

# 培養Rat Kangaroo(Ptk1)cell lineにみられた染色分体端部結合について

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8904">http://hdl.handle.net/2297/8904</a>

## 培養 Rat kangaroo (Ptk<sub>1</sub>) cell line にみられた 染色体分体端部結合について

富山医科薬科大学医学部解剖学第1講座

松 田 健 史  
森 沢 佐 歳  
武 田 公 男

(昭和56年3月13日受付)

Key words Ptk<sub>1</sub> cell line, Chromatid end fusion, Chromosome

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<sup>1)</sup>によって5対の常染色体は、大きさの順

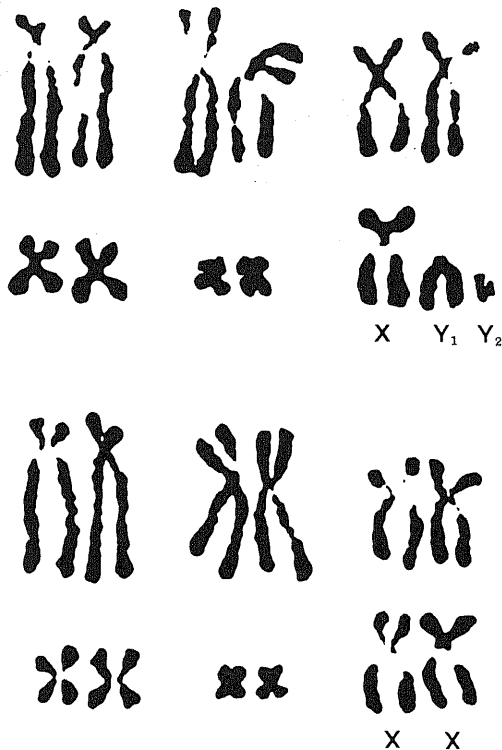


Fig. 1. Normal karyotype of the rat kangaroo cell

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<sub>1</sub>とY<sub>2</sub>と命名された。しかしHaymanら<sup>2)</sup> Moore<sup>3)</sup>のようにY<sub>1</sub>とY<sub>2</sub>を逆に記載しているものもある。

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。<sup>4)-6)</sup>

著者の1人である武田<sup>6)</sup>はRat kangaroo cell lineの細胞遺伝学的検索を行ない、このcell lineにおいて、同一染色体内で、長腕の染色体分体端部が相互に結合し、ring formを形成している一種の構造異常をしばしば観察し、arm end fusion (分体端部結合)と仮称した。

今回は分体端部結合の出現頻度等を報告し、染色体分体端部の結合であるので、arm end fusion (分体端部結合)を改称し、chromatid end fusion (染色体分体端部結合)と命名したい。

### 材料および方法

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。細胞はRPMI 1640<sup>10)</sup>と15% fetal calf serumを加えたMediumで37℃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

The Chromatid End Fusion Found in a Cell Line of the Rat Kangaroo (Ptk<sub>1</sub>), Cultured *in Vitro*. Takeshi Matsuda, Satoshi Morisawa & Kimio Takeda, Department of Anatomy (I), School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University.

胞遺伝学的検索をおこなった。すなわち培養6日目に  
 コルヒチン(最終濃度0.2 $\gamma$ /ml)に4時間暴露したの  
 ち、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)<sup>11)</sup>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 の割り合いの溶液で低調処理を行ない、  
 3:1 methanol-glacial acetic acid 液で固定した。

空気乾燥法で標本を作製し、染色体分析を行なった。  
 なお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<sup>12)</sup>によった。

