

1 1・2 染色体研究法の開発とその応用に関する研究

北海道大学理学部

佐々木 本 道

ま え が き

我々は先に染色体上の仁形成部位(NOR)を特異的に染め分ける新しい方法を開発し、これをNバンド法と名づけたが、その後より効率のよい方法として銀染色法が発表され広く使われている。しかしながら、銀染色法にも難点があり、とくに標本の周辺部と中心部の染色性が一様でなく、NOR以外の部位や細胞質に銀粒子が付着したり、NORの染色性が細胞により異なり、微小なNORの検出率が低下するなど、問題がある。そこで、より簡便で再現性の高い方法を考案し、実用化した。

染色体検査にもっとも広く使われている末梢血リンパ球培養法は皮膚組織培養法よりもはるかに容易で、成功率も高いが、長期培養株をつくることは必ずしも容易でなく、一般的でない。そこで、少量の血液を凍結保存し、必要に応じてそれを取り出して染色体検査する方法を考案した。この方法は簡便であり、再検査のために患者を呼び出す必要がないばかりでなく、患者が死亡して再検査不能の場合、検体の輸送、多数の検体を一時に処理できない場合などにも有効である。

研 究 目 的

簡便にして実用性があり、再現性の高い分染法を開発し、染色体検査に役立てる。凍結保存した血液により染色体分析をする方法を確立し、実用に供する。

研究方法および成果

1. 仁形成部位染色法の改良

従来の銀染色法は硝酸銀溶液をカバーガラスでマウントし、染色体標本と接触させているが、この方法ではカバーガラスの周辺部と中心部とで反応が異なり、染色にいちじるしいむらができる。この欠点をなくすためにカバーガラスの代りにナイロンメッシュを用いたのが今回の改良法の特長である。ナイロンメッ

シュとしては、細胞分別用フィルターとして市販（共進理工，東京）されているもので， 94μ および 148μ のサイズのものおよびスイス製（Swiss Silk Bolting Cloth Mfg. Co. Ltd., Zürich），商品名 Nybolt（polyamid monofil）， 90μ ， 150μ ， 225μ ， 300μ ， 500μ ，についてテストした。使用した細胞は，ヒトの血液培養，エールリッヒ腹水癌細胞，AKR マウス白血病細胞，ラット肺培養細胞で，標本は通常の air-dry 法により作製した。

染色法

1) スライド上に 50% Ag NO₃ 水溶液を滴下し，その上に同溶液に浸したメッシュをかぶせる。

2) 蒸留水を入れた密閉容器中にスライドを直接水にふれないようにして静置する。

3) 50°C で 1～2 時間，または 37°C で 3～6 時間放置（恒温器使用）。

4) メッシュが黄褐色に染まってきたら蒸留水で十分に洗い流し，3% ギムザ液で 30～60 秒染色し，水洗，乾燥する。

148μ ， 50°C ，2 時間または 148μ ， 37°C ，4 時間の組み合わせの時がもっともよい結果が得られた。スライドは一様に染まり，背景に銀粒子があまり出ず，染色体の形もくずれない。銀染色した染色体標本を写真撮影した後，カルノア液で脱色し，キナクリン蛍光法で再度観察することもできる。この連続法は成功率が高く，実用的である。NOR の検出率はきわめて高く，細胞によるばらつきはほとんどない。従来の方法はマウスの Cバンドが同時に染まり易く，Nバンドとまぎらわしい欠点があるが，この方法ではその欠点が解消された。

2. 凍結保存血液培養法による染色体分析

ヒトのリンパ球の凍結保存法に関してはすでにいくつかの報告があるが，ここでは染色体検査のために簡便で有効な方法を確立することを目標とした。血液は通常の方法でヘパリン採血し，10% 牛胎児血液と PHA を加えたイーグル MEM 培地で 3 日間培養し， $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$ コルセミドで 1.5 時間処理した後，低張液前処理空気乾燥法により標本を作製，ギムザ染色し，1,000～2,000 細胞を数えて分裂頻度（%）を比較した。凍結保存液には 10% の DMSO ま

たはグリセリンと10%牛胎児血清を含むMEMを用いた。保存液は1アンブル当たり1mlとし、この液中に4℃で30～60分なじませた細胞を液体窒素槽の気相中に保存した。解凍は37℃の恒温水槽中で速やかに行ない、保存液をMEMで2、3回洗い、上記の方法で培養した。

