

原著

## ホルマリン固定組織からの DNA 抽出法と PCR 法による遺伝子解析

菊池 真<sup>1)</sup>, 舘 延忠<sup>2)</sup>, 小塚直樹<sup>3)</sup>, 二宮孝文<sup>4)</sup>, 小林正裕<sup>5)</sup>,  
堀本佳誉<sup>1)</sup>, 内田英二<sup>6)</sup>, 佐々木公男<sup>7)</sup>, 辰巳治之<sup>4)</sup>, 武田秀勝<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 札幌医科大学大学院保健医療学研究科 (主任 武田秀勝 教授)

<sup>2)</sup> 札幌医科大学保健医療学部作業療法学科

<sup>3)</sup> 札幌医科大学保健医療学部理学療法学科

<sup>4)</sup> 札幌医科大学医学部解剖学第一講座 (主任 辰巳治之 教授)

<sup>5)</sup> 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所

<sup>6)</sup> 大正大学人間学部人間科学科

<sup>7)</sup> 札幌あゆみの園

DNA extraction and sequencing using PCR from formalin-fixed samples

Shin KIKUCHI<sup>1)</sup>, Nobutada TACHI<sup>2)</sup>, Naoki KOZUKA<sup>3)</sup>, Takafumi NINOMIYA<sup>4)</sup>,  
Masahiro KOBAYASHI<sup>5)</sup>, Yoshitaka HORIMOTO<sup>1)</sup>, Eiji UCHIDA<sup>6)</sup>,  
Kimio SASAKI<sup>7)</sup>, Haruyuki TATSUMI<sup>4)</sup>, Hidekatsu TAKEDA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Graduate School of Health Sciences, Sapporo Medical University (Chief: Prof. H. TAKEDA)

<sup>2)</sup> Department of Occupational Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University

<sup>3)</sup> Department of Physical Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University

<sup>4)</sup> First Department of Anatomy, School of Medicine, Sapporo Medical University (Chief: Prof. H. TATSUMI)

<sup>5)</sup> National Research Institute of Fisheries Science (NRIFS), Fisheries Research Agency

<sup>6)</sup> Department of Human Science, Faculty of Human Studies, Taisho University

<sup>7)</sup> Department of Pediatrics, Sapporo Ayumi-no-Sono

### ABSTRACT

Formalin is a main fixative in the field of pathology. Molecular biological analysis of formalin-fixed samples was difficult because formalin fixation decreased the quality of isolated DNA. Therefore, we compared the quality of DNA obtained by using DNA extraction kit (Sepa Gene®) to that using proteinase K. Using proteinase K, it was possible to extract high quality DNA, and obtain DNA from samples of 3 months fixative. Moreover, by proteinase K method, it was also possible to analyze aprataxin gene exon 5 in DNA extraction from formalin-fixed human brain tissues from a suspected case of early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia (EAOH). The aprataxin gene exon 5 DNA sequences were obtained following in vitro gene amplification using nested-PCR. Mutation on aprataxin gene exon5 was not observed in the suspected case of EAOH; however, it was possible to perform sequence analysis of aprataxin gene exon5. This method was more useful for DNA extraction and direct sequencing of formalin-fixation samples than the kit method.

(Received December 1, 2004 and accepted April 13, 2005)

**Key words:** Formalin-fixation, DNA extraction, Aprataxin

### 1 緒 言

遺伝子疾患に対する分子生物学的解析において、DNA

の塩基配列を決定することは一般的に行われており、その分子生物学的解析を行うにあたって、種々の試料から、より純度が高く、より高濃度のDNAを抽出することは非常

に重要である。中でも、ホルマリン固定は病理学の分野において試料の保存の為に汎用されている方法である。また、保存されている試料数も膨大であると考えられ、ホルマリン固定組織の分子生物学的解析は疾患の疫学的研究やレトロスペクティブな研究において意義のあるものと考えられる。

新鮮試料からの DNA 抽出方法および、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いた遺伝子解析については、数種類のキットが販売され、高純度、高濃度の DNA を簡便に抽出し、遺伝子解析に応用できる。しかし、ホルマリン固定組織からの DNA 抽出方法は幾つかの報告<sup>1-6)</sup>がみられる程度である。ホルマリンが DNA を構成する塩基と核内タンパク質との間にクロスリンクを形成し、アデニンやグアニンなどのプリンを切断するという化学的性質を有すること<sup>7)</sup>から、ホルマリン固定組織を用い、遺伝子疾患における遺伝子解析に応用した報告は少ない。