染色体分析はこの cell line の第 24 代から 31 代に  
 わたって、総計 250 個の細胞を任意に選んで行なった。

### 成 績

検索を行なった cell line は第 24 代から 31 代にわ

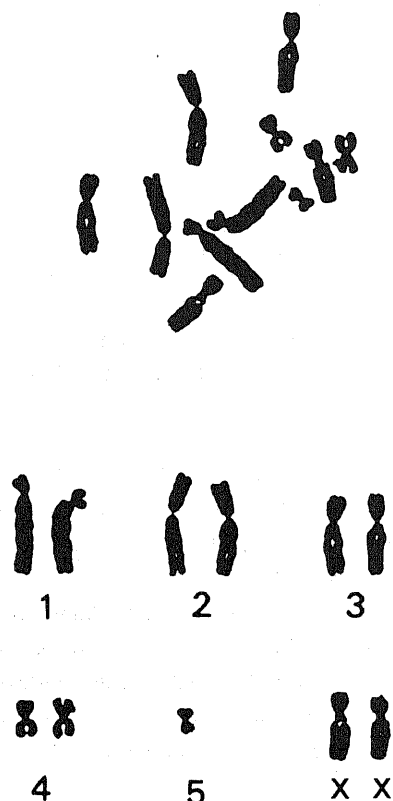


Fig. 2. Karyotype of the main stemline

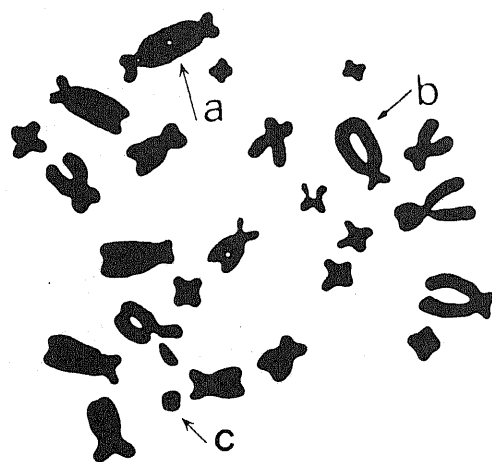


Fig. 3. A metaphase plate with Cef  
 a. dicentric chromosome  
 b. Cef  
 c. acentric fragment

Table 1. Chromosomal identification in 250 cells

No.	Type	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	X
0		0	0	6	1	17	4
1		17	17	56	25	179	45(1)
2		131(1)	123	139(2)	161(2)	44	134(1)
3		56	63	33(1)	37(1)	8	50(3)
4		36	35(3)	15(1)	23(1)	2	9
5		9	11(2)	1	3	0	6(4)
6		1	1	0	0	0	2
Total		250(1)	250(5)	250(4)	250(4)	250(0)	250(9)

( ): In parenthesis is shown the frequency of Cef.

たつて、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" (Todaro ら<sup>13)</sup>)あるいは "crisis" (Katz ら<sup>14)</sup>)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。図3には染色体分体端部結合

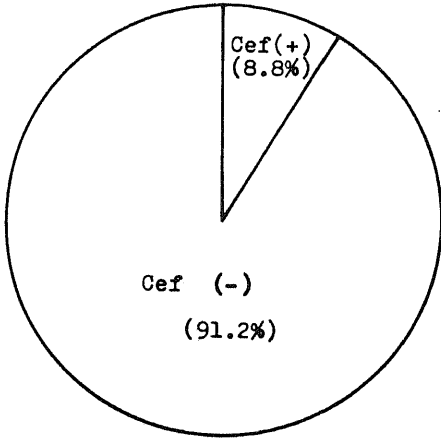


Fig. 4. Frequency of cells with chromatid end fusion (Cef).

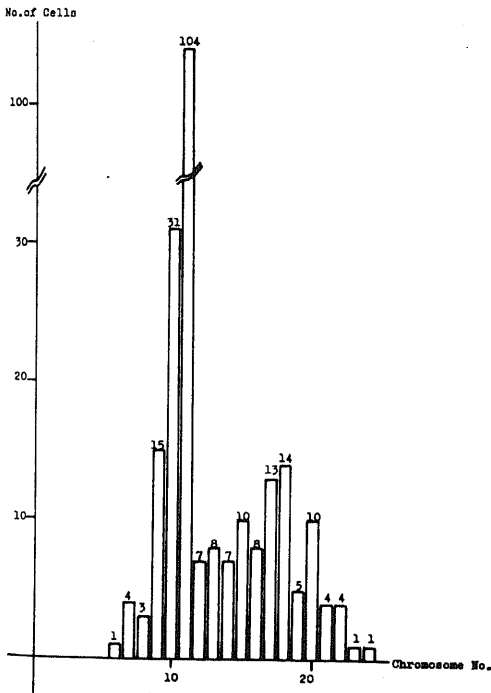


Fig. 5. Total chromosome number in 250 cells.

