

14・2 銀染色法とその臨床細胞遺伝学への応用

京都府立医大公衆衛生

阿部達生

緒言

染色体の仁形成部位 (nucleolus organizer regions, 以下, NoRs と略す) を分染する方法として, Howell 一派 (1975, 1976) は銀染色法を記載した。引き続き Bloom and Goodpasture (1976) はその変法である Ag-As 法, Ag-I 法について記載した。NoRs は 18s および 28s ribosomal RNA に coding する rDNA の局在を示すことが DNA/rRNA in situ hybridization で知られている。

我々もこの銀染色法について検討をすすめてきたので, 方法上の問題点についてのべると共に, その臨床細胞遺伝学への応用について報告する。

方法

Howell らの方法 (以下, Ag-Sat と略す), Ag-As, Ag-I 法を用いて, 相互の比較を行うようにした。材料はヒトリンパ球培養で型のごとくにして得られた染色体標本を用いた (阿部ら, 1975a)。

結果

(1) いずれの方法においても, きれいに染色された標本では各染色体は黄金色に染色され, NoRs は端部着糸型染色体の短腕部に 2 つの黒い点 (dots), 或いは塊 (blob) として観察された。手技上の問題についてのべると, Ag-Sat 法では早く結果が得られ, かつ, 最も美しく染色された。しかし, 再現性に乏しいという欠点をさけることができなかった。瞬時に反応がすすみ, over-staining の結果, 観察に適しなくなることが多かった。この欠点は本法の第 2 段階のところで, 顕微鏡下で進行の状況を把握することで多少克服された。

(2) Ag-As 法は flood lamp を用いないこと以外, Ag-Sat 法と変わらない

が、充分満足するような分染像は得られなかった。

(3) Ag-I法が、失敗することの少ない優れた方法であることを確かめた。しかし、分染像はAg-Sat法より劣っていた。また、50%硝酸銀水をのせて incubate する時間が、Bloomら(1976)によって記載されているような、50℃2~5時間、37℃、18時間という条件ではNoRsが殆んど観察されなかった。原著では上記時間 incubate 後、位相差顕微鏡での観察を行っているが、この方法を用いても我々は十分な成果を得るに至らなかった。然るに50~60℃のオープンで48~72時間 incubate することで、位相差による観察や、後染色を施す必要のない標本を得ることができた。

(4) 次に、NoRsを有する端部着糸型染色体を同定する目的で、Q、G染色→銀染色、銀染色→G-染色といった重染色を用い、dual karyotype 作製について検討したが、トリプシン・ギムザ染色後の標本ではNoRsはほとんどの場合分染されなかった。銀染色が屢々不首尾に終ることを考慮すると、煩雑なQ-染色後、銀染色を施すことも実用的といえないという結論を得た。この点に関して、我々は先に1~2%ギムザ液(メルク、pH 6.8~7.0)で短時間染色するだけで分染像の得られることを報告している(阿部ら、1975b)が、この方法で得た分染された中期細胞を写真撮影後、標本を脱色してAg-I法で銀染色を行い、dual karyotype を作製するのがよい、という結論を得た。

(5) 次に本法を臨床細胞遺伝学に応用し、知り得た興味ある知見について述べる。症例1は母方由来の2/21転座型ダウン症候群である。der(21)染色体では2pter→2p11のsegmentが、No21に転座しており、これは従来のG-染色で容易に識別された。今回、銀染色所見によって、21p12(satellite stalks, NoRs)を含むsegmentがNo21染色体に転座してder(2)を形成しているのが明瞭に示され、患児の核型が47,XY,+der(2);+der(21),t(2;21)(p11;p11)matと同定された(Abe et al,1978b)。症例2は13/14相互転座とr(14)を有する症例であるが、リング染色体は屢々円周のかなりの部分が欠損したopen shape をとり、環状構造を有するかどうか疑問とされていた。銀染色によって、この“欠損”部分はNoR陽性物質で充たされていることが分かり、完全なリングを形成していることが分かった。なお同時にder(13)染色体にも明瞭なdotsが証明された。ギムザ標本

で、この染色体には伸展した achromatic region の証明されなかったにもかかわらず、銀染色所見に基づいて 13p12 或いはそれより distal な部分での切断が証明されたことになる。患児の染色体構成を 46, XX, -13, -4, +der(13), +r(14), rcp(13;14)(p12;q24) と同定した。本症例で、14qter → q24 が単純に No13 に転座したと仮定すると、これに先立つ切断は 1ヶ所になり、DNA の損失は皆無になる。Nos. 13 と 14 から der(13), der(14) が形成され、der(14) の両端で切断がおこり、r(14) が形成されたとすると、都合 four-breaks rearrangement と云うことが出来る。症例 1 で相互転座が明瞭に示されたこと、ならびに、本患児の多彩な臨床症状を参考にすると、後者の可能性が示唆された (Abe ら, 1978 a and -b)。

