

# 染色体検査標本作成についての基礎的検討

## — 展開と G 分染について —

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：**検査センターのカルノア固定検体と院内のカルノア固定検体を用い metaphase の数と拡がりを検討した。さらに G 分染の従来法と改良法の染色性の違いについても検討した。対象は骨髄穿刺を施行した 20 例のカルノア固定細胞をハナビにて展開後、G 分染を行った標本を用いた。標本中の総 metaphase 数は、検査センター 250±169 (コ) に比して、院内 46±35 と院内において有意に低値であった ( $P < 0.0001$ )。拡がりについては解析可能な metaphase 24 コの面積で検討した。検査センター 20±5 (mm<sup>2</sup>)、院内が 10±3 で検査センターにおいて有意に拡がりがあった ( $P < 0.0001$ )。しかし総 metaphase の内、解析の容易な長さの metaphase の比率においては、検査センター 28.3% 院内 36.4% と院内の方が高かった。G 分染において、従来法 (シグマ社トリプシン使用) と改良法 (ギブコ社トリプシン使用と標本冷却の追加処理) の比較では、バンドの明瞭性が従来法 12% に対し改良法 77% と、改良法で良好なコントラストが得られた。metaphas の数と拡がりについては、検査センターの標本が良好であったが、院内標本中には解析容易な長い染色体が存在した、トリプシン処理の変更により、コントラスト良好な染色体バンドを安定して得ることが可能となった。

**Key words：**染色体分析, 細胞分裂中期像, 展開操作, G 分染, トリプシン処理

### I. はじめに

造血器腫瘍において染色体異常は、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% にみられ、この異常は病型に特異的である<sup>1)</sup>。その染色体に関する知見は、病型の確定診断をはじめ予後の判定や化学療法プロトコール選択、また治療効果や寛解の判定に不可欠なものとなっている。よって、染色体核型解析においては腫瘍細胞の異常を的確にとらえることと、その正確性が要求される。正確度を高めるためには、腫瘍細胞の増殖に適切な培養条件と、培養後の細胞収穫~膨化処理~カルノア固定~展開操作 (染色体標本スライド作成) を慎重に行い、数多く良質な細胞分裂中期像を得ることが重要である。また G 分染法によるバンド (ハプロイドあたり約 320~450 バンド) 解析には、染色体クロマチンの高次構造の歪みを生じさせるトリプシン処理<sup>2)</sup>の良否が大きく影響する。

今回、我々は細胞培養~細胞収穫~膨化処理~カルノア固定~展開操作の手技の検証として、検査センターにて作成されたカルノア固定サンプルと院内にて作成のカルノア固定サンプルの細胞分裂中期像の数と拡がりの比較をおこなった。また、正確な解析が効率よく実施されるためのバンド検出に重要なトリプシン処理についても基礎的検討を行った。

### II. 対象および方法

#### 1. 対象

2005 年 1 月以降に、採取された骨髄液 (ヘパリン採血) 20 検体を用いた。

#### 2. 方法

染色体核型分析の手順を図 1 に示す。今回、特に標本作成段階での細胞分裂中期像収量の検討と各種分染法 (G 分染法) についてを以下のように検討した。1)~3) についての検討には、展開装置 (ハナビ) をドライインデックス 7.0~7.5 に設定し、検査セン

