

染色体検査の院内導入に向けての検討

大 棟 久美江 川 口 貴 子 黒 山 祥 文
大 畑 雅 彦

静岡赤十字病院 検査部

要旨：染色体検査の院内導入に向け、良質な細胞分裂中期像を得るための細胞培養、細胞収穫条件について検討を行った。培養条件は、RPMI 1640 に添加する牛胎仔血清を 10% と 20% で検討した。分裂中期像の数、展開面積は差がなく、コスト面も考慮し、10% 牛胎仔血清加培養液で十分であると判断した。培養時間は検体採取後（当日）、24 時間培養、48 時間培養の 3 条件で検討した。個々の症例間の差が大きく、細胞周期を考慮し、このうちの 2 条件で実施するのが効率的であると考えられた。コルセミドの添加量 (10 μ l, 20 μ l, 50 μ l)、作用時間 (24 時間, 2 時間) の検討では、分裂中期像の数と展開面積の比較結果よりコルセミド添加量 20 μ l、作用時間は 2 時間で安定した結果が得られた。また 0.075 M KCl 低張処理回数については回数を増やすことで細胞収穫量が減少する為、その回数は 1 回、37°C 20 分と設定した。ギムザ分染の条件は、標本作製後過酸化水素によるエイジングを行い、0.025% 粉末トリプシン/ハンクス液処理後 1% ギムザ染色を用いることにより、コントラストの良好なバンド分染が可能となった。さらに、画像解析装置、ハナビ（展開装置）の導入により人為差を削減し、より迅速な結果報告が可能となり、核型の解析と報告における省力化に効果があった。

Key words：染色体分析、細胞分裂中期像、培養時間、細胞収穫、ギムザ分染

I. はじめに

造血器腫瘍のほとんどが、染色体遺伝子変異によって発生することが明らかとなり、造血器腫瘍の検査では、形態学的検索、細胞表面マーカー検索に加えて、染色体及び遺伝子学的解析により診断がなされるが、これらの所見は、治療の選択や予後推測因子としても用いられている。その中でも造血器疾患における染色体核型解析では、多種多様な染色体異常が観察される。造血器疾患の直接的な引き金となるものとしては相互転座、欠失が多いが、腫瘍の進行とともに二次的に発生するものには染色体数の変化や染色体部分の付加、欠失などの変化も見られる²⁾。遺伝学的異常の明らかな場合のみ活用できる polymerase chain reaction (PCR) 法や fluorescence in situ hybridization (FISH) 法とは異なり、種々の染色体異常を判断ができる核型分析は、

極めて臨床上有用な情報を提供できる。

染色体検査においては、検体（骨髄液、末梢血、リンパ節）を培養し、腫瘍細胞を高率に有糸分裂に導入することで異常細胞の核型解析を可能なかぎり正確に行うことが求められる。よって、良質な分裂中期の細胞をより多く集め、良好な細胞固定と染色による標本作製が、正確な結果解析になくはならない作業である。今回、我々は正確に、より迅速な結果報告を行うために培養の条件、コルセミド処理、KCl による低張処理、G 分染法の各条件について基礎的検討を行った。

