

# ホルマリン固定パラフィン包埋肝生検組織における HCV RNAの検出法の確立

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/15023">http://hdl.handle.net/2297/15023</a>

学位授与番号	医博甲第1056号
学位授与年月日	平成4年9月30日
氏名	河合博志
学位論文題目	ホルマリン固定パラフィン包埋肝生検組織における HCV RNA の検出法の 確立 - non-radioactive <i>in situ</i> hybridization による検討 -
論文審査委員	主査 教授 小林 健一 副査 教授 中沼 安二 教授 井関 尚一

### 内容の要旨および審査の結果の要旨

従来、C型肝炎の研究はC型肝炎ウイルス（以下HCV）抗体あるいはPCR法によるHCV RNAの検出等、血清学的な検討を中心に行なわれてきている。一方、ヒト肝組織内のHCVの分布については報告されていない。本研究ではC型慢性肝炎患者肝生検組織におけるHCV RNAの検出を通常ホルマリン固定パラフィン包埋肝生検組織を使用して、thymine dimer法による*in situ* hybridization法により試み、その検出条件の検討を行なった。

研究方法：C100-3抗体陽性慢性肝炎患者のホルマリン固定パラフィン包埋肝生検組織を対象とした。検出にはthymine dimerをreporterとした非放射性*in situ* hybridizationを施行し、抗thymine dimer抗体を用いて免疫組織学的に検出した。検出感度を上げるためにprobeとしてChiron prototype HCV sequenceの5' non-coding region 2カ所、NS4 region 1ヶ所に対する合成oligodeoxynucleotide probeを作成し、混合して使用した。検出の際、特にバックグラウンドの非特異的染色が問題となったため(1)抗thymine dimer抗体濃度(2)組織のDNase処理(3)hybridization mixtureの組成(4)probe濃度の検討を行なった。特異性の検討としてgp35蛋白に対する抗体(抗エンベロープ蛋白抗体)を使用して、同一症例の連続切片に対してABC法による免疫組織染色を施行した。

研究結果：従来の手法ではanti-sense HCV probeのみならず、prolactin probeを使用した陰性対照実験でも特に肝細胞核に強い染色を認めた。抗体濃度は特にこの非特異的染色には関与していなかった。肝細胞核のクロマチンにprobeが非特異的に結合する可能性を考慮してDNaseによる組織処理を施行したが非特異的染色の減少は認められなかった。hybridization時あるいは洗浄のstringencyを変えても非特異的染色の低下は認めなかった。hybridization mixtureの組成の検討ではdextran sulfateを除いた場合、非特異的バックグラウンドの著明な低下を認めた。この条件下ではprobe濃度を上げてバックグラウンドの上昇は認めず、肝実質細胞細胞質に陽性所見を認めた。同一症例の連続切片に対する免疫組織染色でも同一の部位にエンベロープ抗原の染色を認めた。症例によってはプラス鎖HCVに加え、増殖中間体と考えられるマイナス鎖HCVも検出された。この研究結果により通常の肝生検組織においてもHCV RNAの検出が可能となり、C型肝炎の病態の解明の重要な一助になるものと考えられ、肝臓病学に資するところが大きいものと評価された。