

染色体検査の基礎的検討

— 分裂阻害剤（コルセミド）の作用条件について —

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：分裂中期細胞像（metaphase）を多く得るために，紡錘糸形成阻害剤（コルセミド）の濃度と作用時間について基礎的検討を行った。コルセミド $20\mu\text{l}$ にて2時間（直接培養）， $8\mu\text{l}$ にて16時間（24時間培養 A），さらにコルセミド追加 $20\mu\text{l}$ 後2時間培養（24時間培養 B）の3条件の検討を行った。その結果，24時間培養法 A および B 法は直接培養に比し，有意に多くの metaphase を得ることができた。さらに20症例のうち14症例（70%）で A 法よりも B 法で多くの metaphase が得られた。metaphase 数は，全赤芽球比率と有意な正の相関を示し，M/E 比では有意な負の相関がみられた。また疾患別では，直接培養法で赤芽球系細胞の比率が低い症例で metaphase が得られにくい傾向があった。これらは細胞周期が短い赤芽球系細胞由来の metaphase が検出されやすいことを示唆する所見であった。細胞周期の遅い腫瘍細胞の metaphase を得るためには，コルセミドを長時間作用させる必要があると考えられた。以上の結果より，培養前の細胞数 $2.0\sim 3.0\times 10^6/\mu\text{l}$ に調整し，培養開始時にコルセミド $8\mu\text{l}$ 添加後16時間培養，さらにコルセミド $20\mu\text{l}$ 添加し2時間培養を行う24時間培養 B 法を採用することとした。

Key word：細胞分裂中期像数，分裂阻害剤，赤芽球系細胞

I. はじめに

造血器腫瘍では，種々の疾患と病型に特異的な染色体異常が見い出され，今日では染色体検査は診断のみならず治療法を選択する上で欠くことのできない検査である。しかし，染色体検査には2つの欠点があり，第一点は分裂中期像（metaphase）が得られないと解析不能となるという点，第二点は染色体異常の細胞起源が不明であるという点である¹⁾。

分裂像を得るために，疾患によっては腫瘍細胞の分裂刺激剤として pokeweed mitogen (PWM)，Lipopolysaccharide (LPS)，顆粒球増殖因子 (G-CFS) などを使用し metaphase を多く得る工夫もなされているが，増殖刺激剤の添加は増殖の主体となっているクローンの異常を知るという長所を損なうことになるため，骨髓培養では一般的には行われていない²⁾。

我々はこれまでに染色体検査の精度向上に向ける

様々な検討を実施してきた。既報³⁾で，検査センターにて作製された培養細胞収穫液と院内で作製した培養細胞収穫液を展開した標本中の metaphase 数の比較検討を報告した。その結果は，検査センターでは 250 ± 169 (個) の metaphase 数に比して，院内は 46 ± 35 (個) と有意に低値であった。そのため，今回は無刺激培養にてより多くの metaphase を得ることを目的とし，細胞分裂中期で阻止する細胞分裂阻害剤（コルセミド）の濃度と作用時間についての基礎的検討を行った。さらに，骨髓細胞分画の結果と metaphase 数の関係についても検討した。

II. 対象および方法

1. 対象

2007年1月以降に採取された骨髓液の中で，3系統培養可能な有核細胞数が得られた20検体（表1）を用いた。その内訳は急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia : AML）7例，慢性骨髄性白血

表1 対象症例

| case | age | F/M | diagnosis | 染色体核型 [分裂細胞数] |
|------|-----|-----|------------|---|
| 1 | 79 | F | MDS | 46, XX [20] |
| 2 | 70 | M | MDS | 43-46, del(5)(q?), add(6)(p21), +der(11)(p?) -15, -17, -18, +mar1 [cp20] |
| 3 | 76 | M | MPD | 46, XY [20] |
| 4 | 59 | M | MDS | A:46, XY [12] B:47, XY, +8 [5] C:46, X, +8, -Y [3] |
| 5 | 25 | M | AML | 46, XY [20] |
| 6 | 52 | M | リンパ球増殖性疾患 | 46, XY [20] |
| 7 | 80 | F | CML | 46, XX, t(9;22)(q34;q11) [20] |
| 8 | 78 | M | MPD | 46, XY [20] |
| 9 | 79 | F | 無顆粒球症 | 46, XX [20] |
| 10 | 76 | M | AML | 46, XY [20] |
| 11 | 75 | F | 第5因子インヒビター | 46, XX [20] |
| 12 | 80 | M | CML | 46, XY, t(9;22)(q34;q11) [20] |
| 13 | 65 | F | AML | 46, XX [20] |
| 14 | 67 | F | AML | 46, XX [20] |
| 15 | 18 | F | AML | 46, XX [20] |
| 16 | 74 | F | MPD | 46, XY [20] |
| 17 | 58 | M | AML | 46, XY [20] |
| 18 | 45 | F | AML | 46, XY, der(10)t(10;11)(p11;q11)add(10)(p11) [20] |
| 19 | 56 | F | MDS | 46, XX [20] |
| 20 | 63 | M | CML | A:46, XY, t(9;22)(q34;q11) [18] B:46, XY [2] |