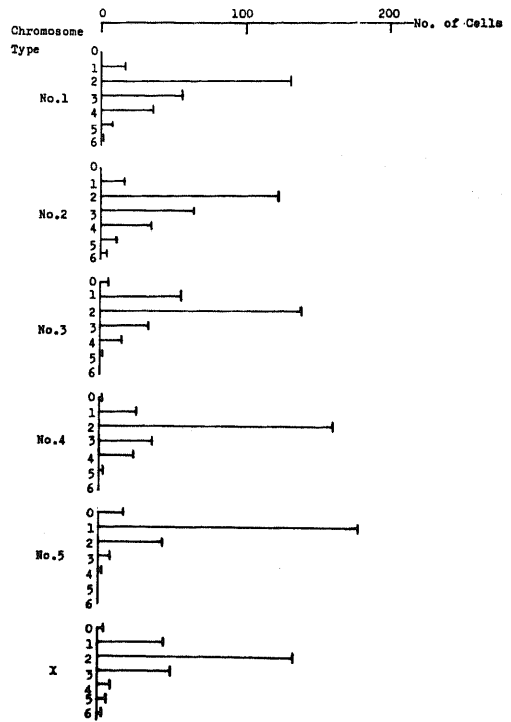


Fig. 6. Chromosomal identification in 250 cells

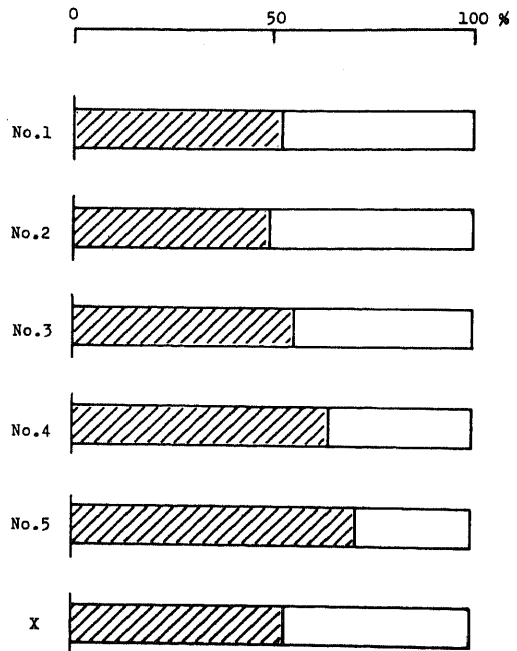


Fig. 7. Aneuploid frequency in each chromosome type (250 cells)

chromatid end fusion(以下 Cef と省略する)を有する 1 核板を例示した。

## A)

表 1 には 250 個の細胞を検索し、1 細胞当たりの染色体数と各染色体別とに分類した細胞数を示した。括弧内数は Cef を有する細胞数を示している。なお Cef を有する細胞のうちの 1 細胞で、No. 3 と X 染色体で重複して Cef を有するものが観察された。すなわち Cef を有する細胞数は 22 で、23 個の Cef が観察された。これは図 4 に示すごとく、全 250 細胞中 8.8% に当たる。図 5 には全 250 細胞の染色体数別の細胞数を示した。図 6 には全 250 細胞の染色体数別の細胞数をさらに各染色体別に細別した細胞数を示した。No. 1, 2, 3, 4, 及び X 染色体各 2 本、No. 5 染色体が 1 本の

細胞が多く、異数性を示す細胞が少ないことを示している。このようにこの cell line は No. 1, 2, 3, 4, 及び X 染色体が各 2 本、No. 5 染色体が 1 本の核型を基本型としているが、図 7 には各染色体について、この基本数と異なる異数性を示した細胞の割り合いを示した。斜線で示した部分が基本数をもった細胞の割り合いを示している。表 2 には基本数をもった細胞と異数性を示した細胞の実数値を示した。括弧内数は期待値を示している。

その結果 No. 5 の染色体で異数性を示す細胞が少ないことが判明した。

## B)

表 3 には Cef を有していない 228 細胞中で、1 細胞当たりの染色体数と各染色体別に分類した細胞数を示

Table 2. Incidence of numerical aberration in each chromosome type.

