

O-59

Fluorescein In Situ Hybridization のホルマリン固定標本への適用条件の検討

松田壮正¹、松田真弓¹、西谷 巖¹、
Weier H-UI²、Pinkel D.²、Gray J W.²
(岩手医大・婦、皮¹、UCSF Molecular Cytometry²)

Fluorescence In Situ Hybridization(FISH)は染色体数の異常を検出するのに有効な手段であり、また、特定領域遺伝子の検出にも応用されつつある。FISHの通常のホルマリン固定パラフィン切片への適用はいまだ安定した結果を得るに至っておらず、我々は至適条件の設定を検討した。方法：染色体(1,7,17)セントロメアを認識するDNAプローブをビオチン化、ジオキシゲニン標識して用いた。

3日間ホルマリン固定したリンパ節、メラノーマ組織を3, 6, 10 μ 切片とし、ペプシンないしプロナーゼで処理し、その後50%ホルムアミド中に4~60℃、20分~2ヵ月間保存し、ハイブリダイズした。プローブ検出にともなう非特異蛍光除去に2種類の界面活性剤(NP-40, CHAPS)を使用した。結果：リンパ球では計算上のシグナル検出率と実測値は3および6 μ 切片ではほぼ一致したが10 μ 切片では大きく解離した。酵素処理時間は症例毎に調節が必要であり、その後ホルムアミドに浸潤するとシグナルが明瞭になり、自家蛍光が減少し安定した結果を得た。切片の場合核の部分観察になるが、リンパ球では核あたりシグナルがおよそ1であったがメラノーマ細胞では、1から2.7にわたり、由来細胞のシグナル数の変化を反映した結果を得た。他組織でも検討を試みた。

O-60

In situ hybridization法によるコクサッキーB3ウイルス性心筋炎マウスにおけるウイルスゲノムの検出

浮村 聡¹、小高正裕¹、小出尚志¹、
出口寛文¹、北浦 泰¹、河村慧四郎¹、
平井莞二²
(大阪医大・3内¹、東京医歯大・難治疾患研究所²)

目的：マウスのコクサッキーB3ウイルス(CVB3)性心筋炎モデルにおいて、in situ hybridization法により、心臓におけるウイルスゲノムの局在を明かにする。方法：コクサッキーB1(CVB1)cDNAのCVB3と相同性の高い部分がCVB3とhybridizationすることをdot blot法にて確認し、このCVB1cDNAをジゴキシゲニンでラベルしてプローブとした。3週齢雄CH3/HeマウスにCVB3を腹腔内接種、接種後3~28日に屠殺、心筋凍結切片を作成し、上記プローブでhybridizationし、免疫組織化学的手法で発色した。コントロールとして①RNase処理、②pBR322をラベルしたプローブ、③ウイルス非接種マウス心筋標本を用いた。結果：すべてのCVB3接種マウスが第5~9日急性心筋炎をきたし、心病巣及び周囲の心筋細胞胞体内及び線維芽細胞に陽性シグナルを認めた。14日以後、心病巣は縮小したが、第21日まで病巣部に陽性シグナルがみられた。コントロールは陰性であった。総括：CVB1cDNAでCVB3とhomologyの強い部分をジゴキシゲニンでラベルしたプローブを用いたin situ hybridization法により、CVB3性心筋炎マウスにおいて心筋細胞及び線維芽細胞にウイルスを検出した。