MDS:骨髄異形成症候群 MPD:骨髄増殖性疾患 AML:急性骨髄性白血病 CML:慢性骨髄性白血病

病 (chronic myeloid leukemia:CML) 3例, 骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome : MDS) 4例, 骨髄増殖性疾患 (myeloproliferative diseases : MPD) 3例, その他として無顆粒球症1例, 第5因子インヒビター症例1例, リンパ球増殖性疾患1例を用いた.

2. 方法

Metaphase 数に影響のある培養条件のうち, 今回は特に分裂中期細胞の集積について, 以下の3条件を検討した. 図1に示すように, 直接培養法は培養開始時にコルセミド $20 \mu\text{l}$ 添加し2時間培養した. 24時間培養 A および B 法は, 培養開始時にコルセミド $8 \mu\text{l}$ 添加し16時間培養, さらに24時間培養 A 法はコルセミド追加添加なしで2時間培養, 24時間培養 B 法はコルセミド $20 \mu\text{l}$ 追加添加後2時間培養し, その metaphase 数の違いを検討した. 各条件の培養は $5\% \text{CO}_2$, 37°C で行った. 細胞浮遊液はマックファーランド 1.0 に調整し, 展開後 G 分染した. metaphase のカウントは光学顕微鏡 ($\times 100$) で全視野の metaphase 数をカウントした.

III. 結 果

1. 直接培養法, 24時間培養 A 法, 24時間培養 B 法で得られた metaphase 数の比較検討 (図2)

それぞれの metaphase 数は直接培養法 (35.8 ± 9.0 個), 24時間培養 A 法 (171.5 ± 196.8 個), 24時間培養 B 法 (188.4 ± 192.8 個) と, 24時間培養 A および B 法が, 直接培養に比して有意に高値であった ($p < 0.05$). 24時間培養 A 法と B 法の間には metaphase 数に有意な差は認められなかったが, 同一症例の比較では 14/20 症例 (70%) において, 24時間培養 B 法の方がより多い metaphase 数が得られた.

2. 調整細胞数と metaphase 数についての検討 (図3)

培養液中に調整した細胞数は, 直接培養法 ($2.88 \pm 1.19 \times 10^6 / \mu\text{l}$), 24時間培養 A 法 ($2.80 \pm 11.1 \times 10^6 / \mu\text{l}$), 24時間培養 B 法 ($2.71 \pm 10.7 \times 10^6 / \mu\text{l}$) 3条件間で有意な差は認められなかった. それぞれの条件の調整細胞数と metaphase 数との間には有意な相関は認められなかった.