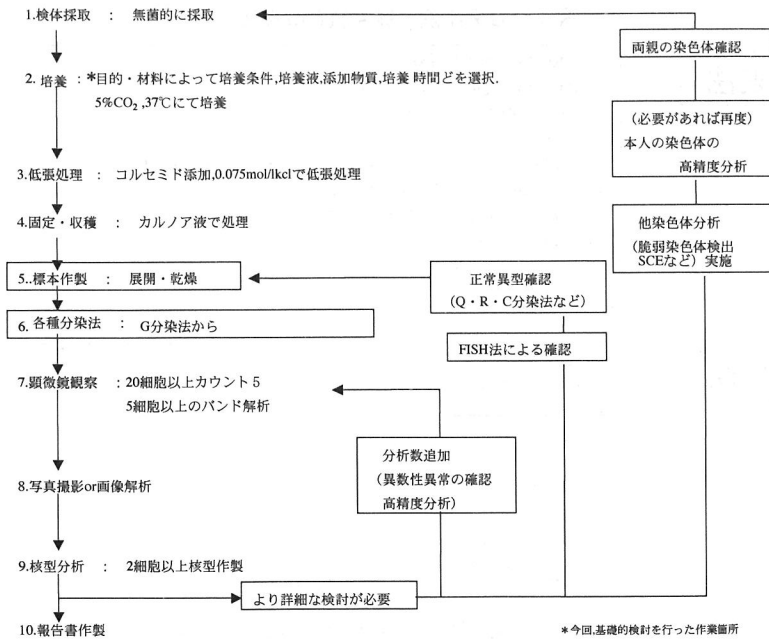


図1 染色体検査の流れ (文献3より引用)

ター作成カルノア固定細胞と院内作成カルノア固定細胞をマックファーランド 1.0 に調整後展開した標本を使用した。

1) 検査センターにて作成カルノア固定細胞と院内作成カルノア固定細胞における metaphase 数の比較

検査センター標本と院内標本を、ギムザ染色し光学顕微鏡(×200)で観察し、全視野の metaphase 数をカウントし比較した。

2) 検査センターにて作成カルノア固定細胞と院内作成カルノア固定細胞における metaphase の拡がりの比較

1)にて使用の標本を位相差顕微鏡(×200)で検鏡,画像解析装置にて画像を取り込み metaphase の縦径,横径を測定し面積として比較した(図2)。

3) 検査センター作成カルノア固定細胞と院内作成カルノア固定細胞における metaphase の長さの比較

1)にて使用の標本を油浸系強拡大(対物レンズ×100)で観察し,画像解析装置にて画像を取り込み metaphase 中の1番染色体の長さを測定し比較した。

4) 展開操作の違いによる metaphase の拡がりの検討

展開装置(ハナビ)ドライインデックス7.0~7.5

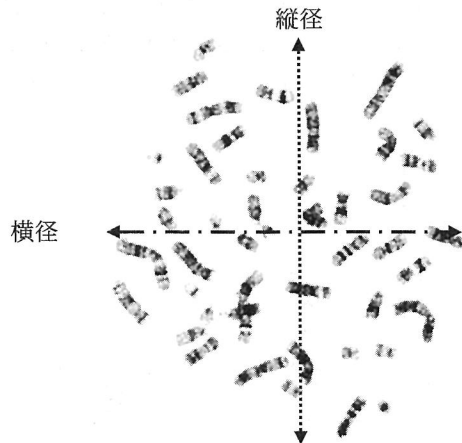


図2 Metaphaseの拡がりの測定方法

カルノア固定細胞 20 μ 滴下(A)とカルノア固定細胞 20 μ 滴下 30秒後カルノア液 20 μ 追加滴下(B)における metaphase の拡がりを位相差顕微鏡(×200)で検鏡,画像解析装置にて画像を取り込み metaphase の縦径,横径を測定し面積として比較した(図2)。

5) G分染(トリブシン処理について)の検討

院内作成カルノア固定細胞3症例について,展開装置(ハナビ)ドライインデックス7.0~7.5にて展開した標本を37℃のフラン器に1日保存し,表1の

表 1 G 分染法 (従来法と改良法)

従来法

- 1) 過酸化水素水約2ml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 (30秒)
- 3) 水分をよくきり,  
0.025%粉末トリプシン (シグマ社) /ハンクス液 (4℃) を重層 (7秒)
- 4) 0.85%NaOHにて洗い流しPH6.8PBSにて洗浄 (30秒)
- 5) 水分をよくきり,1%ギムザ液にて15分染色
- 6) 流水水洗 (15秒)
- 7) ドライヤーにて風乾