II. 対象および方法

1. 対象

2004 年 1 月以降に、採取された骨髄液（ヘパリン採血）13 検体（表 1）、低張処理の検討には健康成人の末梢血液（ヘパリン採血）を用いた。

表 1 対象症例

case	age	F/M	diagnosis	染色体核型	[分析細胞数]
1	68	M	慢性骨髄性白血病	A:46,Xydel(20)(q11q13.3) B:46,XY	[1] [19]
2	61	M	骨髄異形成症候群	A:45,X-Y B:46,XY	[2] [18]
3	33	M	急性リンパ性白血病	46,XY	[20]
4	79	F	巨赤芽球貧血	46,XY	[20]
5	62	F	悪性リンパ腫	A:44,X,der(X)t(X;1)(q22;q21),add(3)(q27),add(5)(q15), del(6)(q23),del(6)(p23),del(6)(q?),i(11)(q10),add(19)(q13) -21,-22 B:44,idem,+add(6)(p21),-del(6)(p23) 46,XY	[13] [7] [20]
6	68	M	骨髄異形成症候群	46,XY	[20]
7	48	M	慢性骨髄性白血病	A:46,XY,t(9;22)(q34;q11) B:46,XY	[19] [1]
8	37	M	急性骨髄性白血病	46,XY	[20]
9	26	F	前骨髄急性白血病	46,XY	[20]
10	70	M	リウマチ	A:47,XY+Y B:46,XY	[2] [18]
11	68	M	慢性骨髄性白血病	46,XY	
12	17	M	急性骨髄性白血病	A:46,XY,inv(16)(p13q22) B:47,idem,+8	[2] [18]
13	29	M	急性リンパ性白血病	A:46,XY,t(9;22)(q34;q11) B:46,idem,der(21)t(1;21)(q21;q22) C:46,idem,der(11)t(1;11)(q12;q23) D:46,XY	[5] [9] [1] [5]

2. 方法

染色体核型分析の手順を図1に示す。その過程の中で、良質な細胞分裂中期像 (metaphase) の収量に影響をあたえる細胞培養及び細胞処理の条件を以下に示す項目で検討した。

1) 牛胎仔血清 (FBS : Fetal Bovine Serum ; Qualified USA) 添加濃度の検討

10%FBS 加 RPMI Medium 1640 (RPMI 1640) と 20%FBS 加 RPMI 1640 に各々細胞数 1×10^6 個 / 5 ml に調整し、5%CO₂ 37°C 24 時間培養にて比較検討した。

2) 培養時間の検討

10%FBS 加 RPMI 1640 に細胞数 1×10^6 個 / 5 ml に調整し、5%CO₂ 37°Cにて培養 2 時間(直後 : 当日)、24 時間、48 時間、72 時間の 4 条件にて検討した。

3) 分裂促進剤 (PHALCM ; phytohemagglutinin stimulated leukocyte conditioned medium) 添加の検討

10%FBS 加 RPMI 1640 に細胞数 1×10^6 個 / 5 ml 調整時に PHALCM を 20 μ l 添加と無添加の 2 条件で、5%CO₂ 37°C 24 時間培養を行い検討した。

4) 紡錘糸形成阻害剤 (コルセミド ; Karyo MAX-Colcemid Solution) 作用条件の検討

10%FBS 加 RPMI 1640 に細胞数 1×10^6 個 / 5

ml に調整し、5%CO₂ 37°C、24 時間培養後コルセミド 20 μ l 添加 2 時間培養、コルセミド 50 μ l 添加 20 分培養と 2 時間培養、コルセミド 10 μ l 添加 24 時間培養の 4 条件にて検討した。

5) 低張処理 (0.075 M KCl) の検討

10%FBS 加 RPMI 1640 に細胞数 1×10^6 個 / 5 ml に調整し、5%CO₂ 37°Cにて 24 時間培養後、細胞液を 1500 rpm、8 分間遠心し、上清をアスピレーターにて吸引後、約 0.075 M KCl を約 9 ml を加え沈渣を均一になるようにいねいにピッペティングし

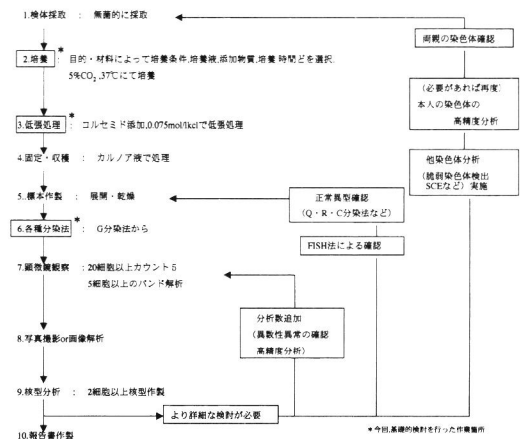


図 1 染色体検査の流れ (文献 2 より引用)