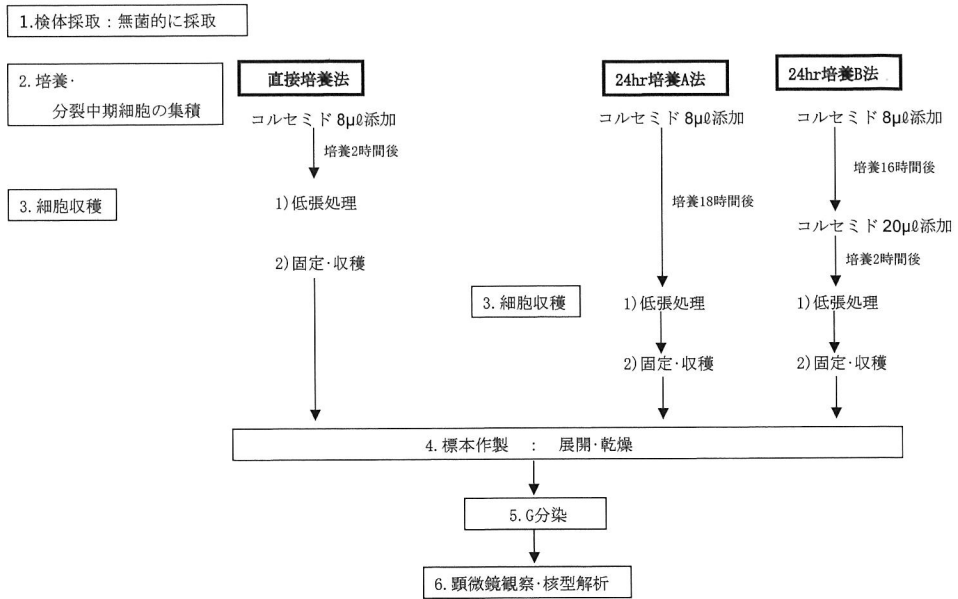


図1 染色体核型解析の行程と流れ（文献3より引用）

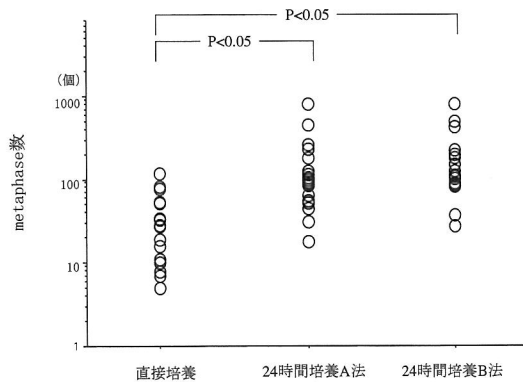


図2 培養条件と metaphase 数

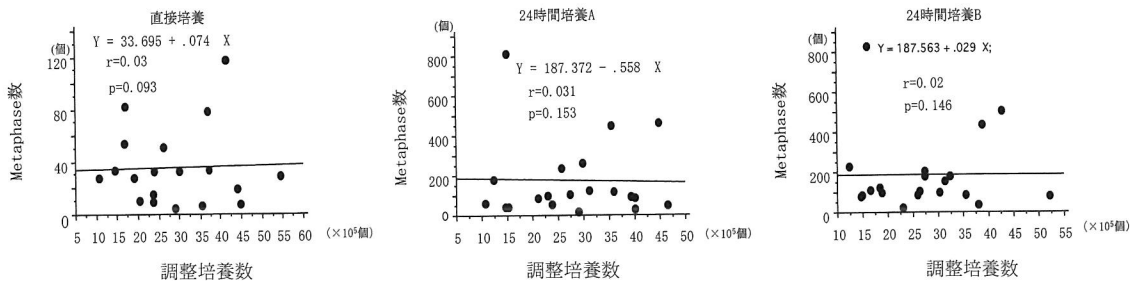


図3 調整細胞数と metaphase 数

3. 骨髓細胞分画と metaphase 数についての検討 (表 2, 図 4, 図 5)

骨髓細胞分画の全赤芽球比率, 幼若顆粒球系細胞比率 (骨髓芽球~骨髓球比率), M/E 比について metaphase 数との関係を検討した. 全赤芽球比率では 3 条件とも有意な正の相関がみられた. 幼若顆

粒球系細胞比率 (骨髓芽球~骨髓球比率) では, 直接培養で負の相関がみられたが 24 時間培養 A および B では相関関係はみられなかった. M/E 比では, 有意な負の相関がみられ, 直接培養法は 24 時間培養 A 法および 24 時間培養 B 法に比し, より強い相関関係が認められた.