改良法

- 1) 過酸化水素水約2mlを重層 1min
- 2) 流水水洗 (30秒)
- 3) ドライヤーにて風乾
- 4) 標本を氷上にて冷却処理
- 5) 0.025%粉末トリプシン (ギブコ社) /ハンクス液 (2℃) を重層 (7秒)
- 6) 0.85%NaOHにて洗い流し,流水水洗 (30秒)
- 7) 水分をよくきり,1%ギムザ液にて15分染色
- 8) 流水水洗 (15秒)
- 9) ドライヤーにて風乾

従来法と改良法にてG分染を行った。標本を光学顕微鏡 (×200) にて鏡検し, 1 番染色体の長腕 31 (1 q 31) バンドが確認できる metaphase 数 (a) に対して, その中で 7 番染色体の短腕 21 (7 p 21), 長腕 21 (7 q 21), 31 (7 q 31) と 9 番染色体短腕 21 (9 q 21) のバンドがコントラスト良好に観察できた meta-

phase 数 (b) の比率を, 従来法と改良法で比較した。

III. 結 果

1. 検査センター標本と院内標本の metaphase 数の比較 (図 3, 4)

検査センター標本と院内標本の metaphase 数を 20 症例について比較した。20 症例すべての標本において検査センター標本に多数の metaphase が観察された。総 metaphase 数を平均して比較すると, 検査センター 250±169 (コ) に比して, 院内 46±35 と院内において有意に低値であった (P<0.0001)。

2. 検査センター標本と院内標本の metaphase の拡がりの比較 (図 4, 5)

検査センター標本と院内標本の 20 個の metaphase の拡がりについて比較した。各々の metaphase の横径と縦径を測定し (図 2) 面積にて比較した結果は, 検査センター 20±5 (mm<sup>2</sup>), 院内が 10±

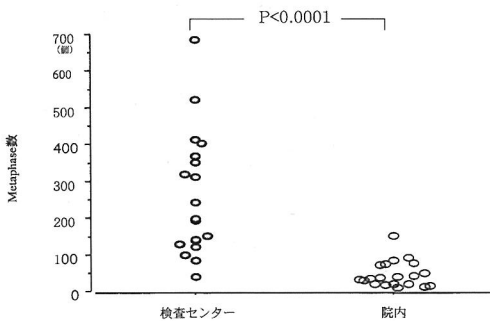


図 3 Metaphase数の比較

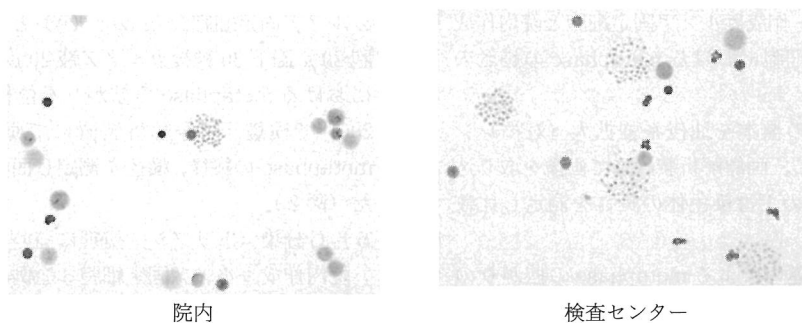


図 4 Metaphase数と拡がりの比較

3で検査センターにおいて有意に拡がりがあった ( $P < 0.0001$ ).

3. 検査センター標本と院内標本の metaphase の長さの比較 (図6)

検査センター標本と院内標本の20個の metaphase 中の1番染色体の長さ比較した. 検査センター標本では  $18.2 \pm 2.2$  (mm), 院内標本では  $24.3 \pm 5.3$  と院内標本の方が有意に長かった ( $p < 0.$