より有効な DNA 抽出方法を、DNA 抽出に多用されている一般的な簡易 DNA 抽出キットである Sepa Gene® (三光純薬) と Proteinase K を用いた方法の 2 種類について、ホルマリン固定ラット肝組織を用いて検討した。Sepa Gene® はチオシン酸グアニジンによる蛋白質の変性と、吸着剤による蛋白質の凝集を起し、酢酸ナトリウム溶液により核酸の水層抽出を可能にする簡易 DNA 抽出キットである。Sepa Gene® はチオシン酸グアニジンによる化学反応により蛋白質を分解し、Proteinase K は酵素反応により蛋白質を分解する。また、遺伝子解析を行う目的で、低アルブミン血症をともなう早発型遺伝性小脳失調症 (early-onset ataxia with ocular apraxia and hypoalbuminemia ; 以下, EAOH) 疑いの剖検ホルマリン固定脳組織からの DNA 抽出と、その原因遺伝子である aprataxin 遺伝子の解析を行った。EAOH は常染色体劣性遺伝の形式をとり、腱反射の低下、下肢筋力の低下、深部感覚障害、精神発達遅滞、眼振、心電図異常、低アルブミン血症、高脂血症などの臨床症状を示す<sup>8)</sup>。原因遺伝子は、9 番染色体長腕部に存在する aprataxin である。aprataxin は 7 つのエクソンよりなり、本邦ではエクソン 5 の点変異 (point mutation) と一塩基挿入が報告されている<sup>9)</sup>。

本研究では、まず基礎実験としてホルマリン固定ラット肝組織から有効な DNA 抽出法を見出し、EAOH 疑い剖検ホルマリン固定脳組織から DNA を抽出し、塩基配列を解析した。

## 2 試料および対象

### 2・1 ホルマリン固定ラット肝組織試料

Sprague-Dawley (SD) ラットの肝組織を用いた。ラット肝組織はラットから取り出した直後に、10%中性緩衝ホルマリン液 (ホルムアルデヒド含量 4%, pH7.4) (和光純薬) にて、1 時間 (以下, 1h), 1 日間 (以下, 1d), 1 週間 (以下, 1w), 1 ヶ月間 (以下, 1m), 3 ヶ月間 (以下,

3m) の期間それぞれ室温にて固定し、実験に用いた。組織のホルマリン固定期間の設定は、2 週間から 3 週間を上限とするものが多い<sup>3, 5, 6, 10-12)</sup>が、今回は、2 年間のホルマリン固定組織の DNA 解析を行うために、上記期間のホルマリン固定を行った。なお、実験に際し、ラットの苦痛軽減の為に吸入麻酔剤にてラットを眠らせた後、致死量のネンブタールを腹腔内に注入し、十分な麻酔深度であることを確認した後に肝組織を取り出した。

### 2・2 EAOH 疑いホルマリン固定脳組織試料

症例は、出生後に EAOH と診断され、肺炎にて死亡し、死亡後約 3 時間程度霊安室にてドライアイスで冷却安置された。その後、脳組織を剖検し、10%中性緩衝ホルマリン液にて 2 年間室温で保存されていたものを実験に用いた (以下, EAOH 疑い症例)。また、正常対照として、同様に肺炎で死亡し、死亡後 (死亡後の処置および詳細な時間は不明) に剖検された脳組織を 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて 2 年間常温にて保存した試料を用いた (以下, NC)。

なお、剖検ホルマリン固定脳組織試料からの DNA の抽出および遺伝子解析の実施については、家族に十分な説明を行い、同意を得た。

## 3 方法

### 3・1 ホルマリン固定ラット肝組織からの DNA 抽出方法

まず、ホルマリン固定されたそれぞれの試料 (1h, 1d, 1w, 1m, 3m) を 70%エタノール, 80%エタノール, 90%エタノールのそれぞれに 1 時間浸した後に、100%エタノールに 8 時間以上浸し、ホルマリンを除去した。エタノールから取り出した試料を十分乾燥させ、200mg を以下に述べる 2 種の DNA 抽出方法に用いた。