Type	Normal	Aberrant	Total
No. 1	131(144.5)	119(105.5)	250
No. 2	123(144.5)	127(105.5)	250
No. 3	139(144.5)	111(105.5)	250
No. 4	161(144.5)	89(105.5)	250
No. 5	179(144.5)	71(105.5)*	250
X	134(144.5)	116(105.5)	250
Total	867	633	1500

$$X^2_s = 36.86 > X^2_{0.01}(d.f.=5)$$

$$X^2_{No.5} = 11.28 > X^2_{0.05}(d.f.=5)$$

Table 3. Chromosomal identification in 228 cells without Cef.

Type No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	X
0	0	0	6	0	16	4
1	14	16	52	23	167	40
2	124	115	131	155	36	128
3	54	60	27	30	7	45
4	29	28	11	18	2	8
5	7	8	1	2	0	2
6	0	1	0	0	0	1
Total	228	228	228	228	228	228

した。図8には228細胞の染色体数別の細胞数を示した。図9には228細胞中で、各染色体について、異数性を示す細胞の割合を示した。

C)

表4にはCefを有する22細胞中で、1細胞当たりの染色体数と各染色体別に分類した細胞数を示した。

CefはNo.1染色体に1本、No.2染色体に5本、No.3染色体に4本、No.4染色体に4本、X染色体に9本出現している。このX染色体における出現は他の染色体での出現より有意に大である。図10には22細胞の染色体数別の細胞数を示した。図11にはさらに各染色体数別に細別した細胞数を示した。図12には、Cefを有する22細胞中で、各染色体について、異数性を示す細胞の

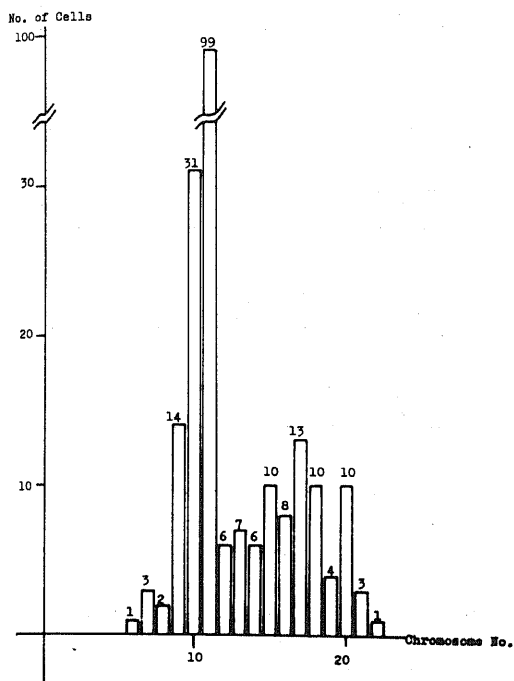


Fig. 8. Total chromosome number in 228 cells without Cef.

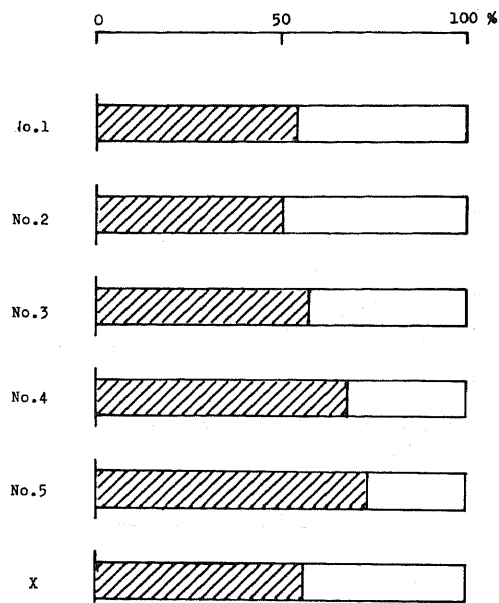


Fig. 9. Aneuploid frequency in each chromosome type in 228 cells without Cef.