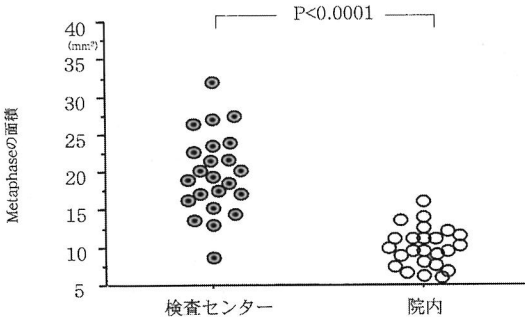


図5 Metaphase拡がりの比較

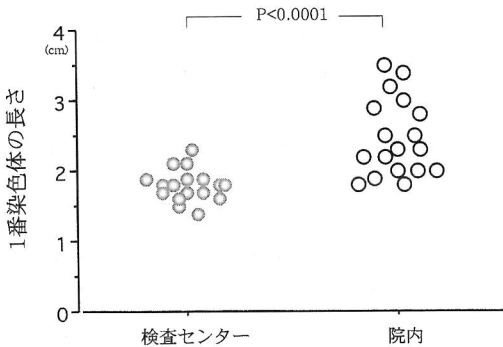


図6 染色体の長さの比較

0001). また, 総 metaphase の内, 解析の容易な長さの metaphase の比率においても検査センター28.3% 院内36.4%と院内の方が高かった.

4. 展開操作におけるカルノア追加 (-) とカルノア追加 (+) の拡がりの比較 (図7, 8)

展開操作において metaphase の拡がりに効を奏するとされる, 細胞液滴下後のカルノア液の追加滴下<sup>4)</sup>を検討した. カルノアを追加滴下 (-) とカルノア追加 (+) での metaphase の拡がりは面積で比較した. カルノア固定液追加滴下ありで  $19 \pm 8$  (mm<sup>2</sup>), 追加無しは  $20 \pm 6$  と有意差はなかった. しかし, 染色体の重なりが無い metaphase 数の比較ではカルノア追加 (+) はカルノア追加 (-) に比して平均1.2倍と良好な結果であった.

5. トリプシン処理の検討 (図9, 表2)

表2に, 総 metaphase 数と1番染色体の長腕31 (1 q 31) バンドが確認できる metaphase 数 (a), またその中で7番染色体の短腕21 (7 p 21), 長腕21 (7 q 21), 31 (7 q 31) バンドと9番染色体短腕21 (9 q 21) のバンドがコントラスト良好に観察できた

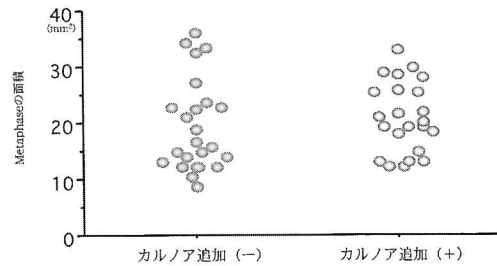
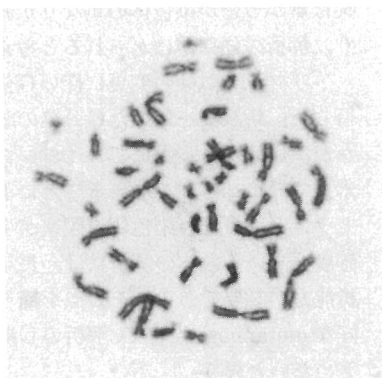
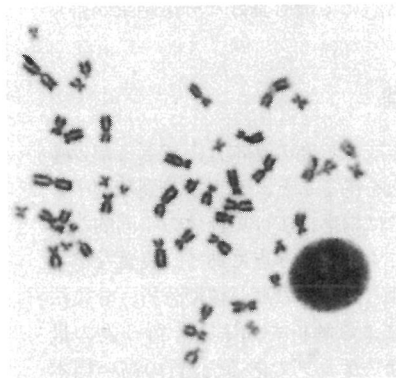


図7 カルノア追加の有無によるMetaphaseの拡がりの比較



カルノア追加 (-)



カルノア追加 (+)