【方法 1】簡易 DNA 抽出キット (Sepa Gene® (三光純薬)) を用いた方法。

非フェノール性試薬と蛋白質凝集剤を使用し、相分配に基づいて比重の違いにより中間に凝集層を形成させる凝集分配法 (Agglutination Partition method; AP 法) を抽出原理とした簡易 DNA 抽出キットを用いて、手順<sup>13)</sup>に従い、DNA を抽出した。

【方法 2】Proteinase K を使用した方法 (Fig.1)

200mg の試料を Proteinase K の濃度が  $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の TNES 8M Urea buffer (10mM Tris-HCL; 10mM EDTA; 1% SDS; 8M Urea buffer)  $200\mu\text{l}$  で  $37^\circ\text{C}$  にて、24 時間消化した。その後、Proteinase K を最終濃度が  $1.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$  となるように添加しさらに  $37^\circ\text{C}$  で、72 時間消化し、遠心分離 (500rpm, 5 分間, 室温) した。沈殿物は更に Proteinase K の濃度が  $1.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の TNES 8M Urea buffer で  $37^\circ\text{C}$  にて、72 時間以上消化し、先に抽出した上清と同様に以下の手順でそれぞれ別に処理した。先に抽出した上清および 72 時間消化された沈殿物に phenol-chloroform-

