

培養Rat kangaroo cell line(PtK1 cell line)についての細胞遺伝学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8631

培養 Rat kangaroo cell line (PtK₁ cell line) についての細胞遺伝学的研究

金沢大学医学部第三解剖学講座 (主任：松田健史助教授)

武 田 公 男

Rat kangaroo (*Potorous tridactylis*) はタスマニア島に生息する小動物で、その体細胞の染色体は図1に示すように雄では $2n=13$ 、雌では $2n=12$ である。Shaw ら¹⁾ によって5対の常染色体は、大きさの順にNo. 1, 2, 3, 4, 5, と命名され、2本のY染色体も、大きさから Y_1 と Y_2 と命名された。しかし Hayman ら²⁾ や Moore³⁾ のように Y_1 と Y_2 を逆に記載しているものもある。Rat kangaroo の細胞においては、染色体数が少なく、個々の染色体そのものが大きく、また各染色体が特徴ある形態をしていて、染色体の同定が容易であることから、Sharman ら⁴⁾ や Walen ら⁵⁾ によって早くから細胞遺伝学的研究に好適していることが指摘されてきた。また Rat kangaroo の培養 cell line では、自然発生的に染色体の数的異常や dicentric chromosome, ring chromosome 等の染色体の構造異常を伴うことが報告されてきた⁶⁾⁻¹¹⁾。他方悪性腫瘍細胞においても、染色体の異数性や構造異常を伴うことがしばしば指摘されている¹²⁾。また Fanconi's anemia, Ataxia telangiectasia, Bloom's syndrome 等でも染色体の構造異常を伴ない、これらの疾患では悪性腫瘍の発生率が高く、German¹³⁾ はこれらの疾患を Chromosomal Breakage Syndrome として一括している。しかし同一のタイプの悪性腫瘍でも共通した染色体上の特徴を示すとはかぎらないこと、および正常染色体核型を有する悪性腫瘍の症例が認められることから、大多数の悪性腫瘍の細胞に観察される変異に富んだ染色体異常は、悪性腫瘍の発生とは関連しない、悪性腫瘍の増殖に伴う二次的な変異であろうとの考えが支配的である¹⁴⁾¹⁵⁾。著者は自然発生的に染色体の異数性や構造異常を伴う Rat kangaroo cell line が悪性腫瘍や一種の前癌状態と考えられる疾患に見られる染色体異常のモデルとなり、こ

れらの異常をもった細胞の増殖過程を解明する一手段となりうるのではないかと考え、Rat kangaroo cell line の細胞遺伝学的検索をおこなった。

実験材料と方法

Rat kangaroo cell line については、雌の腎皮質より確立され、継代第22代目の線維芽細胞を米国 Roswell Park Memorial Institute より分与されたものを使用した。この cell line の第24代から31代の8代にわたって細胞遺伝学的検索を行なった。細胞は RPMI1640¹⁶⁾ と 15% fetal calf serum を加えた Medium で37°Cの恒温器内で密封培養された。なお Medium 中には抗生物質等は一切加えなかった。細胞は培養7日目ごとに継代され、培養6日目に細胞遺伝学的検索を行なった。すなわち培養6日目にコルヒチン(最終濃度 0.2 μ /ml)に4時間暴露したのち、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS¹⁷⁾)で一度細胞を洗浄したのち、トリプシンで細胞を剥離し、0.075Mol 塩化カリ溶液あるいは蒸留水と HBSS が3:1の割合の溶液で低張処理を行ない、3:1 metanol-glacial acetic acid 液で固定した。空気乾燥法で標本作製し、染色体分析を行なった。なお染色体分析にあたっての細胞培養技法や染色体分析技術の詳細は、教室で行なわれているヒトの染色体の分析技術¹⁸⁾によった。染色体分析は8代にわたって、各継代時の200個、総計1600個の細胞を任意に選んで行なった。dicentric chromosome を含む核板については、Quinacrine Mustard (以下QMと省略する)による蛍光染色による Banding pattern で dicentric chromosome を構成している2本の染色体の同定を行なった。すなわち Xylene で油浸液を洗い落したのち、metanol と glacial acetic acid 液を用いて脱色し、QM 染色を行なった。

A cytogenetic study in a cell line of the rat kangaroo (PtK₁), cultured *in vitro* Kimio Takeda, Department of Anatomy (III) (Director : Prof. K. Matsuda), School of Medicine, Kanazawa University.

QM 染色は Brown ら¹¹⁾の方法によった。染色した核板は蛍光顕微鏡で HBO200mercury burner, 47-0barrier, BG3, BG12, BG38exciter filter で鏡検し、写真撮影を行なった。

結 果

検索を行なった cell line は第24代から31代にわたって、細胞増殖速度はほぼ一定で、この期間中にはいわゆる a period of growth retardation (Todoraro ら¹⁹⁾)あるいは "crisis" (Katz ら²⁰⁾)は認められなかった。また染色体検索を行なった cell line は分与された当時から、すでに No.5 の染色体が1本欠失した図2のような核型をもった細胞が main stemline となっていた。

1. 染色体の数的変化

図3には各継代時における細胞の染色体数の分布とその推移を示した。なお染色体数の算定には dicentric chromosome, ring chromosome, exchange chromosome はおのおの2本として計算した。検索を行なった cell line は第24代から31代の8代にわたって、総染色体数が11本の細胞が一貫して main stemline となっているが、各継代時には総染色体数が10本および12本等のいくつかの side line が認められ、その頻度は一定しない傾向にある。しかし8代にわたって、モードは一貫して2倍体域に認められるが、3倍体域が次第に増加する傾向にあるのが認め

られる。

染色体の構造的変化

培養各代において、図4に示すように chromatid gap or break (A, D-a), isochromatid gap or break (B), ring chromosome (D-b), dicentric chromosome (C, F-a), exchange chromosome (E), arm end fusion (F-b), acentric fragment (D-c, F-c) 等の染色体の構造異常が認められた。しかし multiple gaps or breaks, polycentric chromosome, "gordian knot" は1600個の核板中に1個も認められなかった。次に観察結果を構造異常の種類ごとに記載する。

1) chromosomal breakage

表1-1a および表1-1b に chromatid gaps or breaks と isochromatid gaps or breaks について、各継代時の個数とそれを保有する細胞数、ならびに1細胞あたりのそれぞれの頻度を示した。これらの頻度の各継代時の推移は図5に示した。これらの breakage の頻度は各継代時では増減が認められるが (chromatid gaps or breaks : 10.5%~29.5%, isochromatid gaps or breaks : 3.5%~11.0%), 特別の増加あるいは減少傾向は認められない。表2には chromatid gaps or breaks と isochromatid gaps or breaks について、各継代時ごとに各染色体に観察された個数を短腕と長腕別に示した。表3には chromatid gaps or breaks と

表1：各種の構造的異常の各継代時の個数とそれを保有する細胞数、ならびに1細胞あたりのそれぞれの頻度。

表1-1a：chromatid gap or break

Passage number	Total No. of cells observed	No. of cells with chromatid gaps or breaks	No. of cells with chromatid gaps or breaks / Total No. of cells	No. of chromatid gaps or breaks	No. of chromatid gaps or breaks / Total No. of cells
24	200	19	0.095	21	0.105
25	200	45	0.225	45	0.225
26	200	25	0.125	27	0.135
27	200	27	0.135	33	0.165
28	200	25	0.125	32	0.160
29	200	39	0.195	44	0.220
30	200	47	0.235	59	0.295
31	200	23	0.115	34	0.170

isochromatid gaps or breaks について、おのこの染色体について、染色体1本あたりの頻度を短腕と長腕別に示した。統計学的解析の結果、発生頻度は at random ではなく、chromatid type と isochromatid type とともに No. 1 の染色体の長腕と X 染色体の短腕に発生率が高いことが判明した。図6には chromatid gaps or breaks と isochromatid gaps or breaks について、染色体1本あたりの頻度の各継代時ごとの推移を示した。染色体1本あたりの頻度も各継代時では、やはり増減が認められるが、

