

細分課題 14

染色体異常症の細胞学的ならびに臨床的診断法の開発研究

14・1 染色体分染法の開発に関する研究

国立遺伝学研究所

中 込 弥 男
安 積 順 一
岡 成 寛

ま え が き

通常、核型分析によっては診断不可能な新しい染色体異常が続々と発見されており、分染分析は染色体検査の常識となったが、今後の発展のためには、さらに精度の高い方法の開発が必要である。また既存の分染法の内には、手技が著しく複雑なもの、結果が不安定で好結果が得られ難いもの、高価な器機を要するものなども多い。また女性の2本のX染色体を相互に識別し、個々に両親、祖父母などよりの由来・継承を明らかにすることは従来全く不可能であった。これが実現すると、遺伝相談・染色体地図・Xの不活性化などの領域での大きな進歩が期待される。

研 究 目 的

細分課題14においては、イ) 精度の高い分染技術の開発、ロ) 簡便で普及の容易な技術の開発、ハ) 既存の技術の追試、取捨選択と改良、ニ) 臨床所見に基づく、新しい染色体異常診断の可能性の追求、以上の4種の目標を設定しているが、中込(14-1)はその内特にイ)とロ)を中心に一部ハ)を加えて研究を進めている。本年度はイ)については先ずX染色体の変異現象検出、換言すれば女性の2本のX染色体を相互に識別する可能性について検討した。また染色体変異を定量的に表わすことにより、2次狭窄部の変異の検出精度の改善を図った。ロ)としては、前年度に成功した蛍光顕微鏡によらない蛍光分析法(干渉フィルター法)の改良を図った。

研 究 方 法

X染色体の変異(異型)検出の目的には、先ず既存の分染法およびその組み合わせを試みた。続いて昨年我々が開発したLBA法、Q+LBA、昨年試みて不成功だったLBA+CおよびQ+LBA+Cバンド法、新しい蛍光色素であるDAPI、ヘキスト33258 およびこれらとCバンドなど他の分染法との組み合わせを検討した。染色体変異の定量的扱いについては、Cバンド法(CBG)により処理した標本の1、9、16番の2次狭窄部について、面積と濃度をニコンビッカーズM85走査型顕微濃度計を用いて測定した。またこれらの3対のCバンド陽性部分以外の面積、核板内の全染色体の占める面積、21番長腕や16番短腕面積なども測定し、これらの内どの部分を基準として2次狭窄部を表した場合に変異の検出力が最大となるかを検討した。干渉フィルター法については、昨年度中に既存のFITC用フィルターによる方法を完成したが、キナクリンマスタード(QM)の吸収スペクトルに合わせた専用フィルターによりさらに性能の向上が期待されるので、その製作をオリンパス光学に依頼した。

成 果

13例の正常女性についてGバンド法(GTG)により検討したところ、内5例で2本のX染色体の内片方の着糸点が濃染する所見が得られた。しかしこの所見は個体内の総ての細胞に見られた訳ではなく、1/2ないし2/3の細胞に止まるなど出現にやや安定を欠くため実用化には問題があることがわかった。QやRバンド単独では、X染色体上に変異を検出することは全くできなかった。Q+Cバンド法は、通常C処理(CBG)をQと組み合わせた場合成功率が著しく低かったが、Rubenstein(1978)の変法によると好結果が得られることが分かった。またこの変法はLBA法の後にも有効であった。ただしQ+LBA+Cの組み合わせではこの方法も無効であったが、Q染色後の脱色操作を変えることにより、かなりの成功率が得られた。DAPIは抜けの良い鮮明な蛍光像が得られ、続いてのCバンドの染色性も良かったが、X染色体の着糸点を染め出す目的には、LBA+C(変法、以下すべてCは変法を表わす)またはQ+LBA+Cが最も優れていた。

