

## 染色体分析のための血液凍結保存法及び高精度分染法の開発・改良と実地への応用

中 込 弥 男  
(国立遺伝学研究所人類遺伝部)

血液培養による染色体分析に際し全血の一部を凍結保存し、必要に応じて再度の培養を行う技術については、昨年度にその概要を報告したが、本年度は凍結手順をさらに簡便化し、他の目的にリンパ球を使用する場合を除き全検体の凍結保存を行うところまで進めることができた。数 $ml$ の血液を得た場合、通常2本の培養(各5~10 $ml$ )をスタートする。残りの血液に等量の培養液(DMSOを20%の割に加えたRPMI-1640、仔牛血清を15%含むが、日常の培養に使用するものと同一組成であり、DMSOの添加のみが異なる)を加え、そのまま $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに投与する。要するに余った血液を捨てる代わりにフリーザーに保存する訳で、これ以上簡単な技術は考えられないであろう。融解と培養のステップについては、昨年までと特に変わることはない。過去1年間に解凍して培養した9例では、1例を除き総て培養に成功した。テスト目的での凍結を含めると、74検体中65検体の成功率である。ただしテスト用は全血1 $ml$ のみを用いているので、実際の症例(数 $ml$ など量が多い)では、さらに成功率が高いと思われる。なお最近不成功であった1例では、採血当日の培養も3本総てが不成功に終わっており、患者のT系リンパ球に問題があると推定された(詳細は Nakagome et al. 1982)。

なお解凍後の沈渣を用い、EB ウイルスを用いてリンパ系細胞株の樹立を試みたところ、2例で何れも成功、生化学的検索を目的とする場合などに有用と思われる。

、アクリジンオレンジ高精度分染法については、昨年報告した条件における分裂頻度の低下を避けるため種々な条件を検討したところ、コルセミド90分(0.03 $\gamma/ml$ )、AOは10 $\gamma/ml$ で最後の30分間という組み合わせが、最も良いことが分った(詳細は Matsubara and Nakagome, in press)。この方法を実地に応用した結果、Wilms 腫瘍と無虹彩症の合併4例の総てと無虹彩のみの1例で、11番短腕の微小な欠失を検出した。他に Prader-Willi 症候群についても15qのごく小さい欠失を検出し、本法の有用性を裏付ける結果となった。

なお染色体の構造異常の発生に際しての切断点に関し、著者らの淡バンド説と、Dutrillauxら、Bucktonらの濃淡境界説が対立していたが、特殊な構造異常を用いることにより、この問題に結着をつけることに成功した。これらの症例のうち一部の解析、その他構造異常の解析に本法を応用したところ、きわめて有効であった(Nakagome et al. in press, Matsubara et al. 1982, Nakagome 1982)。なおDNAに著明な親和性を示す種々な螢光色素についても検討を進めているが、沃化プロピジウムはAOに比べて著しく効果が劣った。

今年度は、新しいアプローチにより分析精度の向上を図るため、組み換え DNA またはその周辺技術の染色体分析への応用を目的とする研究を開始した。まず性分化異常患者の性腺の解析に使用する目的で、男性特異 DNA の probe の作製を試みているが、抽出した DNA を制限酵素 Hae III で消化、アガロースゲルで泳動するところまで終り、nick translation と分子雑種形成のステップは、特定染色体に基づく遺伝子ライブラリーの樹立などの関連テーマとともに、今後の課題として残すこととなった。

#### 発 表 文 献

- 1) Nakagome, Y. and Matsubara, T. : High-resolution banding. A very simple procedure. *Ann. Nat. Inst. Genet.*, **31** : 103~104, 1981.
- 2) Nakagome, Y., Yokochi, T. and Matsubara, T. : Preservation of whole blood for chromosome analysis. *Cytogenet. Cell Genet.*, **33** : 254~255, 1982.
- 3) Nakagome, Y. : Inactivation centers in the human X chromosome. *Amer. J. Hum. Genet.*, **34** : 182~194, 1982.
- 4) Matsubara, T., Nakagome, Y. et al. : Maternally transmitted extra ring 21 chromosome in a boy with Down syndrome. *Hum. Genet.*, **60** : 78~79, 1982.
- 5) Nakagome, Y., Matsubara, T. and Fujita, H. : Distribution of break points in human structural rearrangements. *Amer. J. Hum. Genet.*, **35** : in press.
- 6) Matsubara, T. and Nakagome, Y. : High-resolution banding by treating cells with acridine orange before fixation. *Cytogenet. Cell Genet.*, 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



血液培養による染色体分析に際し全血の一部を凍結保存し,必要に応じて再度の培養を行う技術については,昨年度にその概要を報告したが,本年度は凍結手順をさらに簡便化し,他の目的にリンパ球を使用する場合を除き全検体の凍結保存を行うところまで進めることができた。数 ml の血液を得た場合,通常 2 本の培養(各 5~10ml)をスタートする。残りの血液に等量の培養液(DMSO を 20%の割に加えた RPMI-1640,仔牛血清を 15%含むが,日常の培養に使用するものと同一組成であり,DMSO の添加のみが異なる)を加え,そのまま - 80 のフリーザーに投与する。要するに余った血液を捨てる代わりにフリーザーに保存する訳で,これ以上簡単な技術は考えられないであろう。融解と培養のステップについては,昨年までと特に変わることはない。過去 1 年間に解凍して培養した 9 例では,1 例を除き総て培養に成功した。テスト目的での凍結を含めると,74 検体中 65 検体の成功率である。ただしテスト用は全血 1ml のみを用いているので,実際の症例(数 ml など量が多い)では,さらに成功率が高いと思われる。なお最近不成功であった 1 例では,採血当日の培養も 3 本総てが不成功に終っており,患者の T 系リンパ球に問題があると推定された(詳細は Nakagome et al. 1982)。