

染色体分染法によるバンドの再現性と 染色体標本の保存条件

瀬戸 武司*・森山 信子**・石部 知行**

Takeshi SETO,* Nobuko MORIYAMA** and Tomoyuki ISHIGE**
Reproducibility of the C- and G-bands on the Chromosome
Specimens Preserved under Different Temperature

Abstract: Temperature conditions for preserving the unstained slide preparations of animal chromosomes were considered to improve reproducibilities of the C- and G-bands on the chromosomes after the differential stainings. Both mammalian and amphibian somatic cells were used for making chromosome preparations *in vivo* and *in vitro*. Differential stainings were applied to the slide preparations which were preserved for up to 6 months at certain temperatures as 4, -20, -70 and 36°C, respectively. Reproducibilities of the bands on the chromosomes were compared after various preservation periods.

The effective storage to prevent slide aging was much concerned with lower temperature under -20°C rather than low humidity or high temperature in dried condition. The chromosome specimens stored for 6 months at -20° and -70°C could produce nearly normal band patterns by the C-stains. In general, C-staining gave better reproducibility than G-staining in the same age of slides. No significant difference in producing the C-bands was detected between human and amphibian chromosomes stored under the low temperature. Low humidity, under 25% of relative humidity, helped to prevent the slide aging when compared with the unconditioned storage, but it was not as effective as the low temperature of 4°C. From these results, we presume that ages of the slide proceed denaturation of chromatin substances, especially DNA and/or protein, and that the deep freezing of the slides effectively prevent such denaturation; consequently, it makes good production of banding patterns.

はじめに

染色体分染法によって得られるCバンドやGバンドは、染色体標本の作製後の日数経過にともない、その再現性が失なわれる傾向が見られる。分染法は今や動物・

植物細胞を問わず、核型分析や遺伝子地図の作成に不可欠の技法であるだけに、バンドパターンが常に安定して得られるための条件を把握することは意義のあることである。バンドの再現性を高めることは、簡単でしかも信頼性の高い分染技法の開発をめざす研究者が、常に考慮するところであるが、これまでに再現性の低下をもたらすスライド標本の劣化を防ぐ条件を考えた上で、分染法を比較した研究は Wiscvoitch et al. (1974) を除いて

* 島根大学教育学部生物学研究室

** 島根医科大学泌尿器科学教室

見当らない。しかし彼らも、ヒト染色体のGバンド法で、標本作製後の日数 (age of slide) とそれによって変化する適正なトリプシン処理時間との関係を述べているに留まっている。

本研究では染色体分析をする材料の季節的な制約があったり、染色体標本作製後直ちに分染処理を施すことが困難で、長期にわたってスライド標本を保存する必要がある場合、どのような保存条件がもっとも適切で、以後のバンド出現の頻度を保ちうるかを検討し、分染法によるバンド生成の成否を左右する条件を考察しようとした。

標本の保存の良否を左右する条件として、温度、湿度、標本をとりまく気体の種類などが挙げられるが、今回は比較的条件を設定しやすい温度と湿度に注目し、有効な保存方法を調べた。

材 料 と 方 法

本研究で用いた染色体標本は、Table 1 に示したほ乳類及び両生類の体細胞から作製したものである。分裂細胞の獲得は、生体内に直接コレセミドを注入し、12ないし17時間をおいて腎、脾組織あるいは骨髓細胞を摘出する *in vivo* 法と、組織あるいは血液細胞を、一定期間初代培養して、ガラス器内での細胞増殖がおきてからコレセミド処理を行う *in vitro* 法の2通りを試みた。ほ乳類と両生類の体細胞培養の方法は、培養温度及び培養液に違いがあるため (Seto & Rounds 1968)、本研究での培養条件を併せて記した。

In vivo あるいは *in vitro* で得られた各種の分裂細胞

を用い、染色体標本を空気乾燥法 (Rothfels & Siminovich 1958) により作製した。作製後数時間自然乾燥させ、一部の標本をギムザ染色し、中期分裂像の有無を事前に確認した。乾燥したスライド標本は、ベークライト製格納箱 (オートラジオグラフ用感光暗箱) にシリカゲルと共に入れ密封したのち所定の温度条件下においた。

維持温度は、実験群に、4°C, -20°C, -70°C の3種類、C染色用の標本では 37°C も加え4種類、対照群には、室温 (20~30°C) に置いたもの、および低湿度 (相対湿度20%) の室温に置いたものの2種類とした。スライド標本は一定の保存期間をおいて順次取り出し分染処理をおこなった。各材料別の保存期間、これらに施した分染法およびその結果は Figs. 1, 2 に示す。

