

## 細分課題 11

### 染色体異常症の診断の精度向上に関する研究

#### 11・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

染色体異常は新生児の約0.5%にみられるが、この値は通常の(非分染)核型分析により検出可能な症例についての集計である。他方分染法の登場以後に初めて診断可能となった異常も多く、さらに最近では分染法によっても検出不可能で、いわば第2・第3世代の精密な分染法により初めて診断可能となった事例さえ知られている。上記はかなり内輪な数字で、まだ見逃がされている異常がかなり多いことになる。

本細分課題は、より分析精度(異常検出能力)が高く、より簡単で失敗の少ない、普及の容易な分染技術の開発と、一部の染色体異常症については臨床診断基準を提案することを目標として研究を続けてきた。染色体異常症の疫学的研究の土台となる研究で、この点をおろそかにした状態でのモニタリングないしサーベイランスの展開は、いわば空中楼閣のごときものと言わねばならない。

#### 研 究 目 的

本細分課題の目標は4種にまとめることができる。イ)精度の高い分染技術の開発、ロ)特に高精度ではないが、簡便で普及の容易な技術の開発、ハ)無数に発表される新技術を追試し、取捨選択と必要により改良を行うことにより、上記のイ)ないしロ)に準ずる目標を達成する、ニ)新しい染色体異常症を、臨床像に基づいて診断する可能性を追及する。最後の項は、分染法が利用できないか、検査可能な例数が限られている第一線病院等において、新しい染色体異常の診断を可能

ないし容易にすることを目的として取上げた。本年度は中込（イ，ロ，ハ），佐々木（イ，ハ），阿部（ハ），黒木（ニ）の割当てで研究を行った。なお異常例の分析に際しては，患者死亡ないし非協力により再度の採血ができず，最終結論が得られぬ場合を経験する。これを避けるためには血液の一部を凍結して保存，必要に応じて培養することができればよい。本年度は佐々木と中込がこの点についての検討を行った。以下本文では，中込担当分について述べる。

## 研 究 方 法

ロ)の目的に対応する「蛍光顕微鏡を用いない簡易蛍光法」については，前年度までに既存の FITC フィルター（以下 fil と略）の利用並びにキナクリン(Q)専用 fil (IF-423)の開発を行ったが，さらに蛍光強度の増加を図るため赤色域に副透過帯を持たない「新型 FITC fil」を考案し，オリンパス光学に具体的な設計と製作を依頼し，試作品のテストを行った。

染色体変異の定量化による検出精度の向上に関しては，既報の LBA 法を用いて，Q ないし C バンド法によっては変異を検出できない染色体対について，変異の検出を試みた。特に面積ないし面積と濃度の積分値を走査型顕微分光光度計により測定し，対照となる染色体の部分との比率を算出し，さらに各変異部分について算出した平均値（12 例）より標準偏差（SD）を尺度としてどの程度離れているか，という基準により変異部分の評価を試みた。すなわち  $\pm 1$  SD 以内が 3（中等度）， $\pm 2$  SD 以内が 2 と 4（小または大），それ以外は 1 と 5（著しく小または大）という分類である。

X 染色体の着糸点については，Q + LBA，Q + LBA + C による検討を昨年までに続けて行った。

血液等の保存については，先ずリンホプレブを用いてリンパ球を分離し，10%にジメチルスルフォキンドを加えた培養液中で種々な期間の凍結保存（ $-80^{\circ}\text{C}$ ）を行った上で，EB ウイルスを用いて長期培養株の樹立を試みた。

## 研 究 成 果

新型 FITC fil の試作品の検討では，従来の FITC fil に比べ約 2 倍の蛍光強度が得られた。また IF-423 に比べても約 50% 明るく，きわめて

優れた特性を持ち、対物レンズに40倍の油浸を使用すれば「蛍光顕微鏡によらない」Q分析が実用に耐えることを示した。

染色体変異の検出に関しては、通常の方法によっては変異を検出できない12対の染色体について、12個体中より計87種の変異(3以外のスコアを示すもの)を検出することができた。各対別に頻度を見ると、2番(3.2%)、5(4.6)、6(8.2)、7(8.5)、8(5.4)、10(5.3)、11(5.5)、12(5.6)、17(9.6)、18(7.5)、19(12.4)、20(11.2)である(何れも染色体の番号とカッコ内は変異を持つ染色体の頻度)。D群、G群等についても、従来の方法に比べ好結果が得られる見通しが得られている。

X染色体の変異現象については、LBA法により1例の女性でヘテロの所見が得られた。なお他の方法による確認を含めさらに検討を行うべく、リンパ球長期培養株の樹立を試みている。

凍結保存したリンパ球より長期培養株を樹立する試みについては、9例中3例で成功した。

## 考 察

新型FITC filは、赤色除去filの併用を必要としないため2倍明るく、またスライドガラス等の傷による影響により分析不能となる細胞が無いなど、優れた特長を持つ。またIF-423より明るい蛍光像が得られる理由については、前者では特異性を高めるため透過帯域の幅を狭く取っており、励起光の波長域が限定されたうえ構成が複雑となり透過率のピークも低下したことが原因と思われる。新FITC filは、蛍光顕微鏡を持たない第一線病院への普及の目的に、極めて適した性能を持つと言わねばならない。