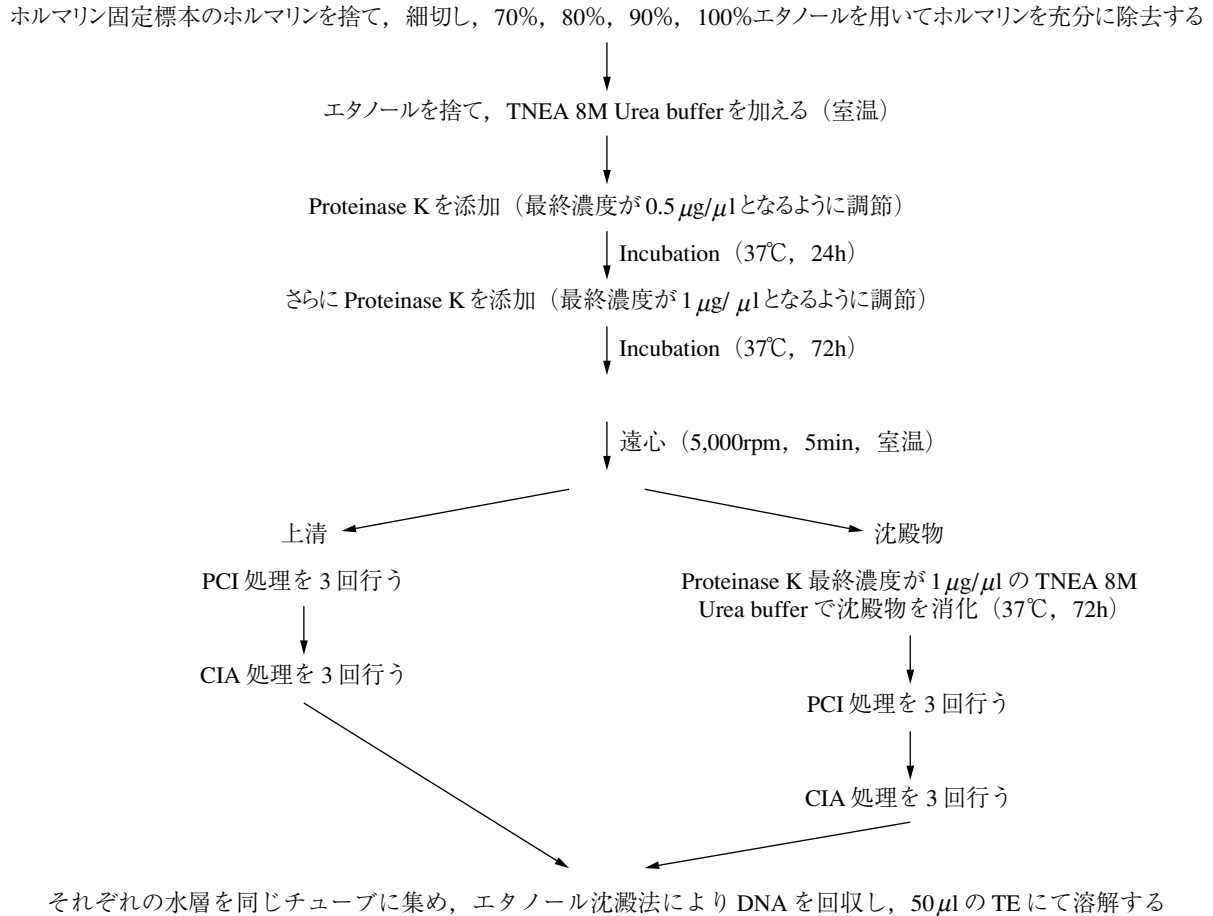


Fig.1 Protocol of proteinase K method

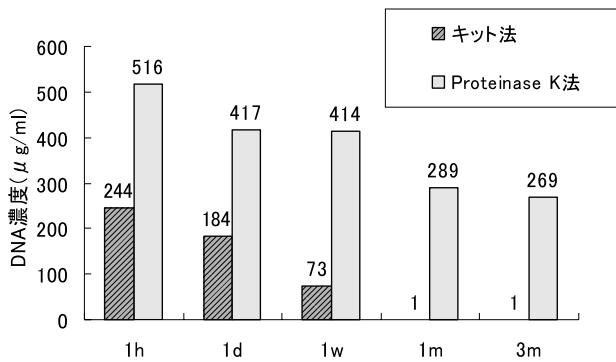
isoamylalcohol (以下, PCI) を添加し室温で3時間以上振盪した後、遠心分離 (10,000rpm, 10分間, 室温) した。その上層 (水層) を2度、同様にPCIで処理し、3度PCIで処理した後の上層にchloroform-isoamylalcohol (以下, CIA) を加え室温で1時間以上振盪し遠心分離 (10,000rpm, 10分間, 室温) する。CIA処理も3度行い、その上層を次の手順に用いた。この時点で上清を処理したものと、沈殿物を処理したものを混合する。混合したものに、1/10量の3MNaClと2.5倍量の100%エタノールを加えて、 $-20^{\circ}\text{C}$ で24時間静置し、遠心分離 (12,000rpm, 20分間, 室温) を行う (エタノール沈澱)。液体を破棄し、70%エタノールを加え、軽く洗浄した後、遠心分離 (12,000rpm, 20分間, 室温) を行い、上清を破棄し、ペレットを十分乾燥させた。

2種類の方法より抽出したDNAはそれぞれ、50 $\mu\text{l}$ のTEバッファー (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) にて溶解し、DNA濃度と波長260nmと280nmの吸光度の比 (optical density, 以下, OD比) を求めた。DNA濃度およびOD比の測定は吸光度計 (Gene Quant II, フェルマ

シアバイオテック) を用いて、10倍量に希釈したDNAを2回測定した。DNA濃度は260nmの吸光度を260nmの吸光度が1の時のDNA濃度である50で乗し、その平均値を希釈率である10で乗したものをそれぞれの試料のDNA濃度とした。OD比は得られた値の平均値とした。

### 3・2 EAOH 疑い症例ホルマリン固定脳組織からのDNA抽出とnested PCR法

Fig.2の結果から、DNA抽出は方法2。Proteinase Kを使用した方法が有効であることを確認した (結果は後述)。よって、方法2。Proteinase Kを使用した方法を用いて、EAOH 疑い症例ホルマリン固定脳組織よりDNAを抽出し、1段階目のPCR (以下, first PCR) とfirst PCRのPCR産物を鋳型DNAとして、2段階目のPCR (以下, nested PCR) を行い、本邦で変異が報告されているaprtaxin 遺伝子エクソン5の増幅を行った。first PCRに用いるprimerはMoreiraら<sup>9)</sup>が報告しているprimerを用い、nested PCRに用いるprimerはDNASIS Pro Ver.2.0 (HITACHI) を用いて新たに設計した (Table1)。反応溶液はDNA; 500ng, dNTP Mixture (TAKARA);



**Fig.2 Concentration of DNA extracted by using DNA extraction kit and proteinase K method**

The concentration of DNA extracted by using proteinase K was higher. The DNA concentration decreased as fixative time became longer.