分染法はG染色 (Wang & Fedoroff 1972) とC染色 (Sumner 1972) の二通りを行った。ほ乳類細胞にはG染色を施し、G染色によってGバンドが生じない両生類細胞にはC染色を試みた。またヒトにはG, C染色法を試みた。それぞれの分染法によって現われるバンドの可否の判定は染色体標本作製直後に処理して得られたもっとも鮮明なバンドパターン (++++) を最高に、バンドの検出ができなかったもの (-) まで4段階 (+++, ++, +, -) でおこなった。

結 果

1. G染色を施したほ乳類の染色体バンドの再現性
染色体標本の作製後、G染色を施すに到るまでの標本の保存日数と保存された温度条件は、Fig. 1 に示した。保存条件を変え、一定期間後にG染色処理を行ったが、

Table 1. List of materials and methods for acquiring the mitotic chromosomes.

Materials	Cells	Technique for Obtaining the Mitosis
<u>Mammals</u>		
Human, adult male and female	peripheral blood	72 hrs culture <i>in vitro</i> at 37°C in RPMI 1640 medium plus 3% PHA-M
Rat, Wistar	tail-tip cells	2 weeks culture <i>in vitro</i> at 37°C in Eagle's MEM
Mouse, ICR (7-day-old)	kidney and spleen cells	direct observation <i>in vivo</i>
<u>Amphibians</u>		
Frog (<i>Rana nigromaculata</i>)	bone marrow cells blood	direct observation <i>in vivo</i> 6 days culture <i>in vitro</i> at 26°C in Amphibian Culture Medium (GIBCO)
Toad (<i>Bufo b. japonicus</i>)	bone marrow cells blood	direct observation <i>in vivo</i> 6 days culture <i>in vitro</i> at 26°C in Amphibian Culture Medium (GIBCO)

低温で保存された実験群は、いずれも十分な乾燥状態で密封されていた。これに対し、対照群の標本は初夏から秋までの間、室内の標本ケースに置かれ、温度変異は、およそ 20ないし30°C の範囲内であった。また湿度も調節されていない。

対照群では、染色体標本の作製後1週間以内にG染色処理を行った場合には、バンドの再現性は失われぬ。しかし、2週間後の標本ではバンドの鮮明さは劣り、4週間以降ではバンドの再現性は殆ど失われ、バンドの数の減少やコントラストの低下となってあらわれる。これに対し、実験群の低温保存された標本では、劣化を防ぐ効果が認められ、とくに -20°C と -70°C では著しい効果があり、長期にわたってバンドの出現をみることができる。120日後のヒト標本では、僅かな劣化は認められるが -20°C と -70°C の間には保存効果に差異は認められなかった (Fig. 3)。

また同一温度で保存された標本であっても、ヒトは、マウスやラットよりも長期保存に耐え、バンドの鮮明さと出現するバンドの数からみると、マウスはヒトよりも劣化の進行が早まる傾向がみられる (Fig. 4)。しかしこの結果は、対照群の標本においてもヒトと他の2種で分染法の成功率に差があることから、ヒトとマウス・ラット染色体標本の質的な違いと考えることは早計である。

2. C染色を施した両生類染色体のバンドの再現性

両生類染色体標本にG染色を施してもGバンドは生じないため、C染色によりCバンドの出現の成否から、良好な保存条件を知ろうとした。また、冷血動物標本と恒温動物との再現性の違いの有無を検討しようとした。アカガエル、ヒキガエルとヒトを用いた本実験では、対照群の室温保存 (20~30°C) に加え、相対湿度20%以下の室温で保存された標本と、実験群の4, -20, -70, 37°C で一定期間保存された標本とでCバンドの再現性を比較した。Figs.2,5,6で明らかなように、実験群の標本はいずれも対照群よりも良好な結果が得られている。低温保存はいずれの条件よりも有効であり、殊に、-20, -70°C では長期にわたって標本の劣化を防ぐ著しい効果がある。また同一条件で180日間保存された標本では、動物種の間でバンドの鮮明度に明確な違いは認められなかった。

一方、37°C で保存されたスライドは、対照群よりも明らかに長期にわたってバンドの再現性が失われぬ。しかし低湿度・室温での保存と有意な差は認められず、高温によるよりも低湿度による保存効果とみるのが妥当である。しかし、乾燥状態での高温保存よりも、4°C 程度の低温の方が有効であった。(Fig. 2)

