The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Application of microwave (MW) ー fixed tissue samples to in situ hybridization : Detection of carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA and oncogene transcripts in MWー fixed colorectal carcinomas using sulfonated probes
Author(s)	室谷, 昌弘
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37521
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【53】

氏名・(本籍)	室谷昌弘（むろたにまさひろ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9312 号
学位授与の日付	平成2年8月8日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Application of microwave (MW)-fixed tissue samples to in situ hybridization : Detection of carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA and oncogene transcripts in MW-fixed colorectal carcinomas using sulfonated probes (microwave固定組織標本のin situ hybridizationへの応用：スルホン化プローブを用いた大腸癌でのCEAおよび癌遺伝子mRNAの検出)
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 北村 幸彦　教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

〔目 的〕

lh situ hybridization 法は組織切片上で直接核酸配列を検出する手法であり，mRNAの量的な変化を個々の細胞レベルで検討することが可能である。しかし，mRNAは非常に不安定で容易に崩壊するため，対象とする組織はできるだけ迅速に固定しなければならない。最近報告されたmicrowave固定法は，生体浸透性の高い2450MHzのmicrowaveを照射することによって極めて短時間内に組織を固定することが可能で，固定操作中のmRNAの崩壊も少ないと考えられる。本研究は，microwave固定した大腸癌組織のパラフィン包埋切片を対象に，carcinoembryonic antigen（CEA）と癌遺伝子rasおよびc-mycのmRNAをスルホン化プローブを用いて検出し，microwave固定法がin situ hybridizationにも有用であることを明らかにしたものである。

〔方 法〕

大腸癌患者の新鮮切除標本を径1cm以下にトリミングした後，2%formaldehyde，0.05%glutaraldehyde存在下に500Wの出力でmicrowave を20秒間照射して迅速固定を行ない，パラフィン切片を作製した。切片上のmRNAを露出させるために2.5 μg/ml，5～10分間の酵素処理を行ない，次いで10分間のacetylationおよび4時間のprehybridiztionを施行した後，CEAのスルホン化cDNAプローブ（380bp）を用いて，50%formamide存在下に42℃，12時間

hybridization を行なった。切片を洗浄した後，シグナルをＡＢＣ法にて検出した。

さらに大腸癌２６例のmicrowave固定パラフィン切片に対し，上述の方法で癌遺伝子Ｈa-ras（８８０bp），Ki-ras（３９０bp），v-myc（９９０bp）をプローブとするin situ hybridizationを施行するとともに，その隣接切片に対し癌遺伝子蛋白p21rasおよびp62mycに対する抗体を用いた免疫染色を行なった。

〔成　績〕

Ｍicrowave 固定標本は光顕的観察にてホルマリン固定標本と遜色ない形態を示した。スルホン化CEAcDNAプローブを用いたin situ hybridization では塩酸による除蛋白操作は不要であり，また従来に比較して低濃度，短時間の酵素処理を行なった切片でも大腸癌細胞の細胞質にほぼ一様にCEAのｍＲＮＡが検出され，隣接粘膜でも細胞質にシグナルが得られた。Ｈybrid の特異性を確認するため，切片を0.1mg/mlのＲNaseで３７℃，２時間処理を行なったところ，細胞質のシグナルは消失した。また，ＣＥＡｃＤＮＡ probeの代わりにnonspecific vector probe を用いてin situ hybridization を行なったが，シグナルは検出されなかった。一方，ホルマリン固定標本では強力な除蛋白操作が不可欠であるため，組織構築の破壊が著しく，また隣接粘膜のｍＲＮＡは検出されなかった。

大腸癌２６例のmicrowave固定標本を用いた癌遺伝子のin situ hybridizationでは，Ha-ras６例（２３％），Ki-ras７例（２７％），c-myc１２例（４６％）にｍＲＮＡが確認され，癌遺伝子蛋白の免疫組織染色では，ｐ２１ras６例（２３％），ｐ６２myc１７例（６５％）に陽性所見が得られた。ｍＲＮＡレベル，蛋白レベルでの検索結果を個々の例で比較すると，多くの例で両者の間に良好な一致をみた。癌遺伝子の発現を蛋白レベルでさらに詳しく検討すると，癌組織の部位によってかなり不均一な染色像を認める例があり，同一の癌巣であっても癌遺伝子蛋白の蓄積量が大きく異なっていることが示唆された。

〔総　括〕

1. Microwave照射による迅速固定はin situ hybridizationに適した固定法であることを明らかにした。
2. Microwave固定標本を用いたin situ hybridizationでは塩酸による除蛋白操作は不要であり，また低濃度，短時間の酵素処理でもシグナルの検出は可能であった。
3. 大腸癌２６例のmicrowave 固定標本を用いてｍＲＮＡレベルと蛋白レベルの両面から癌遺伝子の発現を検討し，両者がよく相関することを示した。

論文審査の結果の要旨

本研究は，microwave（MW）照射による迅速固定標本が，in situ hybridization 法による

mRNAの検出に有用であることを，ヒト大腸癌組織における癌胎児性抗原（CEA）と各種癌遺伝子mRNAの検出を通して明らかにしたものである。この研究により，MW固定法がmRNAの保存にも適し，in situ hybridization 法の手技の簡素化に貢献する優れた固定法であることが示された。今後の細胞生物学的研究に資するところが大きく，学位に値する業績と考える。