

氏名	木村 東二
授与した学位	博士
専攻分野の名称	医学
学位授与番号	博乙第 号
学位授与の日付	平成16年9月30日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)
学位論文題目	Quantification of in situ Hybridization Signals in Rat Testes (ラット精巣における in situ ハイブリダイゼーションシグナルの定量化)
論文審査委員	教授 吉野 正 教授 大塚 愛二 助教授 益岡 典芳

#### 学位論文内容の要旨

DNAアレイによる分析は、生理・病態における遺伝子発現の変化を明らかにするが、関与する分子の局在を検索することは、その機能を知る上で重要である。また、そのデータを十分活用するために、定量的in situ ハイブリダイゼーション (ISH) による解析も有意義と考えられる。今回、ブアン固定したラット精巣における画像のポスタリゼーションを用いることによりISHシグナルの定量化を試みた。

プローブはラット28S rRNAの、種間でよく保存された部分をもとに多標識作製法により作製した。発色させた切片は、AxioPlan Zeiss顕微鏡下、AxioCam CCDカメラでTIFフォーマットで保存した。Adobe Photoshopのposterization ツールでシグナルの強さを、白色 (grade 1)、淡い灰色 (grade 2)、灰色 (grade 3)、濃い灰色 (grade 4) と黒色 (grade 5) の5色に分解表示した。シグナルにムラが無いこと、近隣の精細管の同じステージの同種の細胞が、同程度のシグナル量を発現していること、低倍で、初期の精母細胞がgrade 5であることを確認した後、同時に4本以上の精細管が存在するように写真を撮り、ポスタリゼーションによる解析を行った。

結果、初期精母細胞はgrade 5、精母細胞はgrade 4、複糸期の精母細胞が grade 3、精子細胞で、grade 2とgrade 1が観察され、発現量の変化を数値化することが可能となった。これらの結果をもとに、正確な定量化のために克服しなければならない点、必要な条件について考察した。

#### 論文審査結果の要旨

本研究は、in situ ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現を定量的に解析することを試みたものである。プローブとしては、ラット 28SrRNA の種間でよく保存された部分について設定した。検索対象は、ラットの精巣で、ブアン固定したものである。発色させた切片は、顕微鏡、CCDカメラで検出し、フォトショップでシグナルの強さを客観的に判定した。その結果、精母細胞は分化の段階に対応した rRNA 量の差がみられた。このような検索結果を用いることで、形態的に区別される各種細胞での遺伝子発現を、より客観的に評価できる方法論を提示することができる結論している。

実験の目的、手法、結果とその解釈とも適切になされており、ISHの方法論について重要な知見を得たものと評価される。

よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。