

11・3 同調培養法による high resolution 染色体バンド

京都府立医大・第三内科

阿部達生

はじめに

1970年以降、染色体分染法の開発と相俟って、それまで予想もされなかったような、構造異常を主とする染色体異常の報告が相次いだ。分染法が登場する以前に確立された染色体異常症候群はダウン症候群など12種を数えるに過ぎなかったが、1978年、中込の集計によると、9pトリソミーなど(部分的)過剰を示す疾患66種、同じく13q-症候群や環状染色体など(部分的)欠失を示す疾患53種が新に同定されている。

私は1977年度、BudR前処理後Q-染色、G-染色、AO-染色を行う方法やCd-染色について検討をすゝめ、9pテトラソミーの同定を行った。この症例の同定は従来の分染法のみでは不可能である。1978年度、仁形成部位を分染する銀染色法について検討したが、本法も従来の分染法では同定できない微細な異常を解明することのできる優れたものである。

このように、新しい染色体分染法の開発は、新しい染色体異常症の発見につながる可能性を伴ってきた。しかし一方、濃度600個のバンドを有する分裂中期細胞で発見される染色体異常症は、すでに限界にきているともいわれ、これよりもはるかに多くのバンドを有する分裂前期細胞での染色体異常の解析に大きな関心が寄せられはじめた。

研究目的

このような点に鑑がみ、またPHA刺激リンパ球を同調培養することで、微細な解析に適する分裂前期細胞が効率よく収獲されるとの報告(Yunisら、1976、1978)があるので、この新しい手技の検討を行うことを目的とした。

方 法

末梢リンパ球および骨髄細胞（正常，および白血性）を材料とした。

末梢血 0.2 ml を 20% FCS 加 RPMI 1640 5ml, PHA(wellcome) 0.1 ml のメディウムで培養した。同調は Yunis ら (1976) のメソトレキセート (MTX) を用いる方法と, 1962年, Xeros の報告している過剰チミジン (TdR) を用いる二法で行った。

培養開始 48 時間後, 終濃度 10^{-7} M の MTX あるいは, 10^{-8} M の TdR を 20 時間前後作用させる。洗浄後, 10^{-8} M の TdR を 5 時間 15 分から 6 時間作用させた。リンパ球の場合, コルセミド (終濃度 $0.08 \mu\text{g/ml}$) を 15 分間, また, 骨髄細胞では, 終濃度 $0.06 \sim 0.30 \mu\text{g/ml}$ のものを 15 分から 2 時間作用させた。リンパ球は 0.075 M KCl で 15 分間, 骨髄細胞は 1 時間低張処理後, メタノール酢酸で型の如く固定, 予め冷却しておいたスライド・ガラスに細胞を滴下し, 70°C の温風ですみやかに乾燥させた (阿部ら, 1976)。G-染色は Nakagome ら (1973) の方法により, 7 日間室温に放置した標本に施した。

結 果

1. それぞれの標本につき, 分裂指数 (M.I.) を調べると共に, 分裂細胞の種類を A) Prophase (early, mid, late), B) prometaphase, C) metaphase (early, mid, late) に分け, それぞれの頻度を調べてみた。

MTX 同調群リンパ球の M.I. は $3.0 \sim 3.4\%$ (control: $2.2 \sim 4.3\%$), TdR 同調群リンパ球の M.I. は $3.3 \sim 4.0\%$ (control 2.2%) であり, 同調群が対照に較べ M.I. の有意の上昇を示すという結果は得られなかった。しかし, 分裂像のタイプには両者に大きな差異が見出された。すなわち, MTX 群で, M.I. の $1.2 \sim 2.0\%$ が (A) に, また $0.7 \sim 1.5\%$ が (B) に属したのに, 対照群では (A) が $0.3 \sim 0.4\%$ (B) が $0.1 \sim 0.3\%$ にすぎなかった。すなわち, 対照群ではほとんどが (C) に属するものであった。TdR 同調群でもほぼ同じ結果が得られ, MTX による同調の場合と較べ差異はなかった。

次に骨髄細胞についてのべると, M.I. が, 同調群で $0.3 \sim 0.6\%$ (対照

0.0～0.2%)であり、対照群に較べ、分裂指数がかなり高まるという結果が得られた。しかし、分裂像で、(A)、(B)に属するものはほとんどなく、大部分が(C)に分類されるものであった。これはコルセミドの作用時間に関係を有すると思われる。

2. Prophase 細胞の同定に際して克服しなければならない2つの問題点に直面した。1つは同一核板の中で染色体同志の重なりのないものは稀ということである。第2点は、動原体の位置が不鮮明になり、これが個々の染色体の同定を困難にすることである。従って、現時点では46個の染色体を識別するのに可成りの熟練を要した。

この点で、パリ規約でのバンドの消長を段階的に follow し、バンドの細分化について検討をすゝめた結果、これまでのバンドのほゞ3倍にあたる1600個のバンドの同定が可能になった。

考 察

MTX, excess TdR のいずれかを用いる方法でも、分裂指数は必ずしも上昇しないが、分裂前期細胞の占める頻度が飛躍的に高まるという結果が得られた。また骨髓細胞では、ことに白血病細胞では分裂指数の低い点に問題があったが、同調法の応用で、これが増加するという結果が得られた。

Yunis ら(1978)は、MTXによるリンパ球の同調で得られる細胞で、Paris 規約(1971)に記載されたバンドの実に4倍のバンドを同定している。当然、従来に分染法で発見できなかった、微細な構造異常にもとづく新たな染色体異常疾患が、今後本法によって同定される可能性が示唆される。Retinoblastoma での13q14バンドの欠失の有無などその1例であろう。Yunis(1978)がのべているように、終極的に、それは、染色体と遺伝子の大きな隔たりをうめていくものでないかと考えられる。

我々はこれまで、顆粒球系コロニー(CFU-C)の染色体分析について検討をすゝめてきた。この方法が、PHAで末梢リンパ球を刺激し、染色体標本を作製する従来の末梢血培養法に類似点を有する点に着目し、これにMTXによる同調法を応用したところ、興味ある知見が得られた。すなわち、幹細胞疾患の染色体分析は専ら骨髓直接法に依存していた。

しかし、今回の方法を用いると、これよりはるかに満足すべき、分析に適する分裂像の得られることがわかった。これも同調法の利点に数えられよう。

要 約

メソトレキセート (MTX) や過剰チミジン (excess TdR) を用いて、培養リンパ球や骨髄細胞で、微細な分析が可能な分裂前期細胞を効率よく収獲する方法について検討した。

今回の実験で、Paris 規約 (1971) に記載されたバンドの約3倍のバンドを同定した。本法の応用により、従来は原因不明とされていた心身障害児の内から、染色体の微小な変化に基づく症例が相次いで同定されるものと期待される。

文 献

阿部達生, ほか: Prometaphase 細胞の解析で知られる Ph¹ 染色体の微細構造, 医学のあゆみ (in press)



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

メソトレキセート(MTX)や過剰チミジン(excessTdR)を用いて,培養リンパ球や骨髄細胞で,微細な分析が可能な分裂前期細胞を効率よく収獲する方法について検討した。

今回の実験で,Paris規約(1971)に記載されたバンドの約3倍のバンドを同定した。本法の応用により,従来は原因不明とされていた心身障害児の内から,染色体の微小な変化に基づく症例が相次いで同定されるものと期待される。