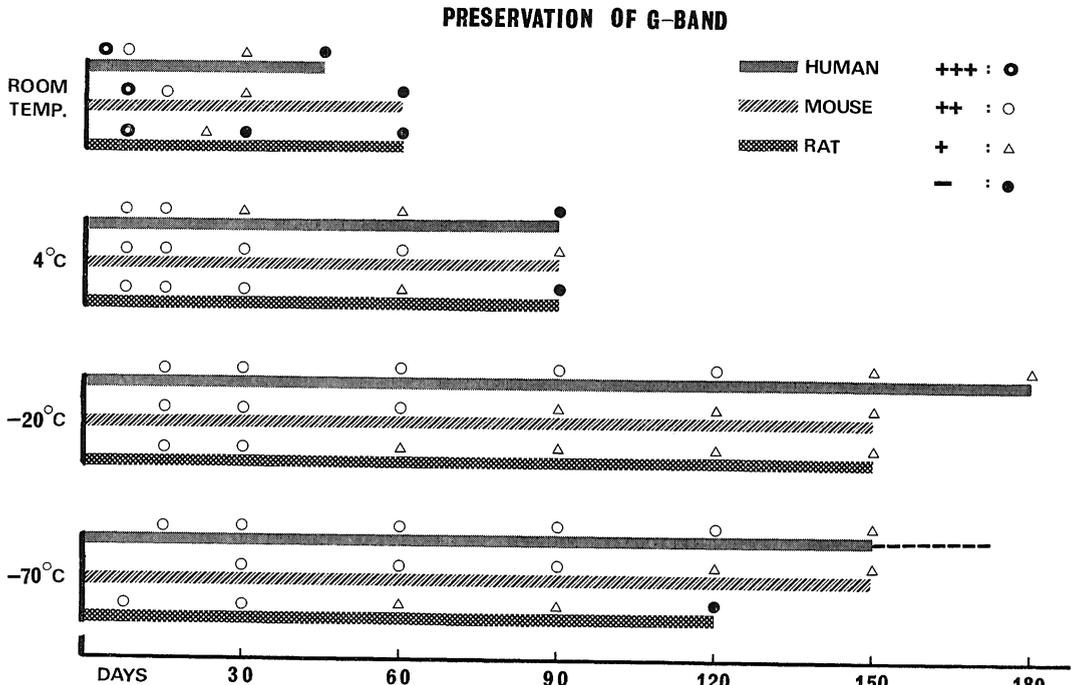


Fig. 1.

考 察

染色体標本の劣化が分染法によるバンドの形成の良否を大きく左右することは、経験的に知りうることである。しかし、標本作製後どれくらいの日数で標本の劣化が起こり始めるのか、どのような条件で染色体標本を保存するのが劣化を防ぐに有効であるのか、について検討された報告はない。

染色体分染法は、そもそもヒトの染色体分析のために開発された技法で、その後、数々の種類の分染法が、多くの動・植物染色体について開発されている。現在最も広く行われるヒトの染色体にG染色を施しても、一定した結果を得ることの困難さはこれまでも指摘されている (Zimmerman & Sihuonen 1973, Gallimore & Richardson 1973, Wiscovitch et al. 1974)。このうち、Wiscovitch et al. (1974) は、ヒト染色体で、標本作製後の日数を十分考慮しない限り、バンドの再現性を高めることは出来ないことに初めて言及し、標本の古さ、あるいは加齢要素 (slide aging factor) がバンドの成否を決める重要なパラメーターであると報告している。

本研究では、染色体標本を未染色のまま長期間保存する必要のある場合、バンドの再現性を維持できる有効な

保存方法を検討した。通常、標本作製後そのまま2週間以上放置するとバンドの再現性が低下する。すなわち、出現するバンドの数が減少するか、あるいはバンドの鮮明さ、濃淡のコントラストが失われてゆく。このような標本の劣化を防ぐための保存条件、方法として考えられるのは、温度、湿度、および標本を取り巻く気体の条件を特定することである。そのうち、比較的條件が設定しやすい温度と湿度を変えてスライド標本を保存し有効性を比較した。その結果、低温とくに -20°C 以下で保存した場合は、低湿度のみの保存よりは遙かに長期にわたって標本の劣化を防ぎ、バンドの出現を保ち得ることが知られた。また低温による保存効果は、ほ乳類、両生類の染色体標本に共通して認められた。

低温保存によって標本の劣化を遅らせ、長期にわたってバンドの再現性を保ちうるという事実は、染色体物質 (chromosome substances) の変性と分染縞の生成との関係を示唆するものと考えられる。このことは、今後分染の機構を考察する上で寄与するであろう。