図8 カルノア追加の有無によるMetaphaseの拡がり

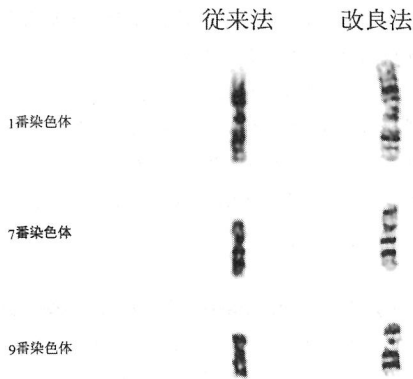


図9 G分染の違いによるコントラストの良否

表2 G分染法の違いによるコントラストの比較

CASE	case1		case2		case3	
	従来法	改良法	従来法	改良法	従来法	改良法
metaphase数	98	126	98	113	76	60
総metaphase数						
1q31 コントラスト良好	40	56	36	53	29	28
7p21,7q21,7q31,9q21 コントラスト良好	3	37	6	47	1	22

metaphase 数 (b) を表す。バンドの明瞭性を (a) に対する (b) の比率で評価すると、従来法 12% に対し改良法 77% と、改良法でコントラスト良好なバンドが得られた。改良法 [標本を過酸化水素水 1 分処理—流水水洗 30 秒—冷風乾燥—氷上にて冷却—0.025% 粉末トリプシン (GIBCO 社製)/ハンクス液 (2 °C) を重層 (反応時間 7 秒)—0.85% NaCl 反応停止—流水水洗 30 秒—1% ギムザ液にて 10 分—流水水洗 15 秒—風乾] にて最も良好な分染結果が得られた。

#### IV. 考 察

染色体標本を作成する為の基本は、できるだけ多くの分裂中期細胞を得ること、および分裂細胞中の染色体をスライドに扁平に広げ染色体の平面的な顕微鏡観察を可能にするという点にある。良質な標本を作製することは、信頼度の高い核型分析、分染法や FISH 法などによる解析を効率よく行う為の最も基本的で重要なステップである<sup>5)</sup>。質の高い標本を安定して作製するためには、適切な培養条件と細胞分裂阻止剤の作用条件、細胞収穫における丁寧な

処理、拡がり良好な展開条件と手技、そしてコントラストの良い G 分染のすべてが必要である。今回、当施設内で実施している手技と様々な条件の再検討を行う為に、検査センターにて作製された収穫細胞を用い比較検討を行った。metaphase の拡がり、metaphase 数および metaphase の長さの比較において、院内の方に長く観察容易な metaphase が多かったが数と拡がりについては検査センターの方が有意に良好であった。今後、質の良い metaphase 収量を増加する為に、培養時間と細胞分裂阻止剤の作用条件を検討する必要性を認識した。骨髄においては、多種の細胞系が混在しており細胞周期も様々である。また、解析の主である腫瘍細胞における細胞周期は、急性白血球の芽球で 32~134 時間との報告があり<sup>6)</sup>その有糸分裂期の細胞を収穫するためには、様々な工夫が不可欠である。骨髄の染色体検査では、原則として、無刺激にて 24 時間~48 時間培養が実施されているが、疾患によっては腫瘍細胞の分裂刺激剤として pokeweed mitogen (PWM), Lipopolisaccharide (LPS), 顆粒球増殖因子 (G-CSF) などを使用する方法もある<sup>3)</sup>。細胞分裂阻止剤には紡錘糸形成阻害剤 (コルセミド) を使用しているが、他の細胞分裂阻害剤を使用する方法や、細胞周期制御に関わる蛋白を用いることにより多くの metaphase を得るとの報告もある<sup>7)</sup>。今後、培養時間と細胞分裂阻止剤について、また腫瘍細胞の分裂刺激剤についての検討も重要であると考ええる。

展開装置 (ハナビ) を使用することにより metaphase の拡がり安定してきている。さらに拡がり良好な metaphase を得る為、展開操作に細胞液滴下 30 秒後にカルノア液滴下を加えるという方法を検討した。結果は metaphase 数及び拡がりに大きな効果は無かったが染色体の重なりが減少することにより、解析の効率は高くなると考える。