特別の増加あるいは減少傾向は認められない。また図6の頻度の推移を示したカーブは図5のそれとはほぼ平行している。なお Multiple gaps or breaks は1個も観察されなかった。

2) ring chromosome

表1-2に ring chromosome について各継代時の個数とそれを保有する細胞数ならびに1細胞あたりのそれぞれの頻度を示した。なお "gordian knot" は1個も観察されなかった。

3) acentric fragment

表1-1b: isochromatid gap or break

Passage number	Total No. of cells observed	No. of cells with isochromatid gaps or breaks	No. of cells with isochromatid gaps or breaks / Total No. of cells	No. of isochromatid gaps or breaks	No. of isochromatid gaps or breaks / Total No. of cells
24	200	15	0.075	21	0.105
25	200	11	0.055	21	0.105
26	200	14	0.070	16	0.080
27	200	14	0.070	14	0.070
28	200	13	0.065	14	0.070
29	200	22	0.110	22	0.110
30	200	11	0.055	11	0.055
31	200	7	0.035	7	0.035

表1-2 : ring chromosome

Passage number	Total No. of cells observed	No. of cells with ring chromosomes	No. of cells with ring chromosomes / Total No. of cells	No. of ring chromosomes	No. of ring chromosomes / Total No. of cells
24	200	0	0.000	0	0.000
25	200	0	0.000	0	0.000
26	200	0	0.000	0	0.000
27	200	1	0.005	1	0.005
28	200	2	0.010	3	0.015
29	200	1	0.005	1	0.005
30	200	0	0.000	0	0.000
31	200	0	0.000	0	0.000

表1-3に acentric fragment について各継代時の個数とそれを保有する細胞数, ならびに1細胞あたりのそれぞれの頻度を示した. なお dicentric chromosome を含む核板のうちで, acentric fragment が観察されることはまれであった.

4) dicentric chromosome

表1-4に dicentric chromosome について, 各継代時の個数とそれを保有する細胞数, ならびに1細胞あたりのそれぞれの頻度を示した. この dicentric chromosome には形成しやすい染色体の組み合わせがあるのではないかと考え, QM による蛍光染色による Banding pattern によって, dicentric

chromosome を構成している2本の染色体の同定を行なった. それに先だって蛍光染色によって分析を行なう際の基本となる Banding pattern を得ておく必要があった. 蛍光染色による Banding pattern によれば, Rat kangaroo 細胞のNo.1とNo.2の染色体には各3種類が, X染色体には2種類がそれぞれ新しく区別された. それらを著者は仮に1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, Xa, Xb, と命名した. 図7にはこのQMによる各染色体のBanding patternを示し, 図8にはこのBanding patternによってdicentric chromosomeを構成している2本の染色体を同定した1例を示した. 表4には総計142個の

表1-3 : acentric fragment

Passage number	Total No. of cells observed	No. of cells with acentric fragments	No. of cells with acentric fragments / Total No. of cells	No. of acentric fragments	No. of acentric fragments / Total No. of cells
24	200	4	0.020	4	0.020
25	200	5	0.025	5	0.025
26	200	4	0.020	4	0.020
27	200	4	0.020	4	0.020
28	200	6	0.030	6	0.030
29	200	3	0.015	3	0.015
30	200	4	0.020	4	0.020
31	200	1	0.005	1	0.005

表1-4 : dicentric chromosome

Passage number	Total No. of cells observed	No. of cells with dicentric chromosomes	No. of cells with dicentric chromosomes / Total No. of cells	No. of dicentric chromosomes	No. of dicentric chromosomes / Total No. of cells
24	200	15	0.075	17	0.085
25	200	12	0.060	13	0.065
26	200	19	0.090	19	0.095
27	200	25	0.125	26	0.130
28	200	15	0.075	16	0.080
29	200	14	0.070	16	0.080
30	200	17	0.085	18	0.090
31	200	13	0.065	17	0.085

dicentric chromosome について、それを構成する 2本の染色体を QM による蛍光染色で同定し、2本の染色体の組み合わせの頻度を示した。表4のうちA

は著者の染色体分類法による頻度であり、Bはそれを従来の分類法に還元した上での頻度である。その結果を統計学的に解析すると dicentric chromosome

表2：各継代時ごとに各染色体に観察された chromosomal breakage の短腕と長腕別の個数

Chromosome number	Number of Chromosomes										Number of chromatid gaps or breaks						Number of isochromatid gaps or breaks																													
	Total	Passage number										Re- gion	Passage number						Re- gion	Passage number																										
		24	25	26	27	28	29	30	31	24	25		26	27	28	29	30	31		24	25	26	27	28	29	30	31																			
1	4050	452	464	550	483	466	535	532	566	p	1	5	2	0	2	0	3	1	p	5	0	2	1	0	2	1	0	q	6	9	6	7	7	8	17	7	q	3	4	6	6	4	5	2	4	
2	4598	539	561	613	579	566	590	550	600	p	2	6	1	6	7	4	4	4	p	2	4	1	1	1	2	2	3	1	q	3	5	7	5	5	11	14	10	q	6	0	1	1	1	4	3	1
3	3818	414	476	524	477	419	483	470	555	p	1	3	5	3	4	4	4	1	p	1	5	1	1	0	1	0	0	q	3	1	0	2	5	4	10	6	3	q	1	5	1	2	3	7	1	0
4	3819	505	444	512	476	431	450	476	525	p	1	0	0	3	1	1	0	0	p	0	0	0	0	0	0	0	0	q	0	0	0	1	0	1	0	3	q	0	1	0	0	0	0	0	0	
5	2035	237	247	271	267	240	241	267	265	p	1	0	0	1	0	1	1	0	p	0	0	0	0	0	0	0	0	q	0	0	0	0	0	1	0	0	q	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	2974	392	338	374	358	353	377	413	396	p	1	4	3	1	1	3	7	0	p	1	1	4	1	3	1	1	1	q	2	3	0	1	1	1	3	5	q	2	1	0	1	1	0	0	0	

p: Short arm q: Long arm

表3：各染色体の短腕と長腕別の染色体1本あたりの chromosomal breakage の頻度

a) chromatid gaps or breaks

Chromosome Number \ Region	1	2	3	4	5	X
Short Arm	0.00346	0.00741	0.00655	0.00157	0.00196	0.00639*
Long Arm	0.01654*	0.01303	0.01126	0.00157	0.00049	0.00504
Whole Arm	0.02000	0.02044	0.01781	0.00314	0.00245	0.01143

b) isochromatid gaps or breaks

Chromosome Number \ Region	1	2	3	4	5	X
Short Arm	0.00272	0.00348	0.00348	0.00000	0.00000	0.00437*
Long Arm	0.00839*	0.00369	0.00524	0.00026	0.00000	0.00168
Whole Arm	0.01111	0.00717	0.00759	0.00026	0.00000	0.00605

*: 1% level significant

を形成する染色体の組み合わせは at random で、 chromosome の QM による Banding pattern に特に dicentric chromosome を形成しやすい染色体の組み合わせはなかった。さらにこの dicentric より、この dicentric chromosome は特別のタイプのものであることが確認できた。すなわち図8でも

表4: dicentric chromosome を構成している2本の染色体の組み合わせの頻度

A. 著者の染色体分類法による頻度

Chromosome number	1 a	1 b	1 c	2 a	2 b	2 c	3	4	5	X a	X b	Total
Chromosome number												
1 a	0	0	0	1	0	0	7	4	7	2	1	22
1 b	-	0	0	2	2	0	4	9	3	4	3	27
1 c	-	-	0	0	1	2	5	6	4	3	2	23
2 a	-	-	-	0	0	0	3	3	3	2	2	13
2 b	-	-	-	-	0	1	2	1	1	1	0	6
2 c	-	-	-	-	-	0	1	3	2	2	3	11
3	-	-	-	-	-	-	0	8	5	7	6	26
4	-	-	-	-	-	-	-	0	4	2	1	7
5	-	-	-	-	-	-	-	-	0	5	2	7
X a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
X b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
Total	0	0	0	3	3	3	22	34	29	28	20	142

B. 従来の染色体分類法に還元した頻度

Chromosome number	1	2	3	4	5	X	Total
Chromosome number							
1	0	8 (4.6)	16 (17.2)	19 (17.2)	14 (14.7)	15 (14.7)	72
2	-	1 (1.9)	6 (4.6)	7 (7.2)	6 (6.1)	10 (10.1)	30
3	-	-	0	8 (6.2)	5 (5.3)	13 (8.8)	26
4	-	-	-	0	4 (1.4)	3 (2.4)	7
5	-	-	-	-	0	7 (2.4)	7
X	-	-	-	-	-	0	0
Total	0	9	22	34	29	48	142

$\chi^2 = 21.94$ D. f. = 25 $0.75 > P > 0.50$ (): Expected.