培養法にはもっとも簡単な全血培養(9mlの培養液に1mlの全血とPHA 0.1mlを加える)とLymphoprep(Nyegaard & Co. As. Oslo)又はPHAによって分離したリンパ球の培養を用いた。

現在までに30検体を種々の条件で凍結し、その結果次のようなことがわかった。

1) 一般に全血培養の方が良好な結果が得られ、分離リンパ球は凍結保存しないものでも分裂頻度が低いことがあり、好ましくない。

2) 凍結保存液はグリセリンよりもDMSOを用いた方がはるかに優れている。

3) 凍結保存期間は数日から1年間までしらべたが、結果は同様である。

4) 全血または分離リンパ球を直接凍結保存するよりも、PHAを加えた培地で1～3日培養したものを保存した方が分裂頻度がはるかに高い。このことは重要な発見である。1日培養後に凍結した場合には解凍後2日間、2日および3日培養した時には1日間培養した後標本を作る。表1は全血を1～3日間PHAを加えて培養した後、DMSO法で1年間凍結保存した場合の1例で、対照として同じ検体を凍結しないで3日間PHA培養した場合のものと比較したものである。()内は解凍後培養せずに1.5時間コルセミド処理のみとした時の分裂頻度を示す。

5) PHAによって分離したリンパ球は分離後直ちに凍結保存した場合でも良好な結果が得られたので、必ずしも培養してから凍結しないでも、PHAで刺戟しただけで耐凍性または解凍後の培養増殖性が增大する可能性がある。これに関しては現在追試中である。

6) ダウン症3例、急性白血病患者の寛解期1例の全血を直接または1～3日培養してから凍結保存したところ、いずれの場合も凍結しない対照よりも高い分裂頻度を得た。この原因は不明であるが、きわめて興味ある現象である(表2)。

考 察

NOR 分染法の改良はD群およびG群染色体が関与する異常染色体の同定、識別や切断点の解析などに多大の利用価値があるばかりでなく、先天異常や癌化などに関連してリボソーム蛋白の形質発現がどのような役割を持っているかというような基本的な問題を解明する上でも重要な手がかりを与えるものと考えられる。凍結保存血液による染色体分析法の効用ははじめに述べたのでくり返さないが、すでに1年間以上の保存が可能となり、その方法もきわめて簡単であることから、今後は大いに利用されるものと信ずる。保存条件を基準化して臨床検査に役立てたいと考えている。また、ダウン症や白血病患者のリンパ球が凍結保存により高い増殖性を示すことは新しい問題として再検討して行くつもりである。

要 約

カバーガラスの代りにナイロンメッシュでマウントすることにより、仁形成部位の分染法を改良し、簡便にして再現性が高く、均一化された方法とした。

凍結保存した少量(1 ml)の血液を培養して染色体分析に供する方法を確立した。

表1. 1年間凍結保存した全血培養における分裂細胞の頻度(%)

| № | 対照 | 凍結前の培養日数 | | |
|---|-----|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 4.7 | 2.8 | | |
| 2 | 6.1 | 4.2 | | |
| 3 | 2.3 | | 3.7(0.2) | |
| 4 | 7.0 | | 1.5(0.2) | |
| 5 | 3.7 | | | 3.6(1.0) |
| 6 | 5.9 | | | 2.7(0.6) |

表2. ダウン症および白血病患者血液の凍結保存成績(分裂頻度%)

| № | 対照 | 凍結期間 | 凍結前の培養日数 | | | |
|-------------|-----|------|----------|-----|-----|-----|
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| <u>ダウン症</u> | | | | | | |
| 1 | 3.9 | 13日 | 8.6 | | | |
| 2 | 2.1 | 12月 | | | 8.7 | |
| 3 | 2.5 | 13月 | | | | 3.3 |
| <u>白血病</u> | | | | | | |
| 1 | 5.0 | 11日 | 8.4 | 8.1 | | |
| | | | 6.2 | 8.5 | | |



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

カバーガラスの代わりにナイロンメッシュでマウントすることにより,仁形成部位の分染法を改良し,簡便にして再現性が高く,均一化された方法とした。凍結保存した少量(1ml)の血液を培養して染色体分析に供する方法を確立した。