**Table 1 Primer sets of aprataxin exon5**

first PCR

forward primer 5'-gtctgttctctctctgt-3'

reverse primer 5'-ggagccagcagcactacc-3'

nested PCR

forward primer 5'-agcactaccacctggctta-3'

reverse primer 5'-cgttaccattggctgtctt-3'

8 $\mu$ l, 10  $\times$  Ex Taq Buffer™ (Mg<sup>2+</sup> 20mM 含有) (TAKARA) ; 10 $\mu$ l, forward primer ; 最終濃度0.5 $\mu$ M, reverse primer ; 最終濃度0.5 $\mu$ M (Table1), TAKRA Ex Taq™ (TAKARA) ; 0.5 $\mu$ l を, 超純水で合計100 $\mu$ lとし, PCR反応はfirst PCR, nested PCRともに94 $^{\circ}$ Cで1分加熱した後, 94 $^{\circ}$ Cで1分, 60 $^{\circ}$ Cで1分, 72 $^{\circ}$ Cで1分30秒の反応サイクルを30回を行い最後に72 $^{\circ}$ Cで7分反応させ, 4 $^{\circ}$ Cで保存した.

### 3・3 電気泳動

PCR後の反応液5 $\mu$ lおよび, サイズマーカーとして100bp DNA Ladder (TAKARA) 約50ngを1.5%アガロースゲルにて100V, 30分間電気泳動を行い, エチジウムブロマイド溶液にて染色した. 染色されたアガロースゲルにトランスイルミネーター (DUAL-INTENSITY TRANSMILLUMINATOR, フナコシ) で紫外線を照射し, 増幅されたDNA断片をバンドとして確認した.

### 3・4 塩基配列解析

塩基配列の決定に用いるシーケンスプライマーはnested PCRのforward primerを用いた. 反応溶液はシーケンスプライマー ; 3.2pmol, テンプレートDNA ; 500ng, プレミックス (ABI) ; 7 $\mu$ lを超純水で20 $\mu$ lに調節したものをを用いた. シークエンス反応は96 $^{\circ}$ Cで1分加熱した後,

96 $^{\circ}$ Cで10秒, 50 $^{\circ}$ Cで5秒, 60 $^{\circ}$ Cで4分の反応を25サイクル行い, 4 $^{\circ}$ Cで保存した. その後エタノール沈殿により得られたシーケンス反応後の試料をTemplate Suppression Reagent (ABI) ; 25 $\mu$ lで溶解し, 95 $^{\circ}$ Cで2分加熱した直後にon iceで急冷させたものを, ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (ABI) を用いて解析した.

## 4 結果

### 4・1 ホルマリン固定ラット肝組織からのDNA抽出 (Fig.2)

方法1の結果は, DNAの濃度が, 1hでは244ng/ $\mu$ l, 1dでは184ng/ $\mu$ l, 1wでは73ng/ $\mu$ lであり, 1ヶ月間以上固定したものは1ng/ $\mu$ l以下であり測定機器の測定限界を下回っていた. OD比は1hが1.93, 1dが1.97, 1wが1.94であり, 1ヶ月以上固定されたものはOD比が2.00を超えていた.

一方, 方法2の結果は, DNA濃度が, 1hでは516ng/ $\mu$ l, 1dでは417ng/ $\mu$ l, 1wでは414ng/ $\mu$ l, 1mでは290ng/ $\mu$ l, 3mでは269ng/ $\mu$ lであり, 3ヶ月間の固定でもDNAの抽出が可能であった. また, OD比は1hが1.84, 1dが1.87, 1wが1.89, 1mが1.88, 3mが1.87であった.