明らかであるが、この dicentric chromosome は染色体の欠失を伴わず、その端部と端部が単に結合することによって形成されていることが判明した。

5) exchange chromosome

exchange chromosomeは第29代の細胞に1個のみ観察された。

6) arm end fusion

図4 (F-b) のような同一染色体内で、長腕の染色体端部が相互に結合し、1種の Ring form を形成しているのがしばしば観察された。これは従来の染色体異常分類の記載法のいずれにも適当しないので、著者は arm end fusion (分体端部結合) と仮称したい。

表5にはこれらの構造異常の種類ごとに、構造異常を有する細胞数と構造異常の個数を各継代時ごとに記載し、その合計と全細胞に占める頻度を総括した。

考 察

ヒトの培養細胞は、長期間にわたって正常な染色体核型を保持するが、他の多くの動・植物材料からの培養細胞は、新しい別の核型をもった stemline を形成するものが多い。それゆえ Hayflick ら²¹⁾ は長期培養細胞を、次のように2種類に区別する必要があると述べている。

すなわち1つは限定された生存期間を有し、取り出された元の組織と、染色体核型の上で変化の認められない cell strains と、他は無限の生存期間をもち、元の組織と異った染色体核型の上での特徴をもった

cell lines を区別している。cell strains から cell lines への転換は常時起りうるが、転換には染色体核型の上での変化を伴っており、元の組織の正常染色体核型の特徴を解析するのに適当ではない。しかし cell line は有糸分裂における染色体の行動の解析や、X線照射、突然変異誘発性化学物質、ウイルス感染に対する染色体核型にみられる変化を検索するのに適している。cell line は main の stemline の核型を中心にして、別の小 stemline の核型を形成するといった染色体核型上の変動を示すのが特徴である。すなわちある範囲内で、main の stemline の核型と異なる染色体数をもつ別の stemline を形成する。stemline は動力学的平衡のもとで増殖し、たえずある種の淘汰の影響のもとで変化する。それゆえ cell line を使用する研究に際しては、注意深くその cell line の染色体核型の上での特徴をみきわめなければならない。すなわち main の stemline の核型とこの核型からの変動の範囲を決定する必要がある。Rat kangaroo cell line は先に述べたように、細胞遺伝学的研究に好適な条件を所持しているが、Rat kangaroo cell line を使用して、X線照射、突然変異誘発性化学物質、ウイルス感染等の染色体に対する影響の解析に先だつた。この cell line の染色体核型の上での変化の特徴を明らかにする必要がある。

そこで著者は第24代から31代の8代にわたって観察した Rat kangaroo cell line の染色体核型上の変化の特徴を、数的変化と構造的変化に大別し、他の

表5：各継代時ごとの各種構造的異常を保有する細胞数と構造的異常の個数、およびその合計と全細胞に占める頻度

表5

Structural aberration	Passage number									Total Total No of cells (%)
	24	25	26	27	28	29	30	31	Total	
Chromatid gaps or breaks	21(19)	45(45)	27(25)	33(27)	32(25)	44(39)	59(47)	34(23)	259(250)	18.4%(15.6%)
Isochromatid gaps or breaks	21(15)	21(11)	16(14)	14(14)	14(13)	22(22)	11(11)	7(7)	126(107)	7.9%(6.7%)
Dicentric chromosomes	17(15)	13(12)	19(19)	26(25)	16(15)	16(14)	18(17)	17(13)	142(130)	8.9%(8.2%)
Ring chromosomes	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	3(2)	1(1)	0(0)	0(0)	5(4)	0.3%(0.2%)
Exchange chromosomes	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	1(1)	0.06%(0.06%)
Acentric fragments	4(4)	5(5)	4(4)	4(4)	6(6)	3(3)	4(4)	1(1)	31(31)	1.9%(1.9%)

研究者の観察結果も考慮して考察を加えてみたい。

1. 染色体の数的変化

著者の検索した cell line の各継代時の細胞の染色体数の分布と、その推移を図3に示したが、総染色体数が11本の細胞が一貫して main stemline となっている。各継代時には、いくつかの side line が認められるが、各継代時の side line が一定しないのは、新しい side line がまた新しく別の side line を形成する能力があるためであろうと推測される。また Heneen^{22)~24)} は Rat kangaroo cell line で細胞の多極分裂を観察しているが、著者はこの細胞の多極分裂が、side line が一定しない原因ではないかと考えている。しかし8代にわたってのモードは、一貫して2倍体域に認められるが、3倍体域が次第に増加する傾向にあるのが認められる。Heyman—Zandstra⁹⁾ は、著者と同様に腎臓から確立された Rat kangaroo cell line で長期間の検索の結果、2倍体域から3倍体域へ、次に3倍体域から2倍体域へのモードの転換を2回繰り返した後、2倍体域がモードとなり、次第に死滅した例を報告している。著者も今回検索した cell line と別の Rat kangaroo cell line で、50代(約1年間)にわたって3倍体域の染色体が大半をしめていたが、その後次第に2倍体域の染色体をもった細胞が増加し、ついには2倍体域の染色体をもった細胞が大半を占めるようになった後、急速に死滅した例を経験している。これら2倍体域から3倍体域あるいは4倍体域へのモードの転換時期においては、いわゆる a period of growth retardation (Todaro¹⁹⁾) あるいは "crisis" (Katz²⁰⁾) が起るが、cell line によってはこれらの時期より遂に回復しえずに死滅した Rat kangaroo cell line も報告されている²¹⁾。Rat kangaroo cell line でこのようなモードの転換が、いかなる原因で起るかは不明であるが、著者の cell line をさらに長期間検索を続け、これらの点を解明してゆきたい。

2. 染色体の構造的変化

培養 Rat kangaroo cell line における染色体の構造異常については、Levan⁶⁾ によって初めて指摘され、その後 Levan⁷⁾、Heyman—Zandstra⁹⁾、van Steenis⁹⁾、Brown¹⁰⁾ が言及しているが、著者が調べた範囲では、構造異常の頻度が高いとしながらも、正確な頻度について報告しているものはない。

まず chromosomal breakage に関しては、Levan⁷⁾ はまれであるとしているが、著者の cell line

では表5に示したように chromatid type (18.4%) と isochromatid type (7.9%) とも高頻度に認められた。なお gap と break は一般には次のように区別されている。すなわち gap は染色分体の縦軸に沿って生ずる狭い非染色性の部分で、一見染色分体はこの部分で切れているように見える。しかし染色分体がこの部分で完全に切れ、不連続になっているとは考えられていない。他方 break は一つあるいは両方の染色分体の同じ部分が切断によって不連続となる場合である。しかし実際の観察にあたり、gap と break を識別することはむずかしく、また研究者によって gap の定義づけもかなり差異がある²⁵⁾ ので、著者は gap と break を区別せずに算定した。