染色体分染の機構に関してはこれまで、各種の分染法について多くの説明がなされた (Kato & Moriwaki 1972, Comings 1978, 水野 1979, Macgregor & Varley 1983)。Gバンドについては、細胞固定液中の酢酸によるクロマチンのタンパク質の部分的な抽出による

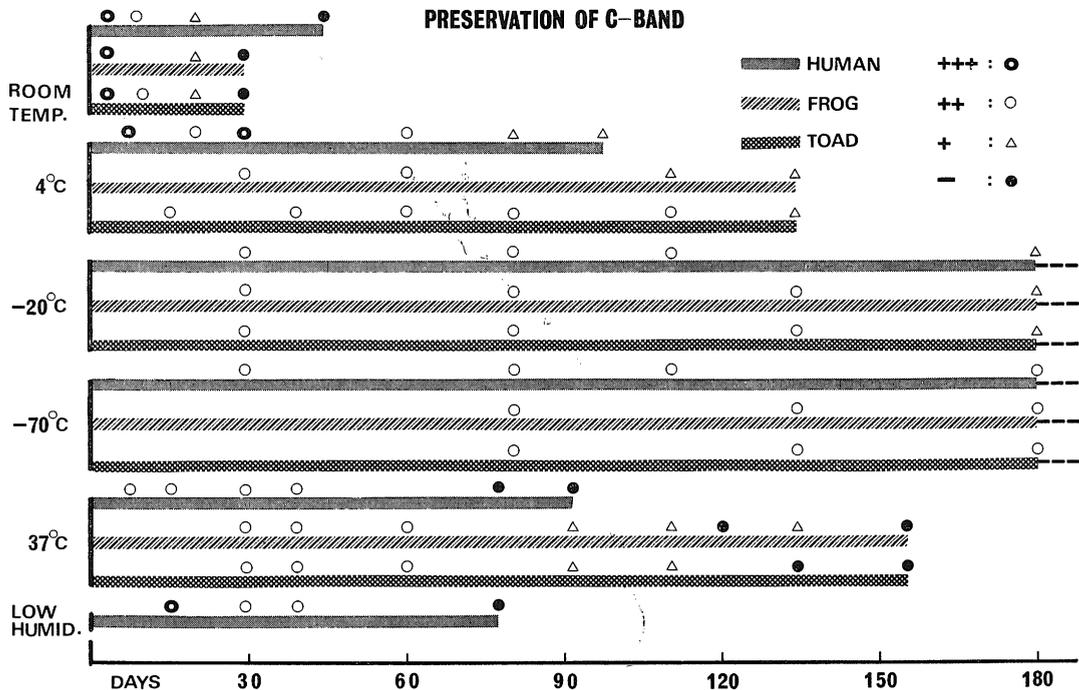


Fig. 2.

(Sumner et al. 1973) とする見解や、染色体中の非ヒストン性タンパク質の分布が不均一であるため、これらタンパク質が分解、除去、抽出あるいは変性を受ける程度の違いによるものと考え (McKenzie & Lubs 1973, Comings 1978) などタンパク質が原因とする説が一方にある。他方、DNA を主原因とする証拠としては、Gバンドの濃染部に反復 DNA 塩基配列部分が顕著に存在すること (Yunis et al. 1977) や、染色体への 5-bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを Hoechst 33258 で染色してそのパターンを調べ、Gバンドパターンとの一致をみたことから、DNA の複製単位 (replicon) の存在様式との関係を示唆するもの (Crossen et al. 1975, など) までである。また、水野 (1979) は DNA の、おそらくは非ヒストン性タンパク質の関与によってもたらされる部分的な凝縮度の違いにもとづくとする、DNA とタンパク質の両者の関連を主張している。

また、Cバンドの形成に関しては、もともとC染色によって濃染する部位にはサテライト DNA の局在することが分子雑種法によって確認されており (Pardue & Gall 1970, Arrighi & Hsu 1974), DNA がバンド形成の主角になっていると一般的には考えられている。しかしサテライト DNA をほとんど含まないチャイニーズハムスターの性染色体にも Cバンドが出現するという例もあり、一種類のサテライト DNA のみの働きというよりはむしろ特定の DNA とタンパク質の相互作用の結果であるとする考えも出されている (Macgregor & Varley 1983)。