1、9、16番の2次狭窄部(qh)については、6例について検討の結果、

21qや16pなど特定の部分を基準に取る方法よりも、2次狭窄を持つ染色体自身の全面積ないし2次狭窄部を除いた真正クロマチン部の面積を基準に、当該qh部の面積を表わす方法が優れていることが分かった。また特定の基準に対する2次狭窄部の面積比の形で結果を表わすよりも、複数の症例について面積比を測定し、その平均値から何標準偏差離れているか、という基準により個々の症例を評価すると、変異の検出率が高くなることが分かった。

簡易蛍光法に関しては、キナクリン専用の干渉フィルター“IF-423”の試作品が完成した。これは既存のFITC用と異なり赤色域に副透過帯を持たないため、赤色除去用の補助フィルターを必要としない、昨年までに比べ約50%蛍光が明るい、褪色がほとんどないなど、特長が多く実用上も十分な性能を持つことが分かった。また本品は通常の蛍光顕微鏡と組み合わせての使用も可能で、BV励起フィルターに比べ、明るく褪色も少ない蛍光観察が可能である。

考 察

X染色体の変異現象の検出については、C処理にRubensteinの変法を採用することなどの改良により、LBA+C, Q+LBA+C, DAPI+C, Q+C その他の連続処理においてXの着糸点を確実に識別し染め出すことに成功したが、どの程度の個体がこの部分についてヘテロの所見を示すかなど、次年度において解決すべき課題が残されている。染色体変異に関しては、今年度に検討した3対とD・G群など既知の変異染色体以外について、変異現象の有無を探りさらに検出精度を上げることが、今後の課題である。簡易蛍光法は技術的にはほぼ完成したので、商業ペースでのフィルターの発売と第一線病院への普及が望まれる。

要 約

X染色体を相互に識別し家系内の継承を辿る目的で、変異現象を検出する努力を行った。種々な処理技術や薬品を検討したが、昨年我々が開発したLBA法とCバンド変法の組み合わせにより、X着糸点を確実に識別し染め出すことが実現した。2次狭窄部の変異については、定量化と推計学的な扱いにより、検出率の大幅な向上をみた。蛍光顕微鏡によらない簡易蛍光法については、専

用フィルターの設計・製作により，実用化に成功した。

文 献

- 1) Nakagome, Y., Oka, S. and Higurashi, M. (1978). Quinacrine and acridine-R banding without a fluorescence microscope. *Hum. Genet.*, 40:171-176.
- 2) Nakagome, Y. (1978). Palindromic theory and the telomere of eukaryote chromosomes. *Ann. Rep. Nat. Inst. Genet.*, no. 28:95-96.
- 3) Oka, S., Nakagome, Y., Honda, T. and Arima, M. (1978). A case of distal 4q trisomy due to familial(4;5)(q31;p15) translocation. *Jap. J. Hum. Genet.*, 23:167-172.
- 4) 中込弥男(1978). 常染色体異常疾患。(外村 晶, 編; 染色体異常の一部を分担), 朝倉書店, 119-120, 122-124, 127-128, 133-137, 142-144, 151-152, 162-164.
- 5) 中込弥男(1978). 染色体領域における最近の知見. *小児医学*, 11:776-813.
- 6) 中込弥男(1978). 猫なき病とその他のB群の異常. *日本臨床*, 36巻, 春季増刊号, 316-317.
- 7) 中込弥男(1978). 遺伝と染色体異常. *小児外科*, 10:9-16.

↓
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
↓

まえがき

通常のコ型分析によつては診断不可能な新しい染色体異常が續々と発見されており、分染分析は染色体検査の常識となつたが、今後の発展のためには、さらに精度の高い方法の開発が必要である。また既存の分染法の内には、手技が著しく複雑なもの、結果が不安定で好結果が得られ難いもの、高価な器機を要するものなども多い。また女性の2本のX染色体を相互に識別し、個々に両親、祖父母などよりの由来・継承を明らかにすることは従来全く不可能であつた。これが実現すると、遣伝相談・染色体地図・Xの不活性化などの領域での大きな進歩が期待される。