Breakage の頻度は各継代時では増減が認められるが [chromatid type (10.5%~29.5%), isochromatid type (3.5%~11.0%)]、特別の増加あるいは減少傾向は認められない。このことは breakage について、毎世代ごとに何らかの修復機構が働いているためと考えたい。すなわちこれらの chromosomal breakage は mitosis に際し、その毎世代ごとに発生し、理論的に次の cell cycle に進行するので、もし修復機構がなければ、breakage は漸増の傾向にあり、さらに multiple gaps or breaks がかなりの個数観察されるはずである。

したがって著者が今回検索した1600個の細胞中で multiple gaps or breaks が1個も観察されなかったことや、breakage の頻度が特に漸増の傾向にないことは、修復機構が存在する証左となろう。またこの修復の傍証として Basehoar²⁶⁾ はレーザーで Rat kangaroo cell line の染色体の微少部分に損傷をつけたあと、次の cell cycle で染色体の損傷が修復されているのを観察している。

chromosomal breakage に関しては、常に chromatid type が isochromatid type よりも頻度が高いが(図6)、このことは cell cycle の G₁ 期よりも S 期と G₂ 期に chromosomal breakage の発生が高いことを示している²⁷⁾。

表3に chromosomal breakage の各染色体について、染色体1本あたりの発生頻度を各染色体の短腕、長腕別に示したが、統計学的解析の結果、発生頻度は at random ではなく、chromatid type と isochromatid type とともに No. 1 の染色体の長腕と X 染色体の短腕に発生率が高いことが判明した。van Steenis²⁸⁾ は同調培養された Rat kangaroo cell line を用いた X 線照射実験で、breakage の部位に

よる発生頻度は at random ではなく、照射時期によって breakage の好発部位が異っていることを報告している。van Steenis らは breakage の発生部位を Banding pattern の segment によって細分しているため、一概に著者の結果と比較することはできないが、自然発生的な breakage でも人工的に生起させた breakage でも、染色体の部位によって breakage の発生頻度が異なることは、Rat kangaroo cell の染色体の微細構造を解明する上で興味あることである。

図5には1細胞あたりの breakage の個数およびそれを保有する細胞数の頻度について各継代時ごとの推移を示し、図6には染色体1本あたりの breakage の頻度について各継代時ごとの推移を示したが、図5のカーブと図6のカーブはほぼ平行関係にある。このことから今後 Rat kangaroo cell line の breakage の頻度の指標として、これらのいずれの算出法を採用しても良いと考えられる。

ring chromosome は1600個の細胞中に4個しか観察されなかった。また Heyman—Zandstra⁸⁾ が報告しているような "gordian knot" は認められなかった。

exchange chromosome は1個のみ観察された。Rat kangaroo cell line で exchange chromosome が観察されたという報告はなく、今後さらに多数の細胞について検索する必要がある。

dicentric chromosome は高頻度(8.9%)に認められたが、各継代時の頻度は表1—4ならびに表5に示した。

Rat kangaroo cell line に見られる dicentric chromosome については、Levan ら⁶⁾ および Levan⁷⁾ は特別のタイプの dicentric chromosome であると述べている。すなわち dicentric chromosome は一般には決して acentric fragment を伴うのであるが²⁹⁾、Levan は Rat kangaroo cell line では acentric fragment を伴うことはまれであったと報告している。これは著者の観察結果と同一である。さらに著者はこの dicentric chromosome の QM による蛍光染色の Banding pattern より、この dicentric chromosome は染色体の欠失を伴わず、その端部と端部が単に結合することによって形成されていることを確認した。Levan⁷⁾ もこの dicentric chromosome の長さや形態から端部と端部が単に結合して形成されていると推測している。このような dicentric chromosome を形成する原因は不明であるが、Levan⁷⁾ はこの cell line

の染色体の端部には、切断された染色体の断端のような特別な付着しやすい性質を所持しているのではないかと推測している。著者は図4(F-b)のような、同一染色体内で長腕染色分体端部が相互に結合し、一種の

Ring form を形成しているのをしばしば観察した。これを著者は arm end fusion (分体端部結合)と仮称したが、この arm end fusion は Levan のいう染色体端部の sticky な性質の推論の一つの証左であろう。

またこの dicentric chromosome には、形成しやすい染色体の組み合わせがあるのではないかと考え、蛍光染色による Banding pattern によって、dicentric chromosome を構成している2本の染色体の同定を行なった。検索の結果は表4に示し、その結果を統計学的に解析した。その結果 dicentric chromosome を形成する染色体の組み合わせは at random で、特に dicentric chromosome を形成しやすい染色体の組み合わせがないことが判明した。Levan⁷⁾ も22個の dicentric chromosome について同様の検索を行なった結果、特に dicentric chromosome を形成しやすい染色体の組み合わせはなかったと報告している。Levan の染色体同定法は染色体の長さや形態によって検索したものであるが、著者はより正確を期するため、最近開発された染色体の Banding pattern による染色体同定法を採用した。

Banding pattern による染色体同定法には、蛍光染色法 (Casperson ら³⁰⁾、尿素処理法 (Shiraishi ら³¹⁾)、ASG 法 (Sumner) ら³²⁾、Trypsin 処理法 (Seabright³³⁾) など種々の方法が開発されている。ヒトの染色体では、いずれの方法もほぼ同一の Banding pattern が得られるが、他の動・植物では、種によって Band 構造がまったく認められないものや、方法によって Band 構造の鮮明さに差があり、ヒトの染色体の場合と手技の上で多少変更が必要になってくる。

著者は Trypsin 処理法や尿素処理法で明瞭な Band 構造を認めたが、QM による蛍光染色では、Band 構造はやや不明瞭であったが、ほぼ目的は達せられた。蛍光染色法よりも Trypsin 処理法の方が Rat kangaroo cell の染色体の解析に有利であることは、Grewal³⁴⁾ や Brown ら¹¹⁾ の Banding pattern やその分析写真からも推測される。しかし今回の著者の検索には、一度 Giemsa 染色を施し鏡検、確認した同一の核板を脱色し、Band 構造を得る必要があった。ASG 法、Trypsin 処理法、尿素処理法は染

色体表面の微妙な処理によって Band 構造を得る方法であり、一度染色し脱色した標本にはこれらの方法は使用できない。したがって Band 構造がいくぶん不明瞭であっても QM による蛍光染色を採用せざるを得なかった。

以上 Rat kangaroo cell line に観察された高頻度の数的ならびに構造的異常の様相を解明してきたが、培養細胞でこのような高頻度の異常が毎世代生じていることについて推論してみたい。

ヒトの悪性腫瘍細胞は、正常染色体とは異った染色体構成をもつことが多くの例で認められている一方、正常体細胞は2倍数の染色体をもち、染色体上の変異の存在は非常にまれである。このような両細胞間に存在している顕著な染色体上の相違が何に起因し、腫瘍の発生や増殖にいかなるかわかりをもっているかは、悪性腫瘍の染色体研究における最重要問題である。しかし現在でも十分明解な答が得られているとはいえない。一方 cell strain が cell line に変化し、その正常核型を消失する過程は、機能的に正常細胞が *in vivo* で悪性腫瘍細胞に変化するに匹敵する過程であろう。両者の場合とも、細胞の限定された生存期間は無限の生存期間へと変化し、染色体上の変化は、一つの生存形態からもう一つの生存形態への、遺伝的適応の表徴あるいは指標ともみなしうる。cell strain が cell line に変化するのも、正常細胞が悪性腫瘍細胞に変化するのも、その変化の原因はウイルス感染であるらしいことは非常に注目される。両者の場合とも、転換の初期徴候は染色体の数的ならびに構造的異常といった不安定性である³⁵⁾。この不安定性によって遺伝的多様性 (genetic polymorphism) が生じ、そこから新しい stem line が次第に淘汰されてくる。Rat kangaroo cell line は8代にわたって、毎世代染色体の数的ならびに高頻度の構造異常を伴う変動を示している。この変動は悪性腫瘍細胞の持続的な変化にも匹敵し、環境に対する細胞遺伝学的な淘汰を示していると考えたい。