分染縞をつくる機構についての多くの報告のうち、例外的なものを除くと、分染処理によって反復 DNA ヌクレオチド対の変性と再生 (denaturation-reassociation) がCバンドの形成に関わっていること、Gバンドの形成には染色体縦軸に沿った DNA とタンパク質、あるいは DNA かタンパク質かのいずれかの差次的な排除 (differential loss) もしくは変性をともなうものであることは確からしい。であるとするならば、分染処理以前に染色体物質の変質、すなわち標本の劣化が起きた場合に、種特異的なバンドパターンを形成するはずの各染色体部位でのクロマチン存在様式の差異が崩れて、ギムザ染色液の色素との結合の度合いに不均一性が生じにくくなるものと解釈することができる。低温保存はこの崩れをくいとめるのに寄与しているとみることができる。

要 約

染色体標本作製後未染色のまま放置すると、染色体は

次第に鮮明な分染パターンが得られなくなる。この標本の劣化 (slide aging) はどれくらいの日数で起こり始めるのか、どのような条件で保存するのが分染法によるバンドの再現性を維持するのに有効であるか、について検討した。スライド標本の保存の良否を左右する条件として考えられるのは、温度、湿度、および標本を取り巻く気体の種類などが挙げられるが、今回は比較的条件が設定し易い温度と湿度を特定し有効な保存方法を調べた。その結果、染色体標本作製後そのまま2週間以上放置すると、バンドの再現性が低下する。すなわち、出現するバンド数が減少するかあるいはバンドの鮮明さ、濃淡のコントラストが失われてゆく。しかしスライド標本を低温、とくに -20°C 以下で保存した場合は、低湿度のみの保存よりは遙かに長期にわたって標本の劣化を防ぎ、少なくとも6ヶ月はバンドの再現性を保ち得ることが知られた。また低温による保存効果は、C染色およびG染色とともに認められ、ほ乳類、両性類の染色体標本に共通して類似の効果があった。

〈謝 辞〉

本研究に協力して下さった春日靖江、瀬田真弓、野津裕子、森川薫の皆さんに厚く御礼申しあげる。

引用文献

- Arrighi, F. E. and Hsu, T. C. (1974). Staining constitutive heterochromatin and Giemsa crossbands of mammalian chromosomes. *In* Human Chromosome Methodology (J. J. Yunis, ed.) Academic Press, New York. Chap. 4.
- Comings, D. E. (1978). Mechanisms of chromosome banding and implication for chromosome structure. *Annu. Rev. Genet.*, **12**, 25-46.
- Crossen, P. E., Pathak, D., and Arrighi, F. E. (1975). A high resolution study of the DNA replication patterns of Chinese hamster chromosomes using sister chromatid differential staining technique. *Chromosoma* **54**, 339-347.
- Gallimore, P. H. and Richardson, C. R. (1973). An improved banding technique exemplified in the karyotype analysis of two strains of rat. *Chromosoma* **41**, 259-263.
- Kato, H. and Moriwaki, K. (1972). Factors involved in the production of banded structures in mammalian chromosomes. *Chromosoma* **38**, 105-120.
- Macgregor, H. C. and Varley, J. M. (1983). Chromosome banding. *In* Working with Animal Chromosomes. John Wiley & Sons, Chichester. Chap. 4.
- McKenzie, W. H. and Lubs, H. A. (1973) An analysis of the technical variables in the production of C

- bands. *Chromosoma* **41**, 175-182.
- 水野重樹 (1979). 真核生物染色体の分子生物学. 生化学 **51**, 65-91.
- Pardue, M. L. and Gall, J. G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* **168**, 1356-1358.
- Rothfels, K. H. and Siminovitch, L. 1958. An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain Technol.* **33**, 73-77.
- Seto, T. and Rounds, D. E. (1968). Cultivation of tissues and leukocytes from amphibians. *In Methods in Cell Physiology*, Vol. 3. (D. M. Prescott, ed.) Academic Press, New York. Chap. 4.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **75**, 304-306.
- Sumner, A. T., Evans, H. J., and Buckland, R. A. (1973). Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. I. The effects of fixation in methanol-acetic acid. *Exp. Cell Res.* **81**, 214-222.
- Wang, H. C. and Fedoroff, S. (1972). Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature, New Biol.* **235**, 52-53.
- Wiscovitch, R. A., Singh, D. N., and Osborne, R. A. (1974). The relationship of slide maturity and trypsin exposure time in the differential Giemsa banding of chromosomes. *Stain Technol.* **49**, 35-37.
- Yunis, J. J., Kuo, M. T., and Saunders, G. F. (1977). Localization of sequences specifying messenger RNA to light-staining G-bands of human chromosomes. *Chromosoma* **61**, 335-344.
- Zimmerman, E. G., and Sihunonen, D. A. (1973). Chromosomal banding patterns and ideograms of the cotton rat, *Signodon arizona*. *Chromosoma* **41**, 86-89.