染色体変異については、QないしCバンドなど従来の方法によっては変異の検出ができないか、きわめて困難な(例えばQとCの逐次分析は結果の信頼度に問題があり、成功率も低い)染色体対より、多数の染色体変異を検出することに成功した。変異部分の大きさは対毎に大きな差があり、固定した基準との対比に基づいて大小を判定すると、ある対では平均的な大きさのものが大と判定され、他の対では逆に2ないし1と判定される。言うまでもなく総ての対において、平均的な大きさを持つ変異部は3(中等度の大きさ)と分類され、そ

れより離れるにつれ2と4（小さいし大），さらに1と5（著しく小または著しく大）と判定されるのでなければ，パリ会議方式による5段階の分類の基本的な要件を満していないことになる。我々の方法は，生物学的にも意味のある判定基準を初めて提供し得たと言えるものであり，これが染色体変異の分類に広く採用されることに期待したい。本法により，通常に分染法によっては変異を検出できない染色体対について，不分離や構造異常発生の機構などの解明の途が拓けたことになる。

X染色体の変異については，ヘテロと思われる個体1例を得たが，さらに他の技術によって裏付ける必要があり検討中である。若しこの症例が染色体変異についてヘテロと判定されると，X染色体の不活性化や不分離と先天異常の問題の解決に大きな手掛りが得られることになる。

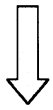
リンパ球の凍結保存後の長期培養については，成功率は低いが可能であることを証明し得た。最終的には80-90%を目標にさらに改良を進めるが，本法が完全に実用化すれば，染色体分析に際し総ての症例のリンパ球を一部保存し，必要に応じて長期（本法）または短期（佐々木）培養を行うことにより，新しい分染法による解析や生化学的検討の必要性に対処することが可能となる。

## 要 約

普及の容易な分染法の開発の目的には，蛍光顕微鏡を用いないQバンド分析法を，ほぼ実用化することに成功した。染色体変異検出法の開発については，LBA法と変異部分の顕微分光光度計による測定，さらに標準偏差を単位として平均値からのズレにより分類する方法により，極めて良好な変異検出力が得られる事を明らかにした。最後の方法は通常にCバンド標本や，顕微分光光度計を用いない場合にも有用であり，広く採用されることに期待したい。Xの変異については，LBA法によりヘテロと思われる症例を経験した。他の方法による確認を試みている。リンパ球の凍結保存後に長期培養株を樹立する試みについては，30%程度の成功率が得られた。応用範囲が広くきわめて有用な技術と思われるので，さらに改良を試みている。

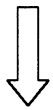
文 献

- 1) Azumi, J., Nakagome, Y., Matsunaga, E. (1979). A new approach in the evaluation of C-positive variants in man. *Jap. J. Hum. Genet.* 24 : 99-104.
- 2) Azumi, J., Nakagome, Y., Matsunaga, E. (1979). Quantitative analysis of C-positive variants in man. *Ann. Rep. Nat. Inst. Genet.* No. 29 : 82-83.
- 3) Akatsuka, A., Nishiya, O., Kitagawa, T., Kageyama, A., Inana, I., Nakagome, Y. (1979). Trisomy 9 mosaicism with punctate mineralization in developing cartilages. *Eruop. J. Pediat.* 131 : 271-275.
- 4) Inouye, T., Matsuda, H., Shimura, K., Hamazaki, M., Kikuta, I., Iinuma, K., Nakagome, Y. (1979). A ring chromosome 9 in an infant with malformations. *Hum. Genet.* 50 : 231-235.
- 5) 中込弥男 (1979) 染色体検査法. 周産期医学. 9 : 1443-1448.
- 6) 中込弥男 (1979) 遺伝. 小児内科. 11 : 1779-1783.
- 7) 中込弥男 (1979) 性染色体. 半陰陽のすべて (鈴木雅州・坂元正一監修). 南江堂, 東京, 21-31.
- 8) 中込弥男 (1979) 遺伝相談. 今日の治療指針. 医学書院, 東京, 612-613.



## 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



### 要約

普及の容易な分染法の開発の目的には、蛍光顕微鏡を用いないQバンド分析法を、ほぼ実用化することに成功した。染色体変異検出法の開発については、LBA法と変異部分の顕微分光光度計による測定、さらに標準偏差を単位として平均値からのズレにより分類する方法により、極めて良好な変異検出力が得られる事を明らかにした。最後の方法は通常のCバンド標本や、顕微分光光度計を用いない場合にも有用であり、広く採用されることに期待したい。Xの変異については、LBA法によりヘテロと思われる症例を経験した。他の方法による確認を試みている。リンパ球の凍結保存後に長期培養株を樹立する試みについては、30%程度の成功率が得られた。応用範囲が広くきわめて有用な技術と思われるので、さらに改良を試みている。