結 語

Rat kangaroo (*Potorous tridactylis*) の細胞においては、その染色体数が少ないこと (♂ : $2n=13$, ♀ : $2n=12$) や特徴的な形態などから、*in vitro* の染色体上の変化の解析には理想的である。著者は *in vitro* で24代から31代にわたって継代を続けた雌の Rat kangaroo cell line について、毎継代時ごとに200個、総計1600個の細胞について細胞遺伝学的検索を行ない、染色体上の変化を追求し、

次に総括するような結果を得た。

1. 各継代時の細胞の染色体数の分布では、総染色体数が11本の細胞が一貫して main stemline となっていて、各継代時にはいくつかの side line が認められ一定していなかった。しかし8代にわたって、モードは一貫して2倍体域に認められるが、3倍体域が次第に増加する傾向にあった。

2. 染色体の構造異常は高頻度に認められた。それぞれの構造異常の全細胞に占める頻度は、chromatid gaps or breaks (18.4%), isochromatid gaps or breaks (7.9%), ring chromosomes (0.3%), exchange chromosomes (0.06%), acentric fragments (1.9%), dicentric chromosomes (8.9%) であった。

3. chromosomal breakage については、頻度は各継代時では増減が認められるが [chromatid type (10.5%~29.5%), isochromatid type (3.5%~11.0%)], 特別の増加、減少傾向は認められなかった。また chromatid type と isochromatid type とともにNo.1の染色体の長腕とX染色体の短腕に breakage の発生率の高いことが判明した。

4. QM による蛍光染色による Banding pattern ではNo.1とNo.2の染色体には各3種類が、X染色体には2種類がそれぞれ新しく区別され、それらを仮に1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, Xa, Xb と命名した。

5. dicentric chromosome については、acentric fragment を伴うことはまれで、QM による蛍光染色の Banding pattern より、この dicentric chromosome は染色体の欠失を伴わず、その端部と端部が単に結合して形成されていることが確認された。その証左の一つとして著者は arm end fusion をしばしば観察した。

6. 蛍光染色による Banding pattern で dicentric chromosome の構成を検索し、dicentric chromosome を形成している染色体の組み合わせは at random で特に形成しやすい組み合わせがないことが判明した。

さらに、これらの数的ならびに構造的変化について、他の研究者の観察結果との異同について考察を加えた。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師松田健史助教授に心から感謝いたします。また細胞を分与していただいた米国 Roswell Park Memorial Institute 養和田潤博士に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Shaw, M. W. & Krooth, R. S. : Cytog., 3, 19 (1964).
- 2) Hayman, D. L. & Martin, P. G. : Cytog., 4, 209 (1965).
- 3) Moore, R. : Cytog., 4, 145 (1965).
- 4) Sharman, G. B. & Barber, H. N. : Heredity, 6, 345 (1951).
- 5) Walen, K. H. & Brown, S. W. : Nature, 194, 406 (1962).
- 6) Levan, A., Nichols, W. W. & Peluse, M. : Chromosoma (Berl.), 18, 343 (1966).
- 7) Levan, G. : Hereditas, 64, 85 (1970).
- 8) Heyman-Zandstra, K. & van Steenis, H. : Genetica, 43, 31 (1972).
- 9) van Steenis, H. : Genetica, 44, 110 (1973).
- 10) Brown, J. A. & Cohen, M. M. : Can. J. Genet. Cytol., 15, 135 (1973).
- 11) Brown, J. A. & Cohen, M. M. : Can. J. Genet. Cytol., 15, 145 (1973).
- 12) German, J. (ed.) : Chromosomes and Cancer, 1st ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., 1974.
- 13) German, J. : Birth Defects: Original Article Series, 5, 117 (1969).
- 14) Sandberg, A. A. & Hossfeld, D. K. : Ann. Rev. Med., 21, 379 (1970).
- 15) Koller, P. C. : In Resent Results in Cancer Research, 38, Berlin, Springer-Verlag, 1972.
- 16) Moore, G. E., Sandberg, A. A. & Ulrich, K. : J. Nat. Can. Inst., 36, 405 (1966).
- 17) Hanks, J. H. & Wallace, R. E. : Proc. Soc. exp. Biol., 71, 196 (1949).
- 18) 松田健史 : 臨床病理, 22, 203 (1974).
- 19) Todaro, G. & Green, H. : J. Cell Biol., 17, 299 (1963).
- 20) Katz, M. & Koprowski, H. & Moorhead, P. : Expl. Cell Res., 57, 149 (1969).
- 21) Hayflick, L. & Moorhead, P. : Expl. Cell Res., 25, 585 (1961).
- 22) Heneen, W. K. : Chromosoma (Berl.), 29, 88 (1970).
- 23) Heneen, W. K. : Hereditas, 67, 221 (1971).
- 24) Heneen, W. K. : Hereditas, 67, 251 (1971).
- 25) Legator, M. S. : Chemical Mutagenesis in Mammal, and Man (ed. Vogel, F. and Röhrborn, G.) p.232, Berlin. Springer, 1970.
- 26) Basehoar, G. : Science, 179, 1333 (1973).
- 27) Bloom, A. D. : Advances in Human Genetics (ed. Harris, H. & Hirshhorn, K.) Vol. 3, p.99-172, New York-London. Plenum press, 1972.
- 28) van Steenis, H., Tuscan, R. & Leigh, B. : Mutation Res., 23, 223 (1974).
- 29) 阿波章夫 : 小児医学, 6, 185 (1973).
- 30) Caspersen, T., Zech, L., Johansson, C. & Modest, E. J. : Chromosoma (Berl.), 30, 215 (1970).
- 31) Shiraish, Y. & Yosida, T. H. : Proc. Japan Acad., 47, 729 (1971).
- 32) Sumner, A. T., Evans, H. J. & Backland, R. A. : Nature New Biol., 232, 31 (1971).
- 33) Seabright, M. : Lancet, ii, 971 (1971).
- 34) Grewal, M. S., Dev, V. G., Miller, D. A. & Miller, O. J. : Expl. Cell Res., 69, 241 (1971).
- 35) German J. : In progress in Medical Genetics (ed. Steinberg, A. G. & Bearn, A. G.) Vol. 8, p.61-101, New York. Grune & Stratton, 1972.

Abstract

Cells of the rat kangaroo (*Potorous tridactylis*) are ideal for the analysis of chromosomal changes *in vitro*, because they have a low number of chromosomes ($2n=12$ in the female and 13 in the male) and unique chromosome morphology.

The chromosomal changes that occurred during the *in vitro* cultivation of a female rat kangaroo cell line were followed from passage 24 to 31, and the results were reported in this paper.

In each passage, two hundred well-spread metaphase plates were randomly

selected and examined for the chromosomal analysis.

The results obtained were summarized as follows.

1) The examination of the chromosome numbers showed that even though 11 was the stemline number all through the present period of observation, new sidelines appeared from time to time.

From passage 24 to 31, a large portion of the population still remained diploid, with an increasing number of tetraploid cells appearing.

2) In this cell line, various structural aberrations, such as chromatid gaps or breaks (18.4%), isochromatid gaps or breaks (7.9%), ring chromosomes (0.3%), exchange chromosomes (0.06%), acentric fragments (1.9%), dicentric chromosomes (8.9%) and arm end fusions, were observed in a very high frequency.

3) Estimates of the frequency of chromosomal breakage showed considerable variation, ranging from 10.5% to 29.5% (chromatid type) and from 3.5% to 11.0% (isochromatid type).

The distribution of breaks or gaps in chromosome region exhibited a significant nonrandomness, with an excess of breaks or gaps in the long arm of No. 1 chromosome and the short arm of X chromosome.

4) The quinacrine fluorescence pattern had newly permitted identification of three types of each No. 1 and No. 2 chromosome and two types of X chromosomes.

Those were numbered 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, Xa and Xb by the present author.

5) The dicentric chromosomes in this line were not associated with acentric fragments.

Based on the quinacrine fluorescence pattern, most of the dicentric chromosomes confined to consist of two complete chromosomes joined at the end of their long arms, or occasionally of their short arms.