表 2 3 条件における骨髓細胞分画と Metaphase 数の相関係数(r)

| | 直接培養 | 24時間培養A | 24時間培養B |
|------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| 全赤芽球系細胞比率 [※] | 0.295 (p<0.05) | 0.113 (p<0.05) | 0.176 (p<0.05) |
| 顆粒球系細胞比率 ^{※※} | -0.183 (p<0.05) | -0.105 NS | -0.176 NS |

※ 全赤芽球系細胞比率 : 前赤芽球~正染性赤芽球
 ※※ 顆粒球系細胞比率 : 骨髓芽球~骨髓球

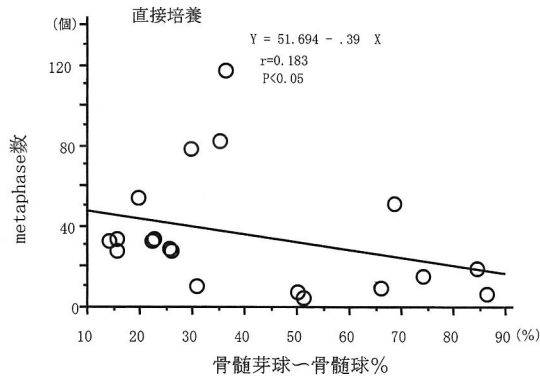


図 4 骨髓芽球~骨髓球%と metaphase 数

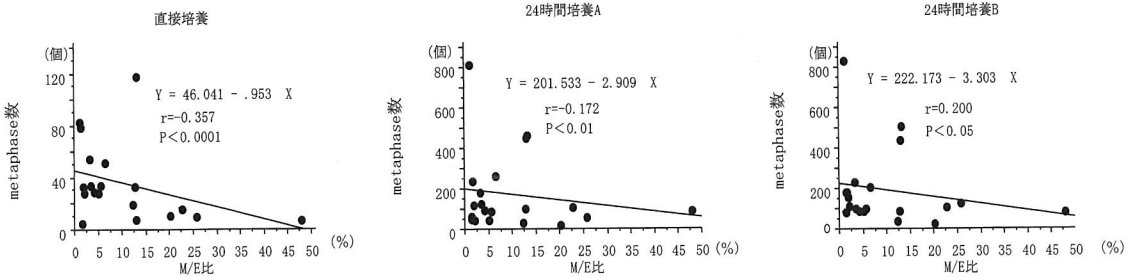


図 5 M/E比と metaphase 数

4. 疾患別にみた骨髓細胞分画と metaphase 数の関係 (図6, 表3)

骨髓細胞分画と metaphase 数の関係について疾患別に検討した. 直接培養において AML と CML が, それ以外の疾患に比べ metaphase 数が少ない傾向がみられた. 症例数が少ないが, MDS, MPD

では症例間の metaphase 数の差が大きい傾向がみられた.

また MDS において得られた metaphase 数は, 24 時間培養 B (135.0±42.1) が 24 時間培養 A (67.7±35.0) に比し, 多く得られる傾向があった.

