

W I - 2

新鮮凍結切片を用いたin situ hybridization (ISH)

小路 武彦^{1,2}、中根 一穂¹、R.M. Brenner²(長崎大・医・解剖¹, Oregon Regional Primate Research Center²)

【緒言】新鮮凍結切片とは、組織を摘出後直ちにOCT compound等に包埋・凍結したブロックからの凍結切片である。現在ISHでの使用は頻繁ではないが、最も高い感度を得られる標本として魅力的である。更に未固定であることから、DNAやRNAの抽出を含め他の手法への汎用性に富む。本発表では、サル子宮並びに卵管に於けるestrogen receptor (ER) mRNAの局在証明を通して、新鮮凍結切片使用上考慮されるべき点並びにその有効性を示す。

【材料・方法】Estrogen (E)とprogesterone (P)の血中レベルの異なるサルの子宮と卵管を摘出後直ちに凍結し、液体窒素中或いは-80℃に保存した。5-13 μ mの凍結切片を作製し風乾後ISHを行った。プローブとしては、ER cDNAからsense及びantisenseオリゴヌクレオチド(45-mer)を合成し、digoxigenin-dUTPを用いてterminal transferaseで標識した。他の遺伝子については、5'並びに3'端でTTAの繰り返しを含んだオリゴヌクレオチドを合成しT-T dimer化したものを用いた。Hybridizationは40% formamide, 0.5-1.0 μ g/ml プローブ存在下で37℃, overnight行い、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いてシグナルを検出した。

【ISH条件の至適化】固定は、EtOH/酢酸, acetone, 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS等を用いて比較した結果、PFAで室温20 min固定が最適であった。前処理では、0.2N HCl処理は非特異的反応を除去する上で大変有効であった。子宮筋層等では、0.2% Triton X-100もシグナル上昇に寄与した。特に新鮮凍結切片からはRNAの消失が容易に起こるので、RNAの保存度に注意を払う必要があったが、Methyl Green/Pyronin Y染色や28S rRNA cDNAを用いたISHを併用することにより結果の適性化が可能であった。

【染色結果】至適条件下に於いて、ER mRNAはサル子宮内膜に於いて血管内皮を除く殆どの細胞に検出されたが、PによるER mRNA発現阻害は細胞種特異的であった。卵管上皮に於いてはsecretory cellsはER mRNA陽性であるがciliated cellsは陰性であった。又これらの結果の特異性は、senseプローブの使用、競合実験、RNase前処理、陰性組織の使用、過剰stringent条件での洗浄等の対照実験により確認された。

【考察】新鮮凍結切片は、適切に操作されることによってパラフィン切片や既固定凍結切片よりも高いシグナルを与え、解像度についても非放射性ISHを用いれば細胞個々のレベルでの陰陽判定に何等支障はなかった。