### 4・2 EAOH疑いホルマリン固定ヒト脳組織由来DNAのnested PCR

抽出されたDNAの濃度はEAOH疑い症例, NCともに34ng/ $\mu$ lであり, OD比はそれぞれ1.68と1.67であった. また, 再現性を検討するために方法1でのDNA抽出も行った. その結果, 抽出されたDNA濃度はEAOH疑い症例, NCともに1ng/ $\mu$ l以下であり, 機器の測定限界を下回っていた. OD比は2.00を超えており, 1ヶ月以上ホルマ



**Fig.3 Agarose gel electrophoresis of first and nested PCR products**

Amplification products were electrophoresed on 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed with UN light. Lane M was a 100bp size marker. Lanes 1 to 4 were amplification products of aprataxin exon5 by first PCR and lanes 5 to 8 were amplification products of aprataxin exon5 by nested PCR. The DNA from normal human peripheral leukocytes was used as the positive control (lanes 1 and 5). Lanes 2 and 6 were amplified under the same PCR conditions, except distilled water was used instead of genome DNA (negative control). Lanes 3 and 7 were amplification products of aprataxin exon5 from the suspected EAOH sample. Lanes 4 and 8 were amplification products of aprataxin exon5 from Normal Control (NC).



リン固定したラット肝組織と同様の結果を示した。電気泳動による、目的部位の増幅の結果、first PCRでは10%アガロースゲルの電気泳動とエチジウムブロミド染色による目的部位の増幅はみられなかった。nested PCRでは、189bp付近に目的部位の増幅が確認された (Fig.3)。

#### 4・3 シークエンス (Fig.4)

遺伝子解析の結果はEAOH疑い症例およびNCともに、解析可能であった。本研究対象のEAOH疑い症例における、aprtaxin 遺伝子エクソン5には、過去に本邦で報告されている617番目のCのTへの点変異 (以下、617C→T)、689番目のTの1塩基挿入 (以下、689ins T) の変異<sup>9)</sup>はみられなかった。また、エクソン5全体において、変異はみられなかった。

### 5 考 察

本研究ではまず、ホルマリン固定ラット肝組織より、高濃度、高純度のDNAを抽出する方法を検討した。3ヶ月

間ホルマリン固定したラット肝組織からのDNA抽出では、proteinase K、PCIおよびCIAを用いたDNA抽出方法である方法2の方が、簡易DNA抽出キットを用いた方法1よりも、より高濃度のDNAを抽出することができた。その原因として、簡易DNA抽出キットを用いた方法では、ホルマリン固定によるタンパク変性のため、チオシン酸グアニジンによる、DNAを含むラット肝組織タンパクを十分に破壊することができなかったことが考えられる。proteinase Kの消化反応時間と、DNAの回収率を比較した研究では、proteinase Kの消化反応時間が長いほど、DNAの回収率が高かったことが報告されている<sup>14)</sup>。また、Kim<sup>3)</sup>はホルマリン固定組織に対し凍結と融解を繰り返し、繰り返しの数が多いほどホルマリン固定組織からのDNA抽出が高かったことを報告している。つまり、ホルマリン固定組織からのDNA抽出を考えた場合、十分に時間をかけて、ホルマリンにより変性したタンパクを消化しなければならない。方法2では、proteinase Kの消化反応時間を合計96時間と比較的長く設定し、更に、遠心分離された沈殿物に対して