図 版 説 明

- Fig. 3.** G-banding patterns of human chromosomes from cultured leucocytes *in vitro*. The slide preparations were preserved for various periods of days under different temperature before the G-staining.
a, stored for 3 days at room temperature as control.
b, 30 days at room temperature. **c**, 120 days at -20°C .
d, 120 days at -70°C . Bar represents $10\ \mu\text{m}$.
- Fig. 4.** G-banding patterns of mouse (ICR) chromosomes from kidney and spleen cells of the 7-day-old individuals.
a, stored 3 days after the preparation, kept at room temperature.
b, 30 days at 4°C . **c**, 90 days at -20°C . **d**, 120 days at -70°C .
 Bar represents $10\ \mu\text{m}$.
- Fig. 5.** C-banding patterns of human chromosomes from cultured leucocytes *in vitro*. The slide preparations were preserved for various periods under different temperature before the C-staining.
a, 7 days at room temperature. **b**, 20 days at room temperature.
c, preserved under low humidity (the relative humidity was around 20%) for 29 days. **d**, 29 days at 4°C . **e**, 180 days at -20°C .
f, 180 days at -70°C . Bar represents $10\ \mu\text{m}$.
- Fig. 6.** C-banding patterns of toad (*Bufo bufo japonicus*) chromosomes from cultured leucocytes *in vitro* and bone marrow cells *in vivo*.
a, preserved for 10 days at room temperature. **b**, 29 days at 37°C .
c, 110 days at 4°C . **d**, 180 days at -70°C . Bar represents $10\ \mu\text{m}$.