考 察

仁形成部位染色法としてはすでに Matsui and Sasaki (1973) の N-染色法があるが、銀を用いる方法は比較的簡便である利点を有する。ことに、Ag-I 法は再現性がよく、失敗することの少ない方法と考えられる。この方法は端部着糸型染色体の関与する転座の解析に有用であることは、上述の実例より明らかであろう。この場合、Q-, G- 染色と同一標本上染色できるとき就中有意義である。dual karyotype の作成について我々の方法を述べたが、Q-, G-, C-, R- 染色後 Ag-I 染色が可能という報告もあり (Jantravahi et al., 1977), Zankl and Bernhart (1977), Howell and Black (1978) は銀染色後トリプシン・ギムザによるバンディングに成功している。

また臨用応用に関して、症例 1 のように、明瞭に genetic materials の交換が示されたことは、相互転座の概念を証明したものと見える。同様な症例については Hansmann ら (1977) の報告がある。

要 約

染色体の仁形成部位 nucleolus organizer regions, NoRs を分染する銀染色法の諸手技、Ag-Sat, Ag-As, Ag-I 法について検討をすすめ、方法相互の比較を行った。Ag-Sat (Howell ら) はいちばんきれいに染色されるが、再現性に乏しい。Ag-I 法は染色が完了するまで 48 ~ 72 時間という時間を

要したが、ほぼ満足する結果が得られた。本法が、仁形成染色体の関与する転座の解析にきわめて有意義であることを示すと共に、相互転座においては、微少な染色体 segment も互に交換されるという事実を示した。

文 献

- 1) Abe, T., Misawa, S., Nishioka, K., Okuno, T. and Nakagome, Y. (1978). Formation of a ring chromosome 14 subsequent to the de novo 13/14 reciprocal translocation: A new cytogenetic evidence obtained by the nucleolus-organizer staining. *Ann. Génét.*, 21: 109-112.
- 2) Abe, T., Kawai, K., Misawa, S. and Nakagome, Y. (1978). Silver staining for the analysis of rearrangements of human acrocentric chromosomes. *Proc. Jap. Acad.*, 54 (Ser. B): 451-454.
- 3) Abe, T., Morita, M., Misawa, S., Hattori, A., Nakano, S. and Hojo, H. (1978). Breakages and reunion at the chromosome band 22q11 in somatic cells—its relevance to the genetic role of the Philadelphia chromosome. *Acta Haemat. Jap.*, 41: 141-
- 4) Abe, T., Tada, M., Sano, M., Yamaguchi, K., Ogawa, H., Ide, H., Sonoda, Y. and Arakawa, S. (1978). Supernumerary minute ring chromosome: report on a mentally retarded and malformed boy with 46,XY/47,XY,+r karyotype. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, 87: 945-
- 5) 藺田精昭, 三沢信一, 滝野辰郎, 阿部達生, 川井啓市, 野口光二, 永井清保, 神前昌敏, 原 宏 (1978). 慢性骨髄性白血病における顆粒球系コロニーの細胞遺伝学的検討. *医学のあゆみ*, 105: 216-217.
- 6) 小川博正, 三沢信一, 森田益次, 阿部達生, 川井啓市 (1978). 各種金属化合物による人培養リンパ球姉妹染色分体交換頻度と遺伝毒性に関する考察. *医学のあゆみ*, 107: 584-

- 7) 三沢信一, 沢井公和, 滝野辰郎, 増田正典, 森田益次, 阿部達生, 川井啓市 (1978). 溶連菌製剤ピシパニールと製癌剤の併用による免疫化学療法の臨床的検討法. 癌と化学療法, 5 : 153.
- 8) 阿部達生, 川井啓市, 沢井公和, 三沢信一, 滝野辰郎, 奥田康三, 大川原康夫 (1978). ストロフル腸溶錠に関する臨床薬理学的研究. 第1編. 癌と化学療法, 5 : 747.
- 9) 滝野辰郎, 三沢信一, 川井啓市, 井出透, 阿部達生, 森田益次, 大川原康夫, 奥田康三, 藤井浩, 前川央, 山口希, 山下滋, 白木東洋彦, 辻俊三 (1978). ストロフル腸溶錠に関する臨床薬理学的研究. 第2編. 癌と化学療法, 5 : 751.

↓
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
↓

緒言

染色体の仁形成部位(nucleolus organizer regions, 以下, NoRs と略す)を分染する方法として, Howell 一派(1975, 1976)は銀染色法を記載した。引き続き Bloom and Goodpasture(1976)はその変法である Ag-As 法, Ag-I 法について記載した。NoR's は 18s および 28s ribosomal RNA に coding する rDNA の局在を示すことが DNA/rRNA in situ hybridization で知られている。

我々もこの銀染色法について検討をすすめてきたので, 方法上の問題点についてのべると共に, その臨床細胞遺伝学への応用について報告する。