Table 4. Chromosomal identification in 22 cells with Cef.

Type No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	X
0	0	0	0	1	1	0
1	3	1	4	2	12	5 (1)
2	7 (1)	8	8 (2)	6 (2)	8	6 (1)
3	2	3	6 (1)	7 (1)	1	5 (3)
4	7	7 (3)	4 (1)	5 (1)	0	1
5	2	3 (2)	0	1	0	4 (4)
6	1	0	0	0	0	1
Total	22 (1)	22 (5)	22 (4)	22(4)	22 (0)	22 (9)

( ): In parenthesis is shown the frequency of Cef.

割り合いを示したが、Cefを有する細胞においては異数性を示す細胞が少ない。

次にCefを有する細胞が、2n領域(染色体数が16未満)、3n領域(染色体数が16以上18未満)、及び4n領域(染色体数が18以上)のいずれの領域に分布しやすいかについて $\chi^2$ 検定を行わない、これを表5に示し

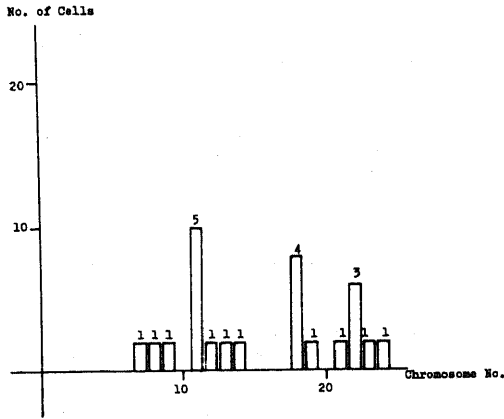


Fig. 10. Total chromosome number in 22 cells with Cef.

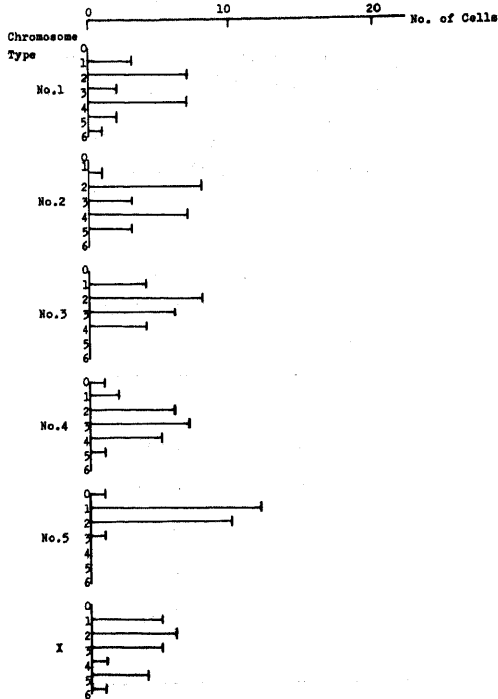


Fig. 11. Chromosomal identification in the cells with Cef.

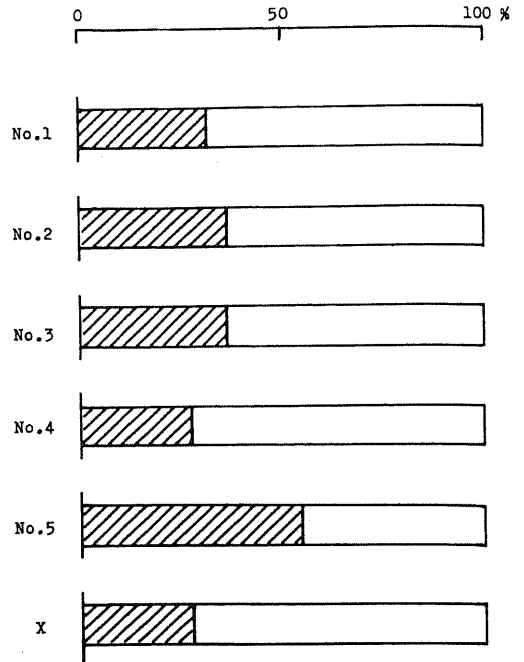


Fig. 12. Aneuploid frequency in each chromosome type in 22 cells with Cef.