24 時間培養後の metaphase 数がきわめて少ない

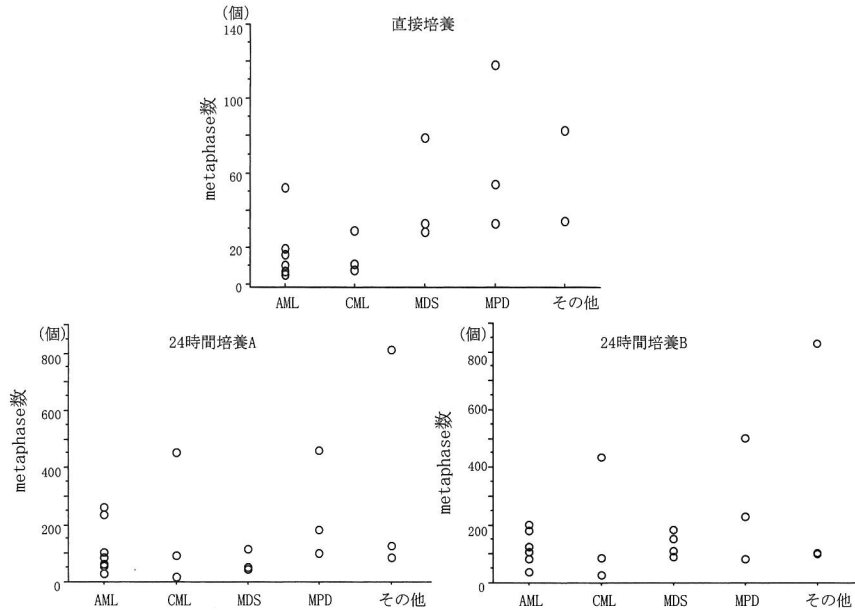


図6 疾患別にみた metaphase 数

表3 骨髓細胞分画, 白血球数と Metaphase 数

| | | | 直接培養 | 24時間培養A | 24時間培養B | blast | total-E | M/E比 | blast~myelo |
|---------|------------|--------|------------|------------|------------|-------|---------|-------|-------------|
| | | | metaphase数 | metaphase数 | metaphase数 | | | | |
| case 5 | AML-M4 | 初診時 | 10 | 56 | 127 | 65.0 | 2.6 | 25.69 | 65.8 |
| case 10 | AML-M3 | 初診時 | 19 | 31 | 38 | 0.9 | 6.9 | 12.35 | 84.3 |
| case 13 | AML-M4 | relaps | 52 | 82 | 204 | 58.8 | 12.6 | 6.41 | 68.6 |
| case 14 | AML-M4 | relaps | 7 | 88 | 82 | 78.8 | 2.0 | 47.90 | 80.4 |
| case 15 | AML-M2 | relaps | 5 | 237 | 188 | 45.8 | 36.6 | 1.58 | 51.2 |
| case 17 | AML-M6 | 経過観察 | NT | 65 | 83 | 2.8 | 34.8 | 1.43 | 11.4 |
| case 18 | AML-M4 | 初診時 | 16 | 105 | 108 | 73.5 | 3.3 | 22.59 | 74.1 |
| case 7 | CML | 初診時 | 18 | 452 | 436 | 2.3 | 6.8 | 12.97 | 50.1 |
| case 12 | CML | 治療中 | 11 | 18 | 28 | 3.0 | 4.5 | 20.40 | 30.6 |
| case 20 | CML | 初診時 | 29 | 93 | 88 | 1.7 | 18.1 | 4.19 | 25.6 |
| case 1 | MDS | 初診時 | 33 | 117 | 154 | 0.6 | 31.3 | 1.80 | 22.3 |
| case 2 | MDS | 治療前 | 79 | 52 | 184 | 11.6 | 36.4 | 1.45 | 29.6 |
| case 4 | MDS | 治療前 | 28 | 45 | 90 | 17.0 | 7.8 | 5.03 | 26.0 |
| case 19 | MDS | 初診時 | 28 | 45 | 112 | 0.8 | 28.3 | 2.02 | 15.4 |
| case 3 | MPD | 治療前 | 118 | 436 | 504 | 0.8 | 6.8 | 13.26 | 36.3 |
| case 8 | MPD | 初診時 | 33 | 100 | 85 | 0.7 | 6.5 | 12.68 | 13.9 |
| case 16 | MPD | 初診時 | 28 | 182 | 229 | 2.4 | 21.5 | 3.16 | 19.5 |
| case 6 | リンパ球増疾患 | | 34 | 126 | 103 | 1.2 | 13.3 | 3.41 | 15.4 |
| case 11 | 第5因子インヒビター | | 34 | 86 | 102 | 0.2 | 13.3 | 5.59 | 22.7 |
| case 9 | AGRA | | 83 | 812 | 829 | 3.4 | 30.3 | 1.24 | 35.2 |

※ 24時間培養法B法でA法に比しmetaphase数が多く得られた症例

症例が2例存在した。(case 10:初診時 AML-M3 症例と case 12:治療中 CML 症例)。一方, metaphase 数が 400 個以上と多く認められた症例は case 3 の治療前 CMML, case 7 の初診時 CML, case 9 の無顆粒球症であった。

IV. 考 察

今回 metaphase 数をより多く得るための方法として, コルセミドの作用条件について検討した。コルセミド 20 μ l にて 2 時間 (直接培養), 8 μ l にて 16 時間 (24 時間培養 A), さらにコルセミド追加 20 μ l 後 2 時間培養 (24 時間培養 B) の 3 条件の検討を行った。その結果, metaphase は 24 時間培養 A 法で 171.5 ± 196.8 個, 24 時間培養 B 法で 188.4 ± 192.8 個と多くの metaphase を得ることができた。さらに, 20 症例のうち 14 症例 (70%) で, 24 時間培養 A 法よりも 24 時間培養 B 法で多くの metaphase を得ることができた。特に MDS では 24 時間培養 A 法に比して B 法において有意に多くの metaphase 数が得られたことから, 当施設のコルセミド作用条件は B 法を用いることとした。各施設においてもコルセミドの作用時間や濃度は異なり, 一定の統一された方法がないのが現状であり⁴⁾, 今回の検討で得られた結果は当院の培養条件の設定に役立った。培養前の調整細胞数は図 3 から 24 時間培養 A 法および B 法とも, 細胞数 $2.0 \sim 3.0 \times 10^6 / \mu$ l に調整した検体で, より多くの metaphase を得られる傾向があり, 培養前の細胞数は $2.0 \sim 3.0 \times 10^6 / \mu$ l が至適と考えられた。