トリプシン試薬の変更に伴い G 分染法の再検討を行った。新試薬を用いた G 分染の結果は良好であったが、過酸化水素水にてエイジング後の標本風乾と氷上での冷却処理を加えることにより、さらにコントラストの良好な染色体の観察が可能となった。正確度の高い染色体の解析には、長年の経験による解析能力が必要である。その点を補う為にも多数の良好な metaphase を得て、解析のし易い標本の作製に努めたいと思う。

## V. ま と め

1. metaphase 数を増やす為に培養方法等の再検討が必要である。特に、細胞分裂阻害剤の作用時間と濃度による metaphase 数の増減について検討を実施する。
2. 展開操作は、細胞液 20  $\mu$ l 滴下 30 秒後にカルノア液 20  $\mu$ l の追加滴下を実施する。
3. G 分染は、過酸化水素水にて 1 分のエイジング後、流水水洗 30 秒、風乾後水上にて冷却、0.025% トリプシン (ギブコ社)/ハンクス液にて 7 秒処理後、流水水洗 30 秒、1% ギムザ液 10 分、流水水洗 15 秒とする。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) 深川竜郎. 大野みずき. 池村淑道. ヒト染色体バンドの意味するもの. 蛋白質核・酸・酵素増刊号 1996; 41(5): 121-31.
- 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 (金井正光編集) 改訂 31 版. 東京: 金原出版; 1998. p.1217-9.
- 4) 園山政行. 佐藤裕子. 染色体検査の理解にむけて染色体分染法(1). Modern Media 1997; 43(3): 82-91.
- 5) 奈良信雄. 池内達郎. 吉田光明ほか(編著). 遺伝子・染色体検査学. 東京: 医歯薬出版; 1999, p.65-140.
- 6) 日本検査血染液学会(編). スタンダード検査血液学. 東京: 医歯薬出版; 2003. p.165-71.
- 7) 篠原多美子. 染色体検査—造血器疾患を対象として. 検と技 1991; 119(7): 55-64.

# Initial Study into Chromosome Test Samples —Development and G banding—

Kumie Ohmune, Takako Kawaguchi, Yoshifumi Kuroyama,  
Masahito Ohata

Department of Clinical Laboratory, Shizuoka Red Cross Hospital

**Abstract :** The number and extent of metaphases was quantified in both laboratory and in-hospital samples fixed in Carnoy solution. Differences in dye affinity were also examined in both the conventional and improved methods for G banding. The subjects of the study were 20 cases of bone marrow derived cells in Carnoy solution that were developed on a Hanabi metaphase spreader, and subsequently used following G banding. The total metaphase number in laboratory sourced samples was  $250 \pm 169$ , considerably higher than the corresponding number ( $46 \pm 35$ ) of in-hospital derived samples ( $P < 0.0001$ ).

The total extent of metaphase was measured by calculating the area of the 24 quantifiable metaphase chromosomes. The area of the laboratory samples,  $20 \pm 5$  ( $\text{mm}^2$ ), was found to be considerably larger than the area of the in-hospital derived samples, which stood at  $10 \pm 3$  ( $\text{mm}^2$ ) ( $P < 0.0001$ ). Within total metaphase, however, the proportion of easily quantifiable, long chromosomes in laboratory sourced samples stood at 28.3%, significantly lower than the corresponding rate of 36.4% found in in-hospital samples. When comparing both conventional (Sigma; using trypsin) and improved (Gibco; using trypsin and following processing of the cooled sample) G banding methods, the 12% clarity rate observed in the traditional method was markedly lower than the corresponding rate of 77% found in the improved method. Additionally, we were able to observe a superior level of contrast by using the improved method. Although the number and extent of the metaphase samples from the laboratory were of sufficient quality, in-hospital samples were seen to be easily quantifiable, long chromosomes, with the ability to produce and maintain a stable chromosome band with good quality contrast following modification by trypsin treatment.

**Key words :** chromosome analysis, metaphase,  
development, G-banding, trypsin treatment



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