

# 凍結保存血液による染色体分析法とア クリジンオレンジ高精度分染法の開発

中 込 弥 男

松 原 貴 子

(国立遺伝学研究所人類遺伝部)

横 地 常 広

(静岡県立こども病院検査科)

最近の分染法のなかには、培養途中での薬品添加や特殊な培養液の使用を必要とするものが増えてきている。初回の分析の結果に応じて分染法による解析を追加する場合に、未染のプレパレートや固定済みの細胞の保存では、充分に対応できないのである。初回の培養が不成功である場合も同様で、培養可能な生きた細胞の保存が必要である。ただし多数例の分析に際し全症例に応用するためには、方法が簡単で、高価な試薬や設備を必要とせず、しかも成功率が高いことが望ましい。今回われわれは、これらの条件を総て満たす凍結保存法の開発に成功した。

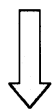
型のごとく静脈血（ヘパリン加）10ml を無菌的に採血，1ml 宛小試験管（以下コルセミド投与まで総て無菌的に行う）に分注する。対照として凍結せずに培養するもの2～3本を残し，他の小試には凍結用液（以下 FM）を等量宛加える。FM は RPMI-1640 培養液に牛胎児血清とジメチルスルフォキシド（DMSO）を各20%加えたものである。小試は-80℃のフリーザーにそのまま入れ，必要な期間凍結保存する。融解は37℃の恒温水槽に小試を浸すことにより迅速に行い，血清入りの培養液で2回洗浄，10mlの培養液（牛胎児血清20%）に沈渣を浮遊させ，PHA（0.3ml）を加えて培養する。以後の操作は通常の血液培養と同一である。12個体より計64本の小試に血液 1ml宛を分注，上記の方法により凍結・融解後に染色体分析を行ったところ，56本（約88%）で分析が可能であった。症例あたり2～3本を凍結すれば，ほぼ確実に結果が得られることになる（詳細は，中込他，印刷中）。

高精度分染法としては，現在 Yunis 法が多く使われているが，培養中の細胞を37℃に保ったままで遠沈するなど特殊な設備を要し，手技も複雑で成功率も低い。より簡便で成功率も高い技術を開発する目的で，アクチノマイシン D，BrdU，臭化エチジウム，アクリジンオレンジ（AO）などの投与を試みたところ，AO でかなりの伸長効果（分裂前期における染色体の短縮阻害）が得られることが分かった。さらに条件を詰め，標本作製前1時間にコルセミド添加（0.025  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），その30分後に AO（20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加するという実に簡便で有効な方法の開発に成功した。標本作製に関しては，低張処理を通常の3～4倍に延長するのが唯一の変更点である。この方法により haploid set（1～22及×1本）あたり，850～900バンドまでの識別が

可能であった（詳細は，松原・中込，投稿済）。

## 文 献

- 1) Nakagome, Y., Yokochi, T., Matsubara, T. and Fukuda, F.: Preservation of whole blood for chromosome analysis. Cytogenet. Cell Genet. in press.
- 2) Matsubara, T. and Nakagome, Y.: High-resolution banding by treating cells with acridine orange before fixation. submitted.



## 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



最近の分染法のなかには,培養途中での薬品添加や特殊な培養液の使用を必要とするものが増えている。初回の分析の結果に応じて分染法による解析を追加する場合に,未染のプレパレートや固定済みの細胞の保存では,充分に対応できないのである。初回の培養が不成功である場合も同様に,培養可能な生きた細胞の保存が必要である。ただし多数例の分析に際し全症例に応用するためには,方法が簡単で,高価な試薬や設備を必要とせず,しかも成功率が高いことが望ましい。今回われわれは,これらの条件を総て満たす凍結保存法の開発に成功した。