た。以上の 0.075 M KCl 処理を 3 回, 2 回, 1 回 + 攪拌, 1 回の 4 条件で行い, 技師 2 名で個人的な手技の影響も含めて検討した。

以上 1)~5) の検討については, 各々の条件で作製した標本を光学顕微鏡 (×100) で観察し, 全視野の metaphase 数をカウントし比較した。

6) ギムザ分染 (G 分染: G-banding) の検討

10%FBS 加 RPMI 1640 に細胞数 1×10^6 個/5 ml に調整し, 5%CO₂ 37°C にて 24 時間培養後, コルセミド処理, 0.075 M KCl 低張処理, 固定・細胞収穫後に作製した標本を種々の条件 [エイジング処理, トリプシン処理, PBS 緩衝液 (PBS buffer) の水素イオン指数 (pH), ギムザ染色液の濃度] について検討した。標本を観察し, 核型の膨化と分染の良否を比較した。まず膨化については図 2 に示すように膨化 (+), 膨化 (+/-), 膨化 (-) の 3 つのパターンに分類して評価した。また, 分染については metaphase を油浸系強拡大 (対物レンズ ×100) で観察し, 1 番染色体の長腕 3 のバンド (1q3) の分染の様子により, コントラスト良好なもの (+), コントラストやや不良 (+/-), コントラスト不良 (-)

とし比較した。

III. 結 果

1. FBS 添加濃度 (図 3)

培養液中の FBS 添加濃度 10% と 20% を実際の骨髓穿刺骨髓液 4 症例にて検討した。metaphase 数は, 4 症例とも 10% に比し 20% で多く展開の良い metaphase が観察される傾向があった。

2. 培養時間の検討 (図 4)

5 症例 (症例 5~9) について検討を行ったが, 細胞数の都合で各々 2 条件にて培養を行った。metaphase 数の比較では, 症例 6~9 においては差は認められなかったが, 症例 5 では直後当日 (2 時間培養) と 48 時間培養の metaphase 数がそれぞれ 18 個と 183 個と約 10 倍の metaphase 数の差がみられた。また, 症例 5 において培養 2 時間で観察された metaphase は 46, XX の分裂細胞がほとんどであったのに対し, 培養 48 時間では 44, X, der(X) t(X; 1)(q 22; q 21), add(3)(q 27), add(5)(q 15), del 6(q 23), del(6)(q?), i(11)(q 10), add(19)(q 13), -21, -22 と明らかな異常核型が検出された

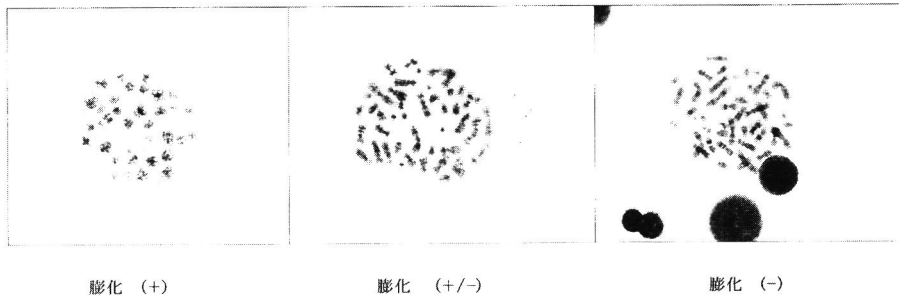


図 2 膨化判定 (G 分染 ×1000)

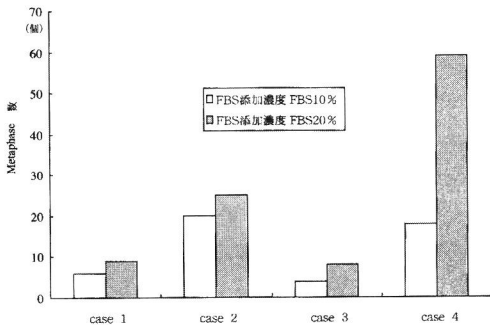


図 3 FBS 添加濃度

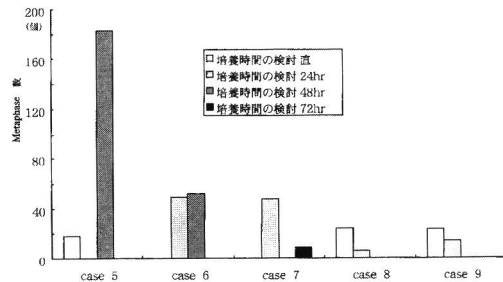


図 4 培養時間の検討

(図5). 他の症例においては, 培養時間で一定の傾向は見られなかった.

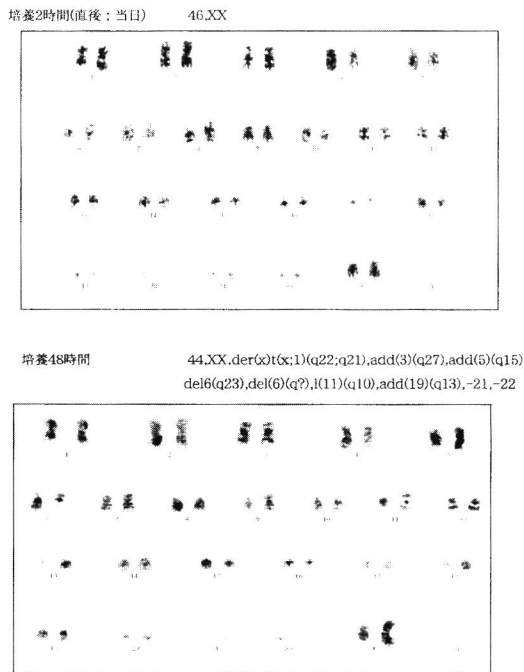


図5 培養時間の検討 (症例5: 培養時間の違い)

3. 分裂促進剤 (PHALCM³: phytohemagglutinin stimulated leukocyte conditioned medium) 添加 (図6)

種々の造血因子 (IL 2, IL 3, IL 5, IL 6, GM-CFS など) を含む腫瘍細胞の metaphase 形成に有効であるとされている PHALCM は, Tリンパ球を PHA (phytohemagglutinin) で刺激して培養した培養上清液である. 今回検討した5症例においては1症例を除き metaphase 数に, PHALCM 添加と無添加で大きな差は認められなかった.

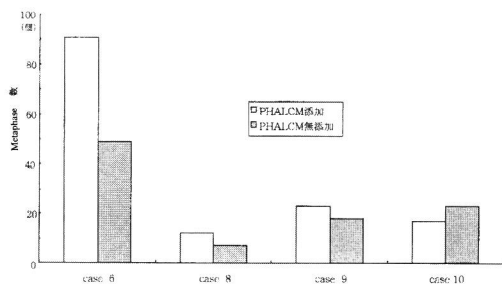


図6 PHALCM添加の検討

4. コルセミドの作用条件 (図7)

コルセミドの添加量と作用時間について検討した症例8, 9, 11~13における結果は, コルセミドの量による差はなかったが, 作用時間では2時間に metaphase が多く観察された.

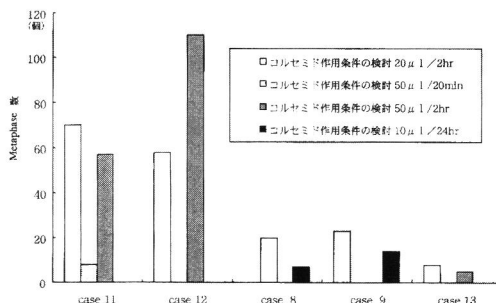


図7 コルセミド作用条件

5. 低張処理 (0.075 M KCl) について (図8)

0.075 MKCL による処理は, 1回で攪拌を加えることで良好な metaphase が得られた. 十分に低張処理を行い, 質の良い (展開時細胞質が残らない) metaphase を得るために複数回の KCL の低張処理を行うとむしろ metaphase 数が減少する傾向が見られた. 今回の検討は, 技師間の差も確認する目的で行ったが, ほぼ同様の結果が得られた.