6) Components of the dicentric chromosomes were analyzed with the fluorescence banding pattern.

A test was made whether specific chromosome types were favored as participants in dicentric chromosomes, and it was concluded that no significant difference existed between the values found and expected at random.

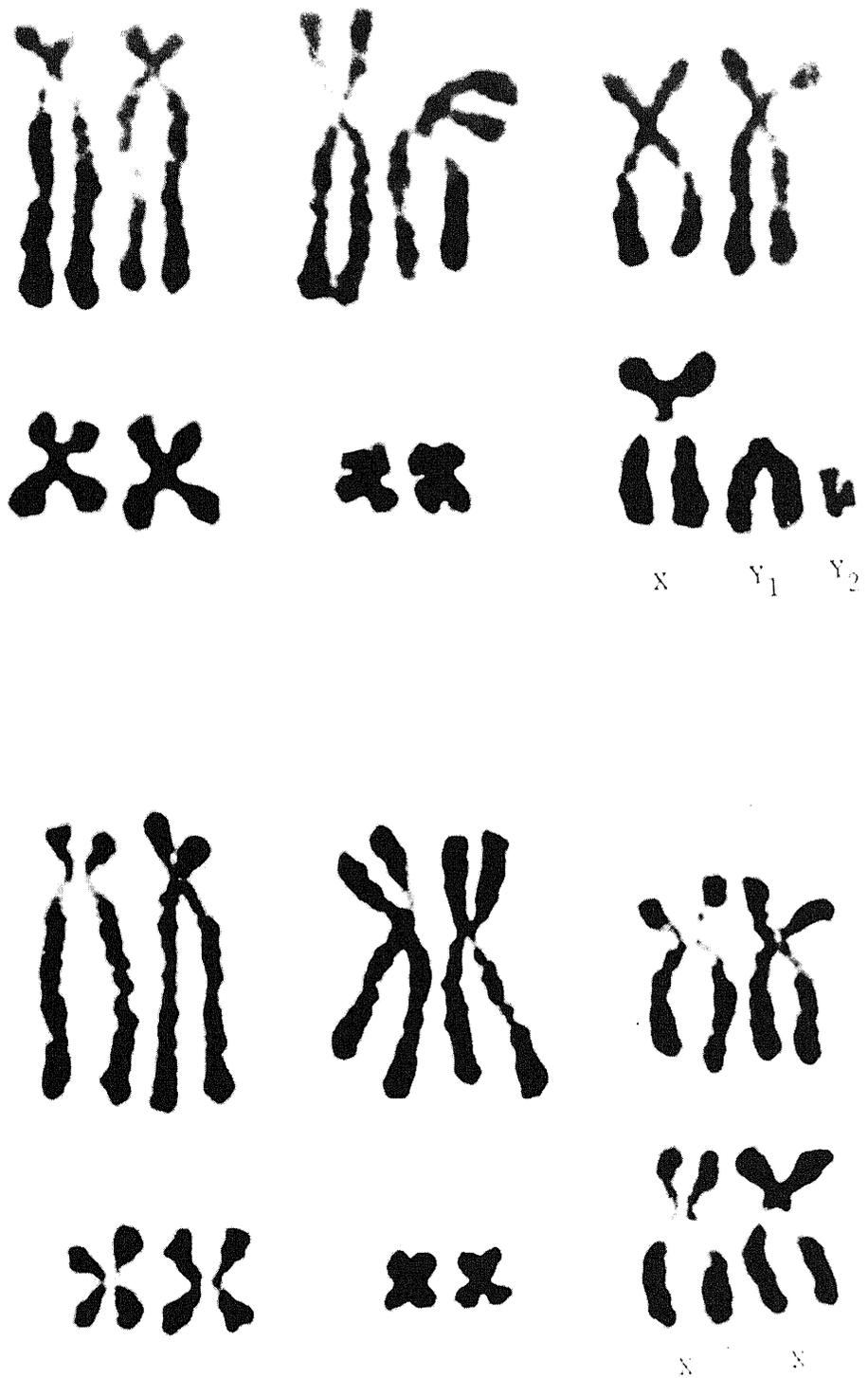


図1 Rat kangaroo cell の正常染色体核型 (An atlas of mammalian chromosomes (ed. Hsu, T. C. & Benirshke, K.) より引用)