骨髓細胞分画と metaphase 数の検討では, 直接培養法で全赤芽球系細胞と正の相関が, M/E 比と幼若顆粒球系細胞比率で負の相関を認めることから, 直接培養法では赤芽球の比率が metaphase 数に大きく影響することが確認できた。このことは, 赤芽球系細胞の細胞周期が 19.3 時間⁵⁾と骨髓芽球 (22~30 時間), 前骨髓球 (30 時間)⁶⁾に比べ短いことによると考えられる。他の 2 条件 (24 時間培養) においても, 全赤芽球比率や M/E 比と相関がみられ, 細胞周期の短い赤芽球の由来の metaphase がより検出されやすいことが示唆される。

疾患別にみた骨髓細胞分画と metaphase 数については, AML と CML で直接培養法において metaphase 数の少ない傾向がみられた。AML の直接培養法で metaphase が得られにくかったのは, 赤芽球数が少ないことに併せ, 急性白血病の芽球の

細胞周期が 32~134 時間と正常の骨髓芽球の約 3~4 倍遅い⁸⁾ことより, metaphase を捉えにくかったことによると考える。CML については特に初診時骨髓で, 顆粒球系細胞の増多と赤芽球系細胞の著減が観察されることから, 得られやすい赤芽球由来の metaphase を反映した結果と思われた。さらに, case 12 の CML において 24 時間培養後の metaphase 数がきわめて少なかった。本例は, CML 診断後に BCR/ABL チロシンキナーゼ阻害薬メシル酸イマチニブ (イマチニブ) にて約 6 ヶ月半治療後, 肺炎のため休業し, その後ハイドレアにて治療中であったことより, 細胞増殖が抑制され metaphase 数が得られにくかったと推測される。一方, metaphase 数が 400 個以上と多く認められた case 9 の AGRA 症例は, 骨髓穿刺 2 日前に G-CSF を投与しており, G-CSF の作用による骨髓芽球の細胞増殖促進が, metaphase 数に影響していると思われる。

今回対象とした初診の AML 3 例で, 構造異常が検出されたのは 1 例 (case:18) のみであり, 再発例 3 例においても構造異常はみとめられなかった。正常核型の染色体が腫瘍細胞由来である場合は, 腫瘍細胞が染色体レベルではとらえられない異常をもつことが考えられる。特に RAS の点突然変異や FLT3 遺伝子 tandem duplication などや, 微細な染色体転座 (cryptic translocation) の可能性があげられる⁹⁾。さらに, case 10 の急性前骨髓球性白血病 (AML M3) 症例においては, 染色体検査は正常核型であったが, 遺伝子検査 (reverse transcriptio- polymerase chain reaction :RT-PCR 法) と fluorescence in situ hybridization (FISH) においては, World Health Organization Classification (WHO 分類) カテゴリー 1 にある PML/RARA キメラ遺伝子が検出された。AML-M3 においては凝固しやすいため正常核型となるやすい⁹⁾との報告もあるが, そのような場合は遺伝子検査や FISH 法による検討を行う必要がある。今回の検討では CML では 3 例中 3 例に, MDS では 4 例中 2 例 (case 2:構造異常, case 4:数的異常) に異常核型が検出されている。MDS および CML では, 異常クローンが造血幹細胞由来で染色体検査で捉えやすい赤芽球系細胞も異常を反映し, 核型異常がより検出されやすかったと思われる。

しかし, 増殖スピードの遅い幼若顆粒球系細胞や腫瘍細胞も, 今回検討した長時間コルセミドを作用させることで, metaphase の検出は可能であると

考える。また解析にあたっては、増殖が遅い細胞は染色体が短く太くなり、バンドも不明瞭で十分な解析が困難ともいわれている⁷⁾。染色体の解析においては、きれいな metaphase のみではなく短く太い解析に不向きな metaphase をも解析することが、異常検出率の向上につながると考えられる。