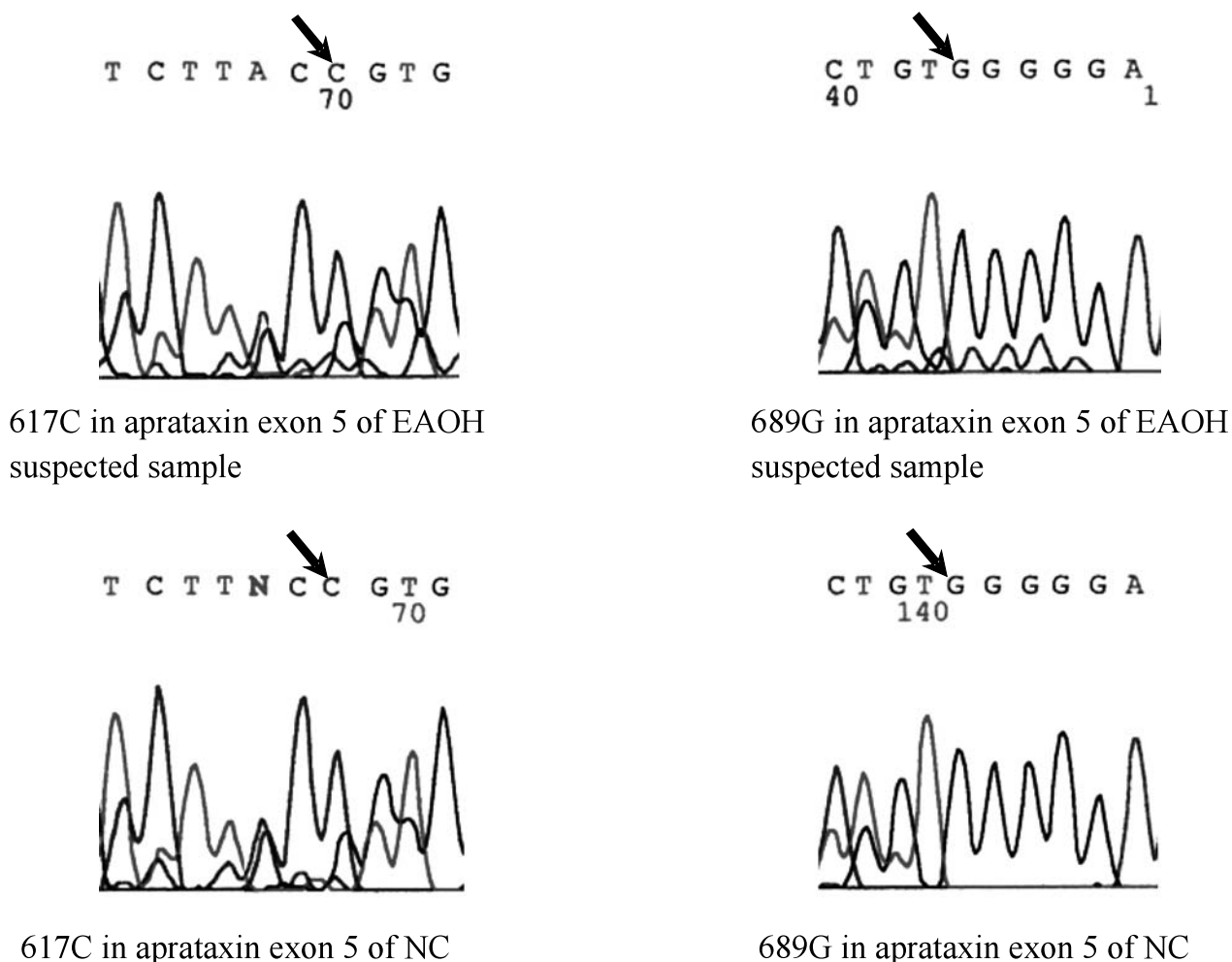


Fig. 4 Results of sequence of aprataxin exon5

Electropherograms of the case with suspected EAOH (top panel) and control (lower panel) sequences. Arrows point to 617C and 689T. The reported mutations<sup>9)</sup> were not identified.

も proteinase K の消化を行った為, DNA を含む肝組織タンパクが十分に破壊され, DNA の回収率が方法 1 と比べ, 高かったものと考えられる。また, OD 比は方法 1 が 1.93 から 2.00 以上であり, DNA 以外の不純物が多く存在している事が考えられた。方法 2 の OD 比は 1.84 から 1.87 の範囲であり, DNA の OD 比とほぼ一致した。

しかし, 本実験結果も過去の報告と同様に, ホルマリンの固定期間が長いほど DNA の回収率が低かった。特に, EAOH 疑い症例の剖検ホルマリン固定脳は 2 年間ホルマリンにより固定されていたため, 回収量が極度に少なく, ホルマリンの DNA に対するホルマリン毒性<sup>4)</sup>の影響を完全に除去することはできなかった。

