

細分課題 1.

先天性代謝異常症の細胞学的診断に関する研究

——色素性乾皮症(XP)の細胞学的研究——

大阪大学微生物病研究所

岡田善雄

A 細胞学的診断法

ヒト皮膚組織片を採取し、培養して線維芽細胞を増やす。この細胞に紫外線を 30 J/m^2 照射したのち ^3H -チミジン $10 \mu\text{Ci/ml}$ を含む培地で3時間培養したのち、コダックヌクレアートラックエマルジョン NTB 3 に浸したのち1~2週間放置後現像する(オートラジオグラフィ)と細胞核の上に銀粒子が現われてくる。これはDNA合成によってとり込まれた ^3H -チミジンの ^3H によって作られたもので、この銀粒子の数がDNA合成量に比例する。この処理細胞の中で核の上が真黒になる程銀粒子が存在しているものとゴマ塩のようにまばらに銀粒子の存在しているものがある。前者は細胞分裂周期のDNA複製期にあたるもので、いわゆる定期DNA合成を示しており、上記の紫外線照射と無関係なDNA合成である。後者が紫外線照射によって障害を受けた遺伝子の修復(除去修復)のために誘発されたDNA合成で「不定期DNA合成」と呼ぶものである。したがってこの合成量は紫外線照射量と相関しており、照射しない細胞では現われず、強く照射すると沢山の銀粒子が現われてくる。色素性乾皮症はこの除去修復機構に欠損を示すので、この診断には上記の 30 J/m^2 という紫外線照射量が適当である。

実際に診断の場合には対照に正常ヒト皮膚線維芽細胞(分離初期の新しいもの)を用い患者細胞と同時に上記の処理をして不定期DNA合成を示す細胞核を100ヶ選んでその上に存在する銀粒子数を測定し正常細胞に対する100分率をとる。患者細胞からの値が正常の60%以下の場合には色素性乾皮症を強く疑わねばならない。次項に詳述するが同じ色素性乾皮症の中でも不定期DNA合成レベルが0~60%まで5種類存在するので、上記の方法では5種類

のどの群に入るかを確定するのは次項の相補性検定によらねばならないが、一応上記の測定で、色素性乾皮症に含まれる病気か否かを知ることができどの群に属しそうかを想像できる。以下の分類に従えばよい。

細胞	不定期DNA合成
正常細胞	100%
XP, A群	< 2%
XP, B群	3~7%
XP, C群	10~25%
XP, D群	25~55%
XP, E群	50~60%
XP, variant*	100%

*XP, variantは除去修復機構の欠損ではなくて、複製後修復機構の欠損と考えられているので本研究からは除外する。

B 色素性乾皮症の遺伝的相補性群の分類法

同一の機能欠損を示すにもかかわらず、欠損遺伝子部位が異っているという現象は大腸菌等を材料とする、いわゆる分子遺伝学の分野では珍しく無いが、ヒトに関して、見つけられた最初のものが、この色素性乾皮症である。XP細胞はどれも除去修復機構の欠損を示すが、5つの夫々に違った部位の遺伝子に欠損があって、色素性乾皮症患者をそのどれかの群に分類することができる。この分類は色素性乾皮症の家系的カウンセリングに重要な意味をもっている。即ち前表に示したようにA, B, C, D, Eの5群に分類されるが、同類以外の群との婚姻は、正常家系との婚姻と全く同じ条件になる。例えばA群家系は遺伝的に他のB~E群家系とは完全にヘテロであり、この組合せから患児の生まれる機会はない。

この相補性群の検定法は、細胞融合という手段を用いて行うことができる。現在世界的に各群を代表するヒト細胞が確立しているので、患児由来の線維芽細胞を、之等標準細胞と融合させたのち、A項のように紫外線照射を行ったあとオートラジオグラフィーをすることで生じた不定期DNA合成を示す銀粒子