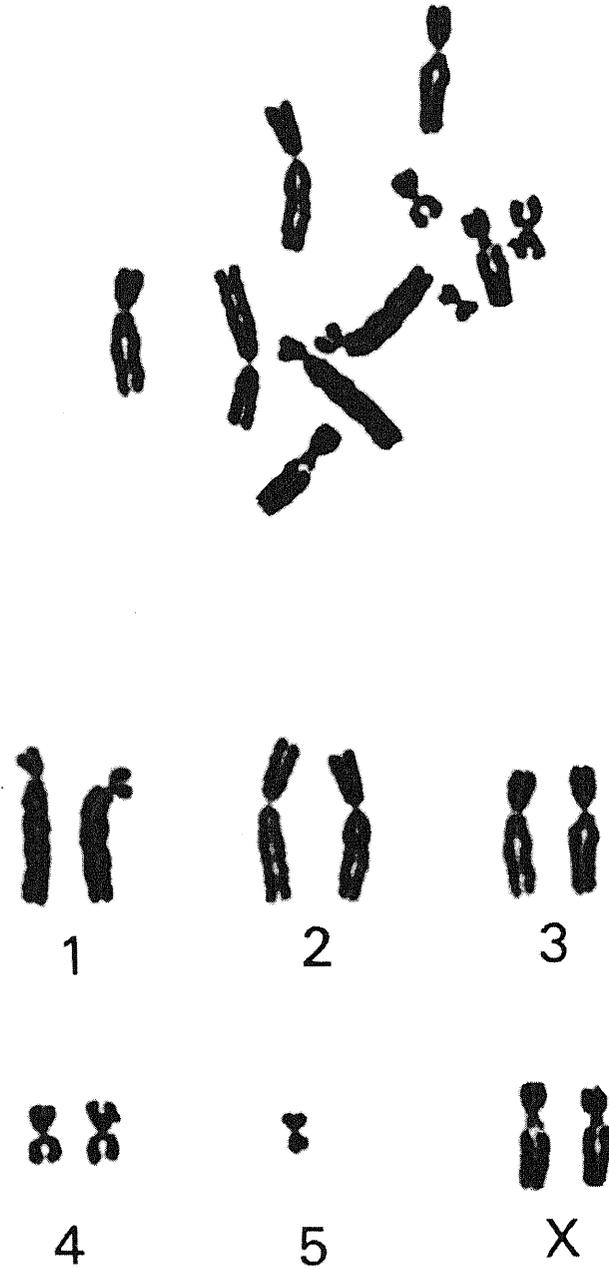


図2 Main stemline の核型

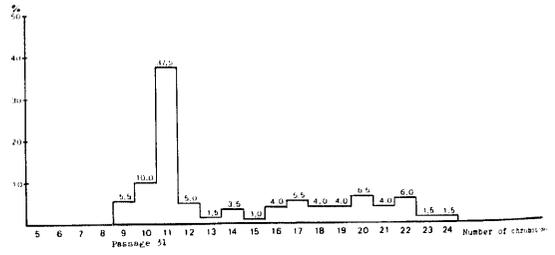
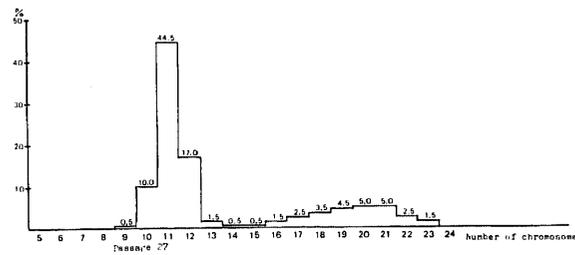
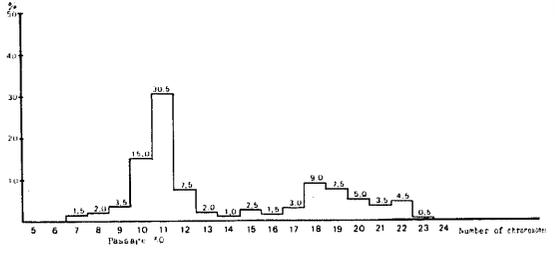
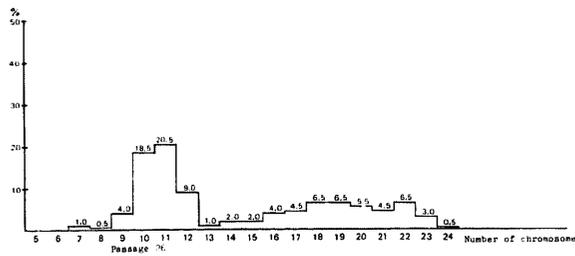
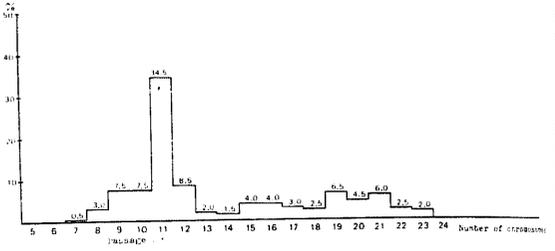
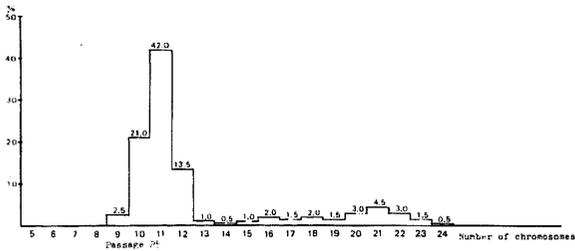
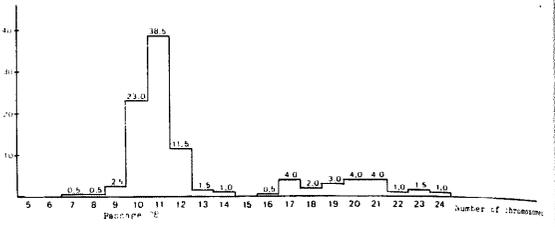
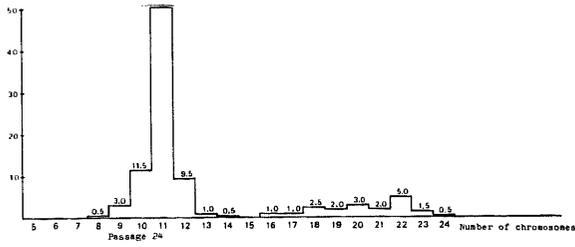
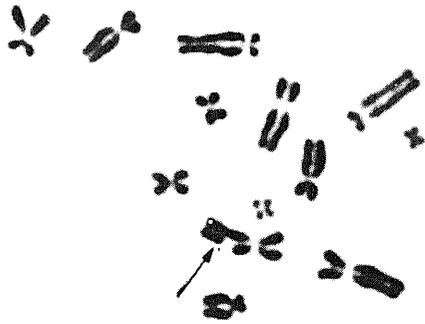
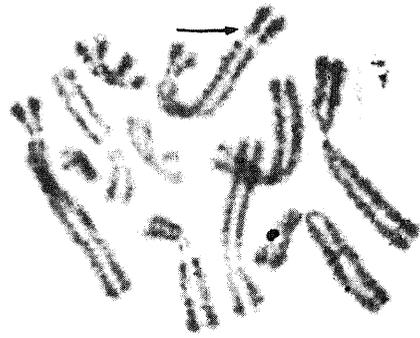