今回の実験では, proteinase K を用いた方法 2 で, 2 年間ホルマリン固定された脳組織から, 分子生物学的解析に可能な DNA を回収し, nested PCR 法での DNA フラグメントの増幅も可能であった。前述した通り, ホルマリンは DNA のプリンを切断することから, ホルマリン固定組織から高分子 DNA を抽出することは困難である。ホルマリンは 1 週間ほどで, DNA の破壊を開始し<sup>5)</sup>, 特に数年間ホルマリン固定された試料から抽出された DNA は, 増幅が困難であることが報告されている<sup>6)</sup>。本研究でも, first PCR では, 目的部位の増幅確認が困難であった。この原因として, 長期のホルマリン固定による DNA の切断が, PCR 法における完全な鋳型 DNA の量を減少させ, その結果, first PCR より目的部位の増幅を困難にしていることが考えられた。また, first PCR よりも狭い範囲のプライマーセットを用いた nested PCR では, first PCR により増幅された目的領域を含む部分を鋳型 DNA として用いたため, アガロースゲルでの電気泳動とエチジウムブロマイド染色により, 目的領域の増幅の可視的観察が可能であったと考えられた。

本研究において塩基配列の解析を行った EAOH 疑い症例では, aprataxin エクソン 5 の領域において変異は観察されなかったが, 塩基配列決定の結果は, 十分に解析可能であった。現在のところ, ヒトホルマリン固定組織から DNA を抽出し, 塩基配列の解析を行った報告は少ない。本実験の結果は, 変異を同定することはできなかったが, 今後, ホルマリン固定組織を試料とした塩基配列の決定に役立つ可能性があるものと考えられる。

### 参考文献

- 1 内藤慎二, 高村昇, Tatiana Rogounovitch, 吉田由紀, 井出茜, 伊東正博, 山下俊一, 関根一郎. ホルマリン保存試料からの DNA 抽出と Lone-Linker-PCR 法の有用性. 広島医学 2000; 53: 233-235.
- 2 前河祐一, 中村由希子, 竹島俊一, 松岡喜美子, 中田善之, 川端邦弘. 長期ホルマリン固定肺組織からの DNA 抽出: PCR 法による *Pneumocystis carinii* DNA の検出. 大阪府立看護大学医療技術短期大学部紀要 1999; 5: 39-44.
- 3 Kim O. Effect of fixation time and freeze-thaw cycles on the molecular analysis of viral DNA. J Vet Sci 2003; 4:

- 203-204.
- 4 Rogers BB, Alpert LC, Hine EAS, Buffone GJ. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. Am J Pathol 1990; 136: 541-548.
- 5 Koshiba M, Ogawa K, Hamazaki S, Sugiyama T, Ogawa O, Kitajima T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. Pathol Res Pract 1993; 189: 66-72.
- 6 Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Mnos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissue. Am J Clin Pathol 1991; 95: 117-124.
- 7 Jackson V. Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent. Cell 1978; 15: 945-954.
- 8 伊達英俊, 小野寺理, 辻省次. 常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 (アプラタキシン欠損症). ゲノム医学 2002; 2: 241-250.
- 9 Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, Mendonca P, Costa M, Barros J, Yanagisawa T, Watanabe M, Ikeda Y, Aoki M, Nagata T, Coutinho P, Sequeiros J, Koenig M. The gene mutated in ataxia-ocular aprataxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. Nat Genet 2001; 29: 189-193.
- 10 新田由美子, 麻生博也, 田中英夫, 金隆史, 宇吹暁, 高田純, 星正治, 早川式彦, 神谷研二, 丹羽太貴. 高分子量 DNA の安定性に対する長期ホルマリン固定, パラフィン包埋の影響. 広島医学 1996; 49: 458-460
- 11 Tateyama H, Tada T, Hattori H, Murase T, Li WL, Eimoto T. Effects of prefication and fixation times in apoptosis detection by situ end-labeling of fragmented DNA. Arch Pathol Lab Med 1998; 122: 252-255
- 12 Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okudo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. Nucleic Acids Res 1999; 27: 4436-4443
- 13 船渡忠男, 星野敦, 川村武. セバジーンを用いた核酸抽出法の使用評価. 医学と薬学 1993; 29: 1401-1404.
- 14 Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW, Quirke P. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol 1990; 43: 499-504.

別刷請求先:

〒060-8556 札幌市中央区南 1 条西 17 丁目  
札幌医科大学大学院保健医療学研究所  
理学療法学専攻 菊池 真  
TEL : 011-611-2111 (内線 2877)  
E-mail : ksin@sapmed.ac.jp