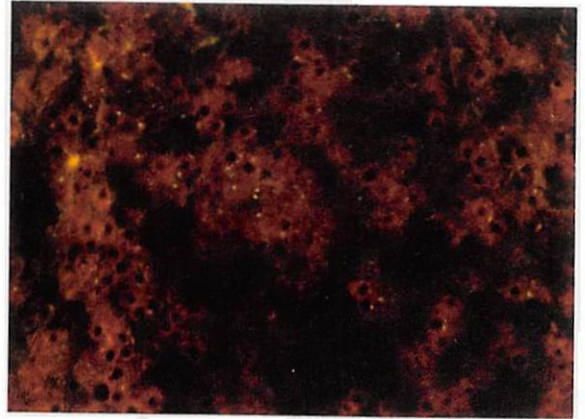


図3 粘膜リンパ濾胞のFISH。リンパ球に染色  
体18を示す2個のシグナルがみられる。

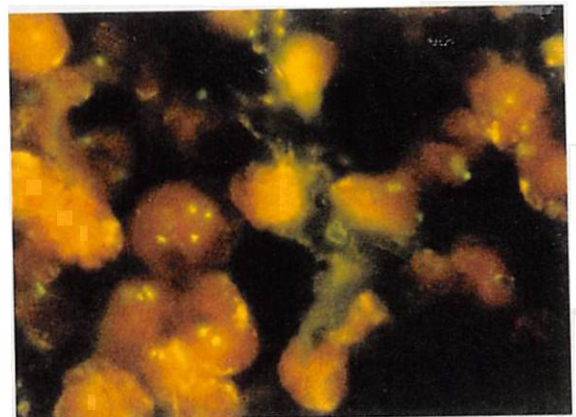
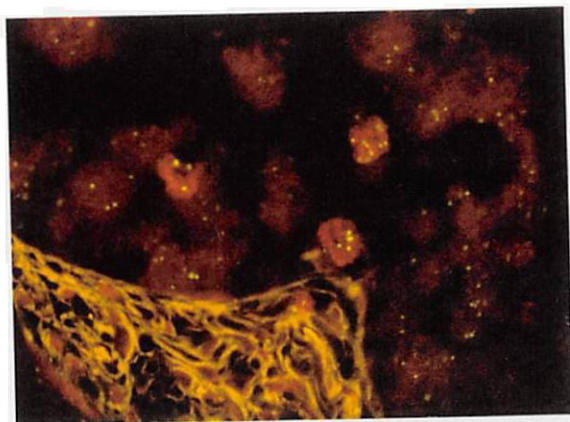
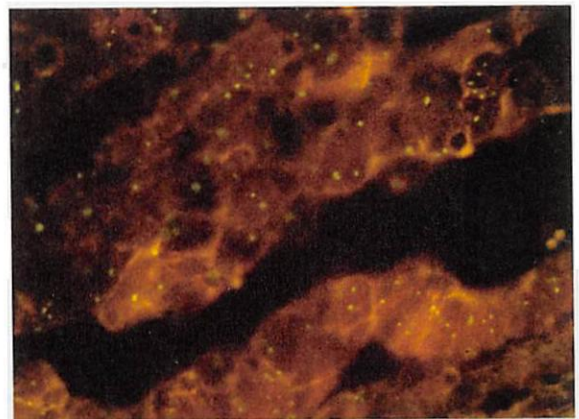
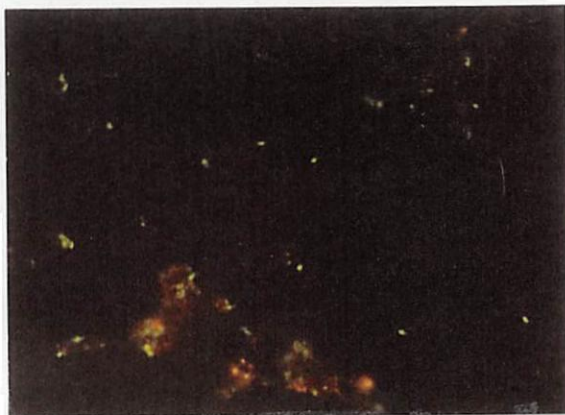


図4 胃癌のFISH。A：数個の癌細胞に染色体18を示す2個のシグナルがみられる（症例 K63）。  
B：大部分の癌細胞に染色体17を示す2個のシグナルがみられる（症例 G70）。C：染色体17  
を示すシグナルを2個から6個有する癌細胞を認める。（症例 K44）。D：染色体17を示す  
シグナルを2個から4個有する癌細胞をみとめる（症例 K84）。