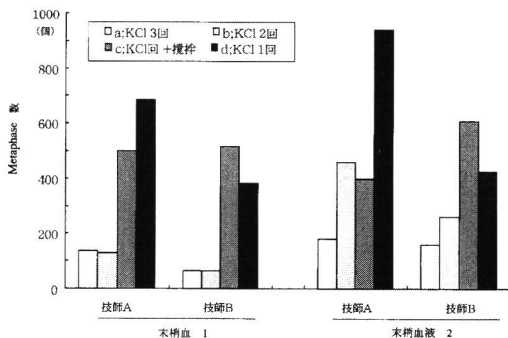


図8 末梢血を用いた低張処理 (0.075 M KCl) の検討

6. G分染の検討 (表2)

エイジング条件(a), トリプシン処理(b)について, PBS Buffer の pH (c), ギムザ液の濃度(d)についての検討を行った. 膨化を抑え, かつG分染でシャープなバンドが検出できる条件は, エイジングを過酸化水素 (H₂O₂) 1分で, トリプシン処理は0.

表2 G 感染の検討

		膨化	分染
(1) エイジング条件	H ₂ O ₂ 1min	-	+
	H ₂ O ₂ 2min	+	-
	H ₂ O ₂ 3min	+	-
	H ₂ O ₂ 4min	+	-
	H ₂ O ₂ 5min	+	-
	展開後室温・70℃2時間	-	±
(2) トリプシン条件	粉末トリプシン ; 2℃・7秒	~±	+
	Liquidトリプシン ; 2℃・7秒	±	-
	; 37℃・7秒	+	±
(3) PBS bufferのPH条件	pH 6.6	+	-
	pH 6.8	-	+
(4) ギムザ染色液濃度	1%ギムザ/pH 6.8PBS	-	+
	2%ギムザ/pH 6.8PBS	-	-

025%トリプシン（粉末）／ハンクス液を用いて2℃にて7秒反応後、1%ギムザ液/pH 6.8 PBS bufferで染色することで良好な結果が得られた。

IV. 考 察

近年の分子遺伝学の進歩により、造血器腫瘍を含めすべての癌は遺伝子異常により発生することが明らかになってきた。殊に造血器腫瘍は末梢血や骨髄血から比較的容易に入手できることから、病型に対応する多くの染色体異常が発見された。報告者により異なるが、白血病の染色体異常は、急性リンパ性白血病では60~90%に、急性骨髄性白血病では、50~80%に染色体異常がみられ、これらの異常は病型に特異的であるといわれている⁴⁾。

一方、造血器腫瘍における核型分析では約半数の症例において正常核型を示すとされている⁵⁾。異常の検出率が低い原因として、1) 培養条件が適正でなく、正常細胞優位となる。2) 腫瘍細胞が有糸分裂に導入できない。3) metaphaseや分染の不良による標本作製上の問題。4) 観察者の人為的な要因や検出感度等があげられる。実際に、今回我々が検討した培養条件においても症例5では、2時間培養後のmetaphaseは46, XX (正常核型)の分裂細胞がほとんどであったのに対し、培養48時間では44, XX, der(X)T(X; 1)(q 22; q 21), add(3)(q 27), add(5)(q 15), del 6(q 23), del(6)(q?) , I(11)(q 10), add(19)(q 13), -21, -22と異なった分裂細胞が検出された(図5)。このように検出しようとする腫瘍細胞に合った培養時間や分裂阻害剤(コルセミド)添加のタイミングを良く考慮することが極めて

重要であると思われた。しかし、検体ごとに最適な条件があるであろうが、ルーチンでは1症例ごとにすべての条件に対処していくことは困難である。染色体検査の院内導入にむけて、今回検討した培養条件より、培養液にはFBS添加濃度をコスト面も考慮し10%FBS加RPMI 1640を用いること、培養時間は検体採取後(当日)、24時間培養、48時間培養の3条件のうち2条件以上で実施することとした。細胞分裂刺激剤については、施設内で作製可能である分裂促進剤(PHALCM[®]: phytohemagglutinin stimulated leukocyte conditioned medium)の検討を行ったが、効果を認めなかった。今後、造血器腫瘍細胞の染色体解析を行うにあたり、解析対象細胞ごとに至適な細胞分裂刺激剤の検討は必要であると考えられる。

標本作製の過程、特に膨化处理やG感染の手技も重要である。核型解析に当施設ではFISH法と合わせて使用できる画像解析装置(cytovision)を使用している。今回の検討にあたり、標本観察において、metaphaseの周囲に残る細胞質が画像解析装置使用時間問題となった。0.075 M KClによる細胞膨化处理にて改善を試みたが、操作によるmetaphaseの損失が著しく好ましくなかった。metaphase像の改善については、今後、ハナビ(展開装置)における設定条件(DRY IND, BASE, BATH, WALLの温度)や、細胞浮遊液作製条件の検討を試みる必要がある。

G感染においてはエイジングの方法、条件が様々ある中で、標本展開後、迅速に行なえる過酸化水素水によるエイジングを検討し、ほぼ良好な結果が得

表3 染色体検査方法

1. 検体採取 10%FBS加RPMI1640(ヘパリン処理済み)2ml分注バイアルに採取
2. 培養 10ml培養フラスコ10%FBS加RPMI1640に細胞数を 1×10^6 /5mlに調整し,5%CO₂37°C 孵卵器にて以下の培養時間で行う

培養時間 <ol style="list-style-type: none"> a. 直；検体と同時にコルセミド20μl添加2hr培養 b. 24hr培養後コルセミド20μl添加2hr培養 c. 48hr培養後コルセミド20μl添加2hr培養 <p style="text-align: center;">(検体量によって2条件以上で培養を行う)</p>

3. 低張処理
 - 1) 孵卵器から培養フラスコを取り出す
 - 2) スポイトにて培養液をていねいに混和
 - 3) 1500rpm,8min,non brakeにて遠心後,上清をアスピレーターにて吸引
 - 4) 37°Cに暖めておいた0.075mol/l KClを約9ml加えスポイトにてていねいに混和
 - 5) 37°C恒温槽にて20minの低張処理
4. カルノア固定・細胞收穫
 - 1) 低張処理済みの培養液に冷カルノア0.5mlを重層しスポイトにて静かに混和後,5min,室温に放置
 - 2) 1500rpm,8min,non brakeにて遠心後,上清をアスピレーターにて吸引
 - 3) 冷カルノア約9mlを加えスポイトにて静かに混和
 - 4) 1500rpm,8min,non brakeにて遠心後,上清をアスピレーターにて吸引
 - 3) と4) を繰り返して上清が透明になるまで3~4回行なう
5. 標本作製
 - 1) 細胞浮遊液の調整；カルノア固定液にて濁度マクファーランド1程度に調整
 - 2) 展開装置(ハナビ)をDRY IND7.5~8.0に設定(BASEとBAHTの微調整)
 - 3) スライドガラスをハナビにセットし細胞浮遊液をマイクロピペットにて20 μ l滴下
 - 4) DRYにて乾燥
6. G分染
 - 1) 過酸化水素水を重層 1min
 - 2) 過酸化水素水を0.85%NaOHにて洗い流し,0.85%NaOHにて洗浄 (30sec)
 - 3) 水分をよくきり,0.025%粉末トリプシン/ハンクス液(4°C)を重層 7 sec
 - 4) 0.85%NaClにて洗い流しPH6.8PBSにて洗浄 (30sec)
 - 5) 水分をよくきり,1%ギムザ液にて15min染色
 - 6) 流水水洗 (30sec)
 - 7) ドライヤーにて風乾
7. 解析 画像解析装置(cytovision)にて標本観察~核型解析を行う

られたので採用した。過酸化水素水にてエイジング後、0.85%NaCl(生理食塩水)にての洗浄、0.025%トリプシン(粉末)／ハンクス液による処理、pH 6.8 PBS buffer による洗浄、1%ギムザ液15分のG分染にて膨化の少なく、バンド明瞭な核型を比較的安定して得ることができた。現時点での当院の染色体検査の操作法を表3に示す。

解析感度についてはG-bandingの検出感度を補う方法としてもFISH法による解析が行われる⁶⁾。上記の2法について利点や検出限界を考慮し、目的に応じた解析を行うことが望ましい。

V. 結 語

- 1) 培養条件は、10%FBS加RPMI 1640を用い、培養時間は検体採取後(当日)、24時間培養、48時間培養の3条件のうち2条件以上で実施する。
- 2) 低張処理は、KClの回数は1回、37°C、20分とする。
- 3) G分染は、過酸化水素水にてのエイジング後、0.85%NaCl(生理食塩水)にての洗浄、0.025%トリプシン(粉末)／ハンクス液による処理、pH 6.

8 PBSによる洗浄、1%ギムザ液15分とする。

文 献

- 1) Mitelman F, Mertens F, Johansson B, et al. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997; 15: 417-474.
- 2) 奈良信雄. 染色体分析, FISH法, SKY法. *臨病理レビュー* 2003; 特126: 124-130.
- 3) 福嶋義光. 細胞培養と染色体標本作製法. *臨床検査法提要 改訂31版*. 東京: 金原出版; 1998. p.1217-1219.
- 4) 園山政行. 染色体のG分染法と核型分類. 第2回日臨技遺伝子・染色体検査研究班研修会テキスト; 1998. p.30-46.
- 5) 林 泰秀. 白血病の染色体異常と遺伝子発現プロファイリング. 第10回細胞遺伝学セミナーテキスト; 2003. p.45-55.
- 6) 池内達郎. 染色体検査法—適応と解析感度の進展. *臨検* 2001; 45(2): 123-130.

Aiming at Introducing G-banding into Our Hospital

Kumie Ohmune, Takako Kawaguti, Yoshifumi Kuroyama,
Masahiko Ohata

Department of Clinical Laboratory, Shizuoka Red Cross Hospital

Abstract : Aiming at introducing G-banding into our hospital, we studied cell culture and conditions for collecting cells in order to obtain as many metaphase of good quality as possible. As to the fetal bovine serum to be added to the culture medium RPMI 1640, 10% fetal bovine serum and fetal bovine serum were studied. No difference in the number of metaphase and area of development was found between the two, and in consideration of the cost, 10% fetal bovine serum added RPMI 1640 was considered good enough. The culture time was studied under three conditions: after collection of the sample (on the day of sampling), 24-hour culture and 48-hour culture. With the large individual differences between the cases add the cell cycle taken into consideration, it was considered efficient to perform the culture under two of these three conditions. The effectiveness of phytohemagglutinin stimulated leukocyte-conditioned medium added was studied. With the number of metaphase not increasing, no evident effect was found. When the amount of addition (10 μ l, 20 μ l, 50 μ l) and working time (24hr, 2hr) of Colcemid were studied, most stable results were obtained with Colcemid 20 μ l, 2 working hours by comparing the number of metaphase and area of development.

The frequency of hypotonic treatment of 0.075M KCl was set at 37°C 20min per treatment since the yield of cell decreases with an increase in frequency. Band analysis with a good contrast was made possible by applying aging with hydrogen peroxidase after treatment with 0.025% powdered trypsin/Hanks solution. Moreover, a maximum possible reduction of artificial differences and more rapid reporting of results were made possible by the introduction of an imaging analyzer and Hanabi (development device), which was effective for labor saving in the analysis of nuclear type and reporting.

Key words : chromosome analysis, metaphase, cell culture, harvest, G-banding