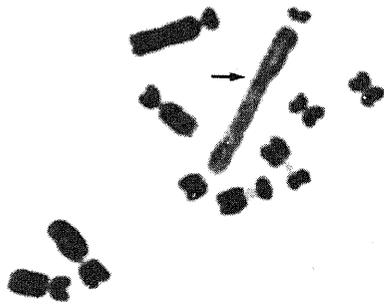
図3 各継代時における細胞の染色体数の分布とその推移



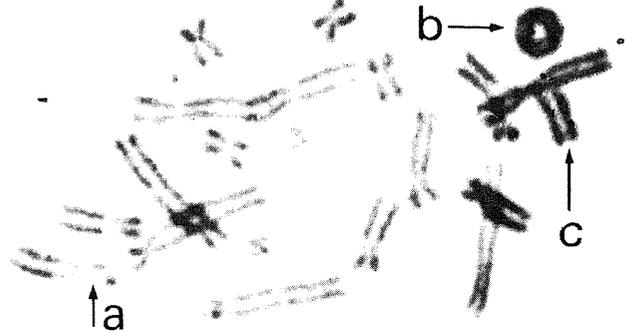
A. chromatid gap or break



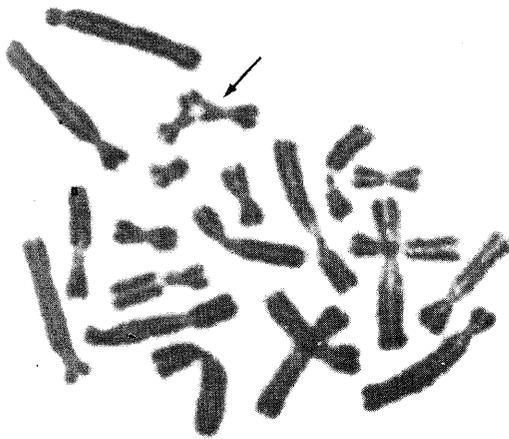
B. isochromatid gap or break



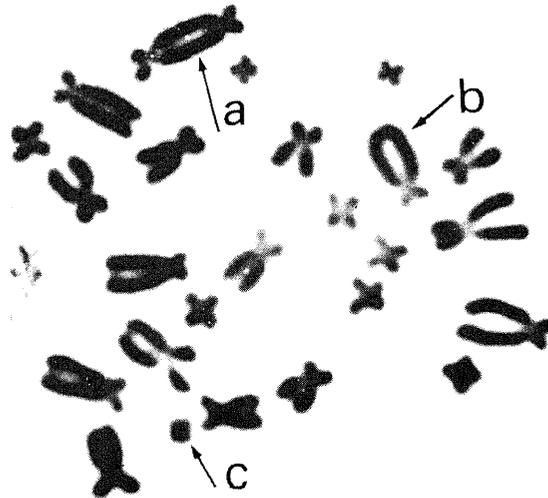
C. dicentric chromosome



D - a. chromatid gap or break
- b. ring chromosome
- c. acentric fragment



E. exchange chromosome



F - a. dicentric chromosome
- b. arm end fusion
- c. acentric fragment

図4 培養各代において観察された染色体の構造的異常の種類

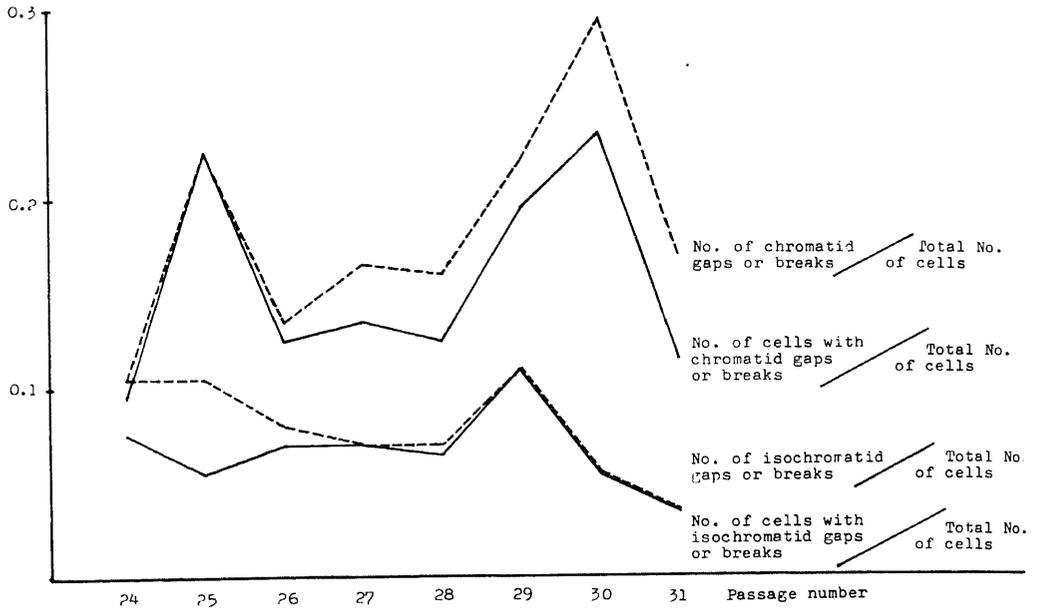


図5 1細胞あたりのchromosomal breakageの個数とそれを保有する細胞数の頻度の各継代時の推移

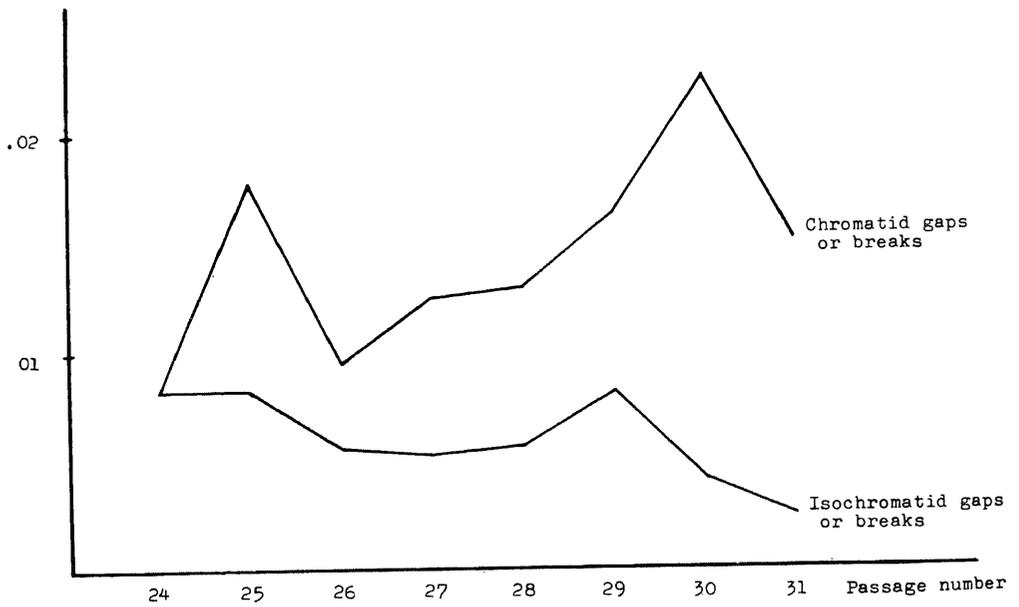


図6 染色体1本あたりのchromosomal breakageの頻度の各継代時の推移

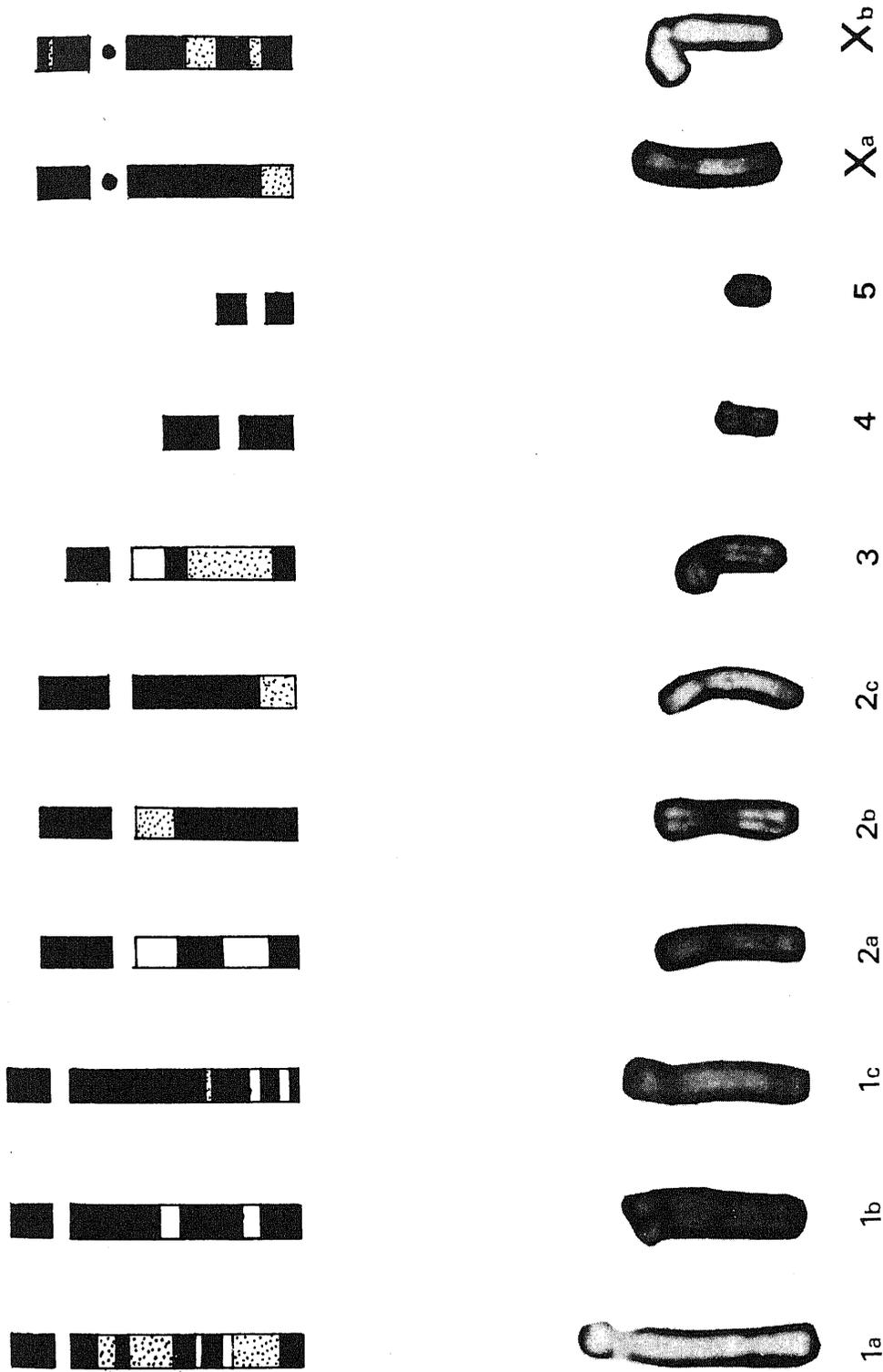


図7 QMによる各染色体のBanding pattern

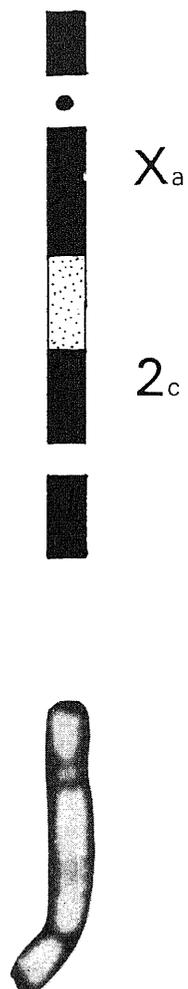


図8 QMによるBanding pattern によつて
dicentric chromosome を構成している2本の染色体
を同定した1例