数を計測する。融合した多核細胞（ヘテロカリオン）に含まれる細胞核の不定期DNA合成量が正常レベルまでもどっている場合、その組合せは相互に相補性を示したことになる、欠損遺伝子部位が異っていた証拠となる。ヘテロカリオンを作っても銀粒子数が変化しなかった組合せでは、相補性が無かったわけで、これは2種類の細胞が同じ遺伝子に欠損部位をもっていた証拠となる。このようにして5組の組合せの中で相補性を示さなかった組合せに患児の家系が分類されることになる。

このようにして日本人家系の分類が実施されたうち、確定したものについて表1に示す。

この表に見られるように日本での分布は大きくA群に集中しており、ヨーロッパ及び米国ではC群に集中しているのが特徴的である。なお日本を東部と西部に分類すると、A群への集中は西部により著明で、東部ではD、E、variantに属する家系が点在している。

C 色素性乾皮症細胞の治療

紫外線障害DNAの修復機構は、生物が地球上に現われる時、太陽光からの防禦機構の1つとして獲得せねばならなかった基本的生理機能であったらうと想像される。このことを裏書きするように、バクテリオファージのあるものにすら、この機能があり、勿論細菌類はすべてもっている。除去修復機構に関与する酵素を純粋に大量に取り出すのに最も容易なのはバクテリオファージ由来の酵素で、たとえ細菌であっても相当困難である。ヒトから大量に取ることは勿論、現在のところ全く不可能である。

バクテリオファージT₄の遺伝子支配の下で作られる紫外線特異的エンドヌクレエースを精製し、これをHVJウイルスを用いて生きているXP細胞内に人為的に注入すると上記のXPの5群すべての細胞が正常にもどることを確かめた。これは細胞レベルのことであるが、世界で最初の試みであり、今後の遺伝病治療への道を作ったと考えている。実際に患者に治療を今すぐ行うことは色々の不明な問題が山積していてできない。今後基本的方向を定めるためだけで数年は要するし実際的利用には更らに数年の努力が必要と考えている。

発 表 論 文

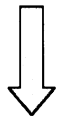
3編を準備しているが未だ出版にまで致っていない。

表1. 相 補 性 群

		A	B	C	D	E	variant	総計
日 本	確定	20	0	0	1	1	2	24
	想定	(6)		(1)	(3)	(3)*	(6)**	(19)
ヨ ー ロ ッ パ 米 及 国	確定	9	1	12	3	2	4	31

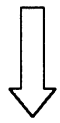
* 相補性群DかEに属する患者が3名

** 相補性群Eかvariantに属する患者6名



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



A 細胞学的診断法

ヒト皮膚組織片を採取し、培養して線維芽細胞を増やす。この細胞に紫外線を $30\text{J}/\text{m}^2$ 照射したのち ^3H -チミジン $10\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ を含む培地で 3 時間培養したのち、コダックヌクレアトラックエマルジョン NTB3 に浸したのち 1~2 週間放置後現像する(オートラジオグラフィ-)と細胞核の上に銀粒子が現われてくる。これは DNA 合成によってとり込まれた ^3H -チミジンの ^3H によって作られたもので、この銀粒子の数が DNA 合成量に比例する。この処理細胞の中で核の上が真黒になる程銀粒子が存在しているものとゴマ塩のようにまばらに銀粒子の存在しているものとがある。前者は細胞分裂周期の DNA 複製期にあたるもので、いわゆる定期 DNA 合成を示しており、上記の紫外線照射と無関係な DNA 合成である。後者が紫外線照射によって障害を受けた遺伝子の修復(除去修復)のために誘発された DNA 合成で「不定期 DNA 合成」と呼ぶものである。したがってこの合成量は紫外線照射量と相関しており、照射しない細胞では現われず、強く照射すると沢山の銀粒子が現われてくる。色素性乾皮症はこの除去修復機構に欠損を示すので、この診断には上記の $30\text{J}/\text{m}^2$ という紫外線照射量が適当である。