Table 5.  $\chi^2$ -Test-Distribution of Cef(+) Cells between 2n & 3n, 4n.

	Chromosomal Number		Total
	< 16	$\geq 16$	
Cef (-)	179 (173.3)	49 (54.7)	228
Cef (+)	11 ( 16.7)	11 ( 5.3)*	22
<b>Total</b>	<b>190</b>	<b>60</b>	<b>250</b>

$$X^2_s = 8.94 > X^2_{0.01} (d.f.=1)$$

$$X^2_{Cef(+)} = 6.13 > X^2_{0.05} (d.f.=1)$$

	Chromosomal Number		Total
	< 18	$\geq 18$	
Cef (-)	200 (192.4)	28 (35.6)	228
Cef (+)	11 ( 18.6)	11 ( 3.4)**	22
<b>Total</b>	<b>211</b>	<b>39</b>	<b>250</b>

$$X^2_s = 21.68 > X^2_{0.01} (d.f.=1)$$

$$X^2_{Cef(+)} = 16.99 > X^2_{0.01} (d.f.=1)$$

た。その結果 Cef を有する細胞は 3n 領域と 4n 領域に数多く出現していることが判明した。

### 考 察

培養 Rat kangaroo cell line における染色体の構造異常については、Levan ら<sup>4)</sup>によって初めて指摘され、その後 Levan<sup>5)</sup>, Heyman-Zandstra ら<sup>6)</sup>, van Steenis<sup>7)</sup>, Brown ら<sup>8)</sup>が言及しているが、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認められなかった。そこで前回著者の一人である武田<sup>9)</sup>は 8 代にわたる Rat kangaroo cell line を検索し、その構造異常の頻度及びその変動について報告した。この検索中に図 3 に例示したごとく、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、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 arm end fusion (分体端部結合) と仮称した。

しかし染色分体端部の結合であるので、これを chromatid end fusion (染色分体端部結合) と改称した方が適當すると考えている。

著者らが調べ得た範囲では、Rat kangaroo cell line において Cef の存在について言及しているものはない。しかし Levan<sup>5)</sup> 及び武田<sup>9)</sup>はこの cell line の dicentric chromosome を分析し、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、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。

また Levan<sup>5)</sup> の染色体分析写真の中には Cef を有すると考え得る核板が確認される。これらの染色体断端の sticky な性質等から、この Rat kangaroo cell line では、Cef がかなり恒常的に存在するものである事は確実である。図 6 並びに表 2 より、全 250 細胞では異数性を示す細胞が少なく、特に No. 5 の染色体で異数性を示す細胞が少ないことが判明した。図 9 には Cef を有しない 228 細胞で、異数性を示す細胞の割合を示したが、No. 5 の染色体が 1 本の正常な細胞が多いことがわかる。

しかし図 12 に示したように Cef を有する 22 細胞と比較すると正常型のものが少なく、異数性を示すものが多い。特に No. 1, No. 4, X 染色体でこのことは指摘できる。

表 4 には Cef を有する 22 細胞で、1 細胞当たりの染色体数と各染色体別に分類した細胞数を示したが、Cef は No. 1 染色体に 1 本, No. 2 染色体に 5 本, No. 3 染色

体に 4 本, No. 4 染色体に 4 本, X 染色体に 9 本出現した。この X 染色体における出現は他の染色体での出現より有意に大である。

図 12 には、Cef を有する 22 細胞中で、各染色体について、異数性を示す細胞の割合を示したが、Cef を有する細胞においては異数性を示す細胞が少ない。この事は形態学的には橋形成から遅滞現象をおこすからではないかと考えられる。また表 5 に示したように、Cef を有する細胞が、2n 領域、3n 領域、4n 領域のいずれの領域に分布しやすいかについて  $\chi^2$  検定を行なった。その結果 Cef を有する細胞は 3n 領域と 4n 領域に数多く出現していることが判明した。このことは Cef を有することが逆に修復機構として働いて染色体数が少ないものが出現してくるのではないかと考えられる。