当施設における異常検出率は、21.5% (2007年1月～9月の121件における検出率)で、その内訳は構造異常が14%、数的異常が8.3%である。昨年までの外注検査結果の異常検出率20.4% (構造異常15%、数的異常5.4%)と比較し劣りはしないが、異常検出率向上のためには、さらに多くの metaphase を得て解析力の向上をはかることが今後も求められる。今回の検討結果も考慮にいれながら異常検出率の向上も含め臨床に役立つ解析につとめていきたい。

V. ま と め

1. 当施設の培養条件は、調整細胞数数 $2.0\sim 3.0\times 10^6/\mu l$ にコルセミドを $8\mu l$ 添加、16時間培養後さらにコルセミド $20\mu l$ を添加し2時間培養することとした。

2. metaphase 数と全赤芽球比率、M/E 比に相関がみられたことより、赤芽球系細胞由来の metaphase が得られ易いことを確認できた。

文 献

- 1) 朝長万左男, 染色体検査法と異常の判定法, 染色体異常の基礎と臨床 (朝長万左男編). 東京: 医学ジャーナル社; 2006. p.23-36.
- 2) 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.
- 3) 大棟久美江. 染色体標本作製についての基礎的検討. 静岡赤十字病院研究報; 2005. p 56-62.
- 4) 中川原寛一. 染色体分析の自動化と標本作製の実際. 臨床染色体診断法 (古庄敏行監修). 東京: 金原出版: 1996. p.187-197 .
- 5) 渡部真. 染色体の構造と行動. 臨床染色体診断法. 臨床染色体診断法 (古庄敏行監修). 東京: 金原出版: 1996.p.9-25.
- 6) 寺田秀夫. 血球のはたらき. 東京: 医学書院: 1971. p.47-48.
- 7) 三浦偉久男. 染色体異常-検査の方法と読み方-. 臨床と病理 (平野正美監修). 東京: 先端医学社; 2005. p.29-58.
- 8) 園山政行. スタンダード血液学 (日本検査血液学会編). 東京: 医歯薬出版株式会社; 2003. p.165-171.
- 9) 三浦偉久男. 染色体検査の出し方と結果の解釈. 日本臨床血液学会誌 2007; p.147-153.

Fundamental Studies of Chromosomal Tests — On the Conditions of the Effects of a Division Inhibitor (Colcemid) —

kumie Ohmune, Takako Kawaguchi
Yoshifumi Kuroyama, Masahiko Ohata

Department of Clinical Laboratory, Shizuoka Red Cross Hospital

Abstract : Fundamental studies on the concentration of a spindle inhibitor (colcemid) and the length of its effectiveness were conducted in order to attain many metaphases. Tests under three conditions consisting of culturing (direct culturing) for two hours with $20\ \mu\ell$ of colcemid, culturing (twenty four-hour culturing A) for sixteen hours with $8\ \mu\ell$, and culturing (twenty four-hour culturing B) for two hours after an additional $20\ \mu\ell$ of colcemid was conducted. The results show that the twenty four-hour culturing method A and method B led to the obtaining of significantly more metaphases than the direct culturing method. Furthermore, more metaphases were obtained with method B than with method A in fourteen out of twenty (70%) of the cases. Metaphase counts showed significantly positive correlations in all erythroblast rates, and significantly negative correlations were seen with M/E rates. In addition, it was difficult to obtain metaphases in cases by disease where the rates of erythroblastic cells were low with the direct culturing method. These are findings that suggest that metaphases deriving from erythroblastic cells with low cycles are easily detected. It is believed that long durations of the effects of colcemid are necessary to obtain the metaphases of tumor cells that have slow cell cycles. From the results above, it has been decided that twenty four-hour culturing method B, where the number of cells before culturing is adjusted from 2.0 to $3.0 \times 10^6/\mu\ell$, culturing for sixteen hours after an additional $8\ \mu\ell$ of colcemid during the beginning of the culturing is done, and culturing for two hours after an additional $20\ \mu\ell$ of colcemid is done, will be adopted.

Key word : metaphase, spindle inhibitor, erythroblastic cells



連絡先：大棟久美江；静岡赤十字病院 検査部

〒420-0853 静岡市葵区追手町 8-2 TEL (054) 254-4311