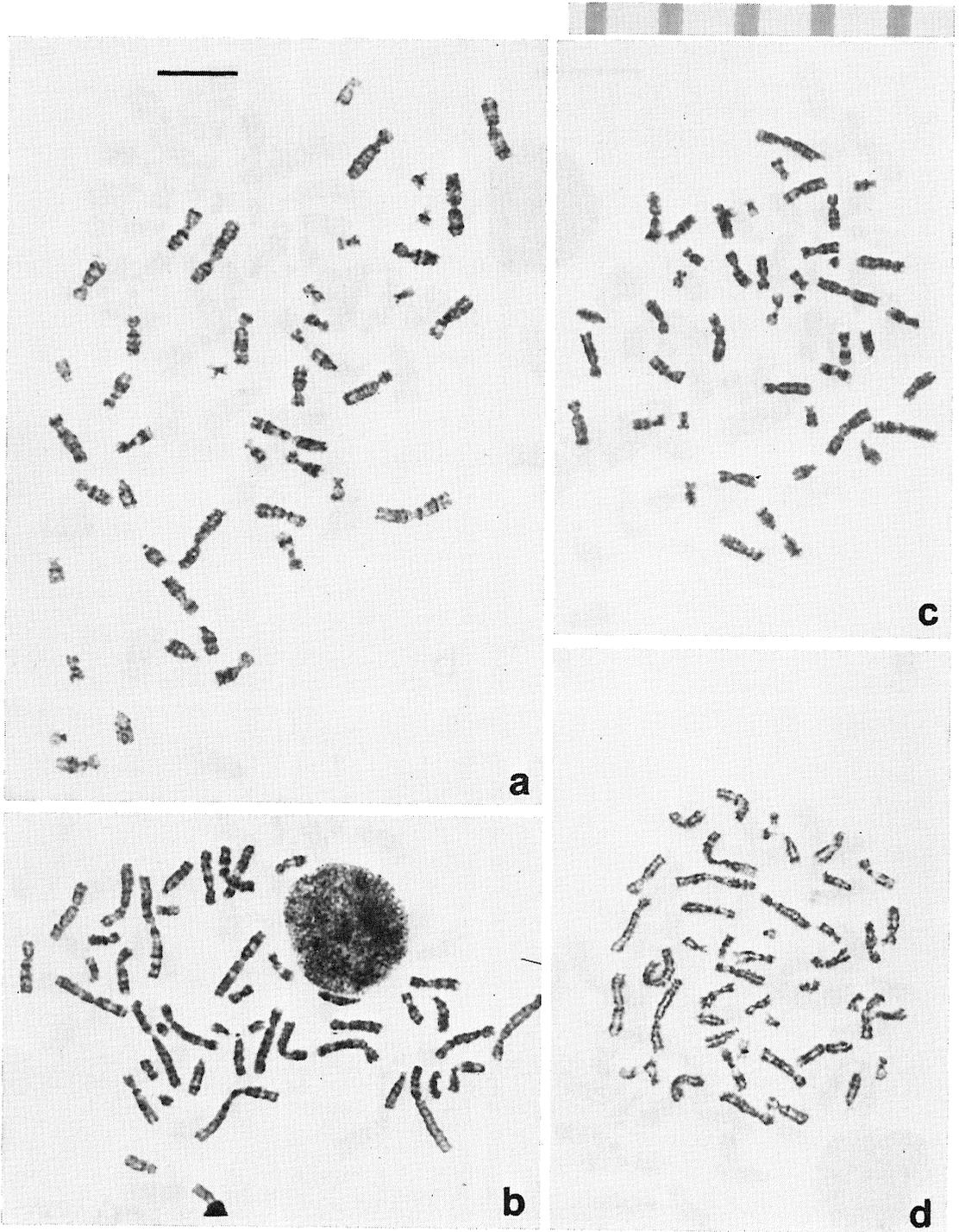


Fig. 3.

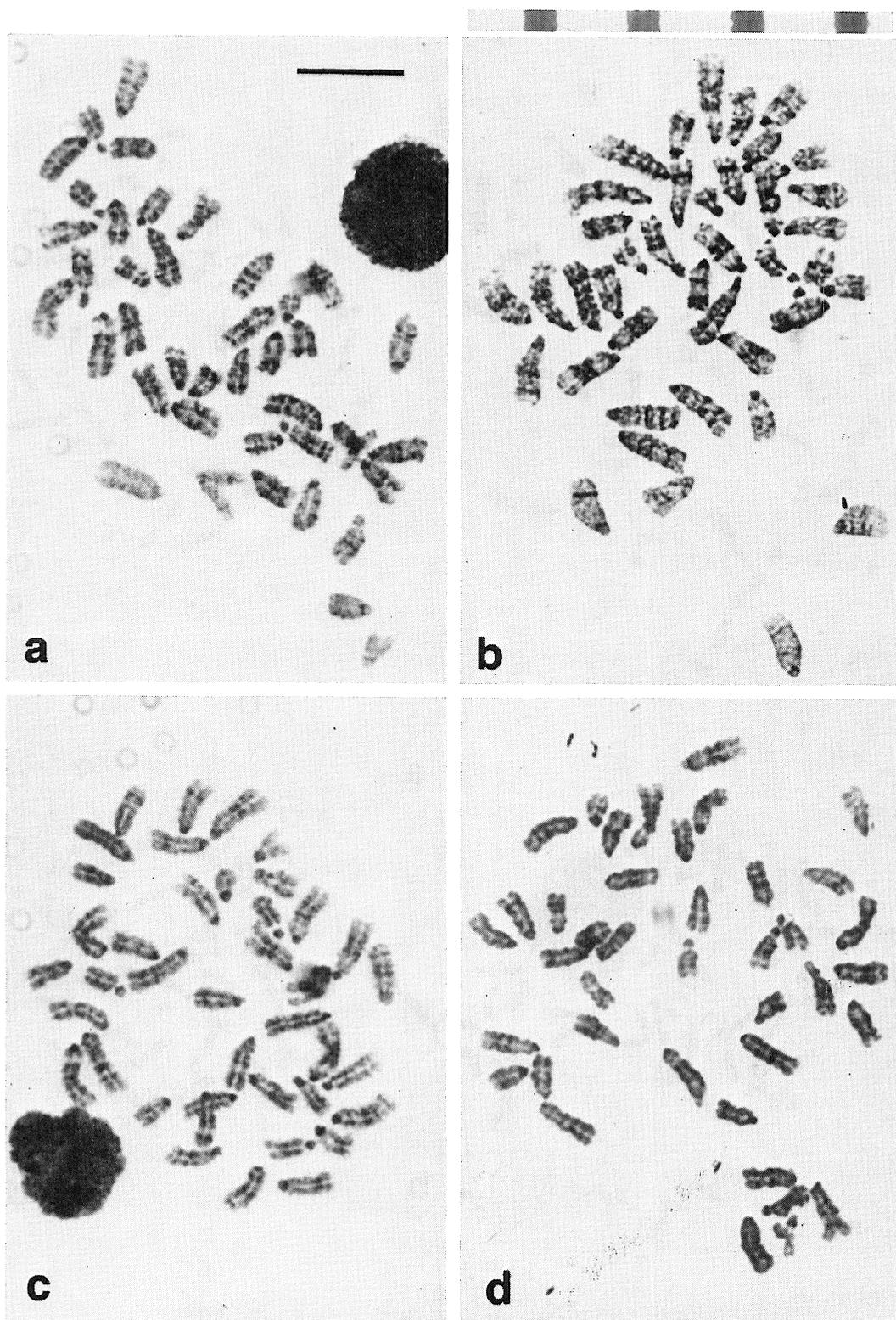


Fig. 4.

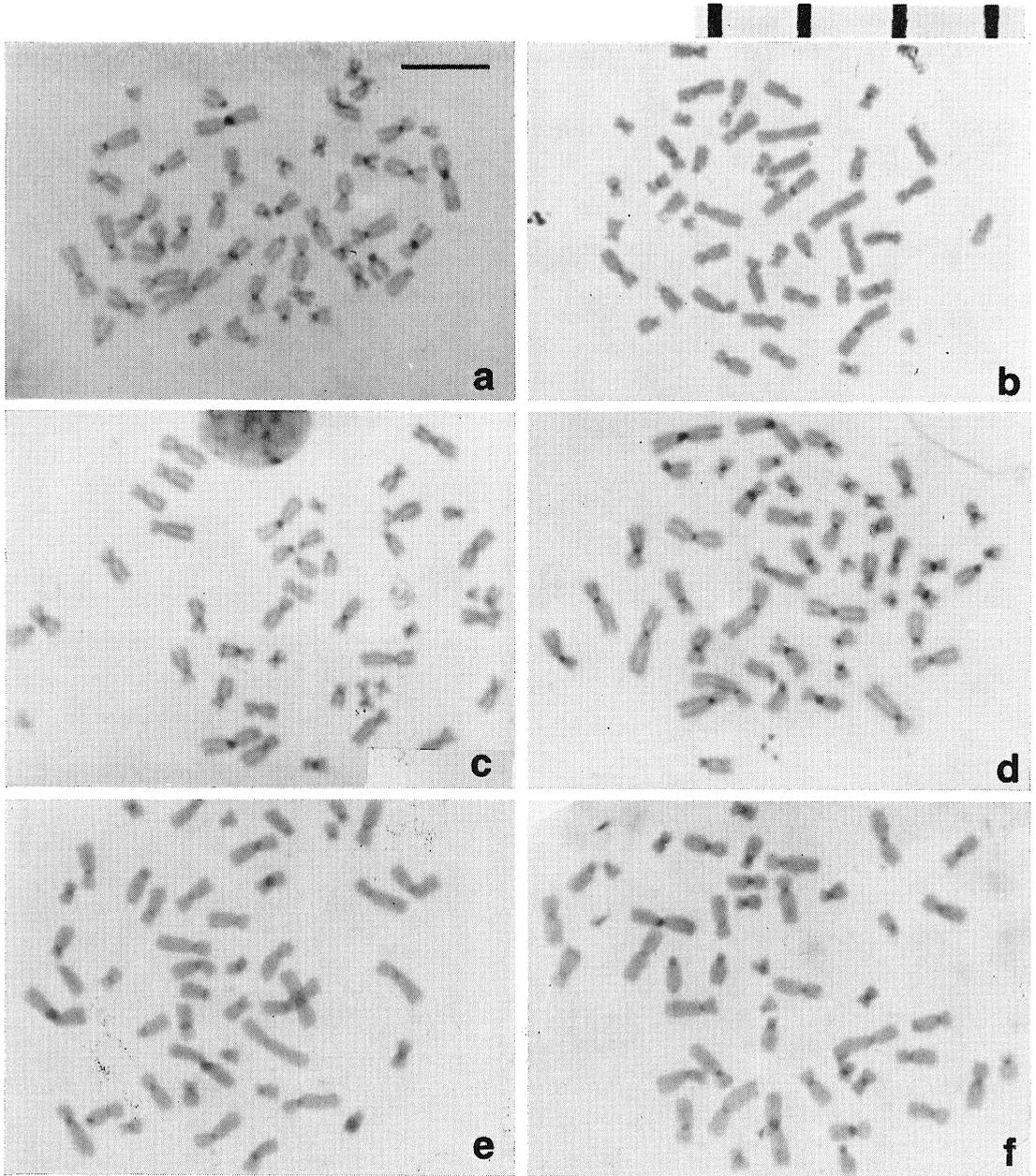


Fig. 5.