### 結 論

第 24 代から 31 代の 8 代にわたって、雌の Rat kangaroo cell line の染色体分析を行なった。各継代時の総計 250 個の細胞を任意に抽出し、22 細胞 (8.8%) に chromatid end fusion (Cef) が認められた。Cef は X 染色体に有意に多く出現し、また Cef を有する細胞は 3n 及 4n 領域に分布し、Cef を有する細胞においては異数性を示す細胞が少ない。このことは Cef が修復機構として働いているためと思われる。

### 〔文 献〕

- 1) Shaw, M. W. and Krooth, R. S. : The chromosomes of the Tasmanian rat kangaroo (*Potorous tridactylis apicalis*). *Cytog.*, 3, 9-33(1964).
- 2) Hayman, D. L. and Martin, P. G. : An autoradiographic study of DNA synthesis in the sex chromosomes of two Marsupials with an XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>. *Cytog.*, 4, 209-218(1965).
- 3) Moore, R. : A biometric analysis of the chromosomes of the Marsupials-Macropus major, Macropus rufus and Potorous tridactylis. *Cytog.*, 4, 145-156(1963).
- 4) Levan, A., Nichols, W. W., Peluse, M. and Coriell, L. L. : The stemline chromosomes of three cell lines representing different vertebrate classes. *Chromosoma (Berl)*, 18, 343-358(1966).
- 5) Levan, G. : Contributions to the chromosomal characterization of the Ptk 1 Rat kangaroo cell line. *Hereditas*, 64, 35-96(1970).
- 6) Heyman Zandstra, K. and van Steenis, H. :



Chromosomal changes in three cell strains of the Tasmanian Rat-kangaroo, *Potorous tridactylis*, cultured in vitro (Marsupialia). *Genetica*, **43**, 31-38(1972).

7) **van Steenis, H.** Chromosomal changes in eight cell strains of the Tasmanian Rat-kangaroo, *Potorous tridactylis* (Marsupialia), male and female heart fibroblasts cultured in vitro. *Genetica*, **44**, 110-124(1973).

8) **Brown, J. A. and Cohen, M. M.** : The characterization of two established heteroploid lines (Indian muntjac and rat kangaroo) with a low chromosome number. I. In vitro karyotype evolution and cell cycle dynamics. *Can. J. Genet. Cytol.*, **15**, 135-143(1973).

9) 武田公男: 培養 Pat kangaroo cell line (Ptk, cell line) についての細胞遺伝学的研究, 十全医会誌, **85**, 472 - 490(1976).

10) **Moore, G. E., Sandberg, A. A. and Ulrich, K.** : Suspension cell culture and in vivo and in vitro chromosome constitution of mouse leukemia L1210. *J. Natl. Cancer Instit.*, **36**, 405 - 421(1966).

11) **Hanks, J. H. and Wallace, R. E.** : Relation of oxygen and temperature in the Preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **71**, 196-200(1949).

12) 松田健史: ヒト染色体の分析検査技術. 臨床病理, **22**, 203 - 207(1974).

13) **Todaro, G. and Green, H.** Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.*, **17** 299-313(1963).

14) **Katz, M. and Koprowski, H. and Moorhead, P.** : Transformation of cells cultured from human brain tissue. *Exp. Cell Res.*, **57**, 149-153(1969).

**The Chromatid End Fusion Found in a Cell Line of the Rat Kangaroo (Ptk<sub>1</sub>), Cultured *in vitro*** Takeshi Matsuda, Satoshi Morisawa and Kimio Takeda, Department of Anatomy (I), School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, 930 – J. Juzen Med. Soc., **90**, 327–335 (1981)

**Key words:** Ptk<sub>1</sub> cell line, Chromatid end fusion, Chromosome  
**Abstract**

The chromosomal changes that occurred during the *in vitro* cultivation of a female Rat kangaroo cell line were analyzed from 24th to 31th passages. In these eight passages, 250 well-spread metaphase plates were randomly selected and examined for the chromosomal analysis. In this cell line, 22 (8.8%) cells with chromatid end fusion (Cef) were observed. Chromatid end fusions were frequently observed in the X chromosomes. The cells with Cef had a tendency to show triploidies and tetraploidies, but few aneuploidies were found in these cells. The Cef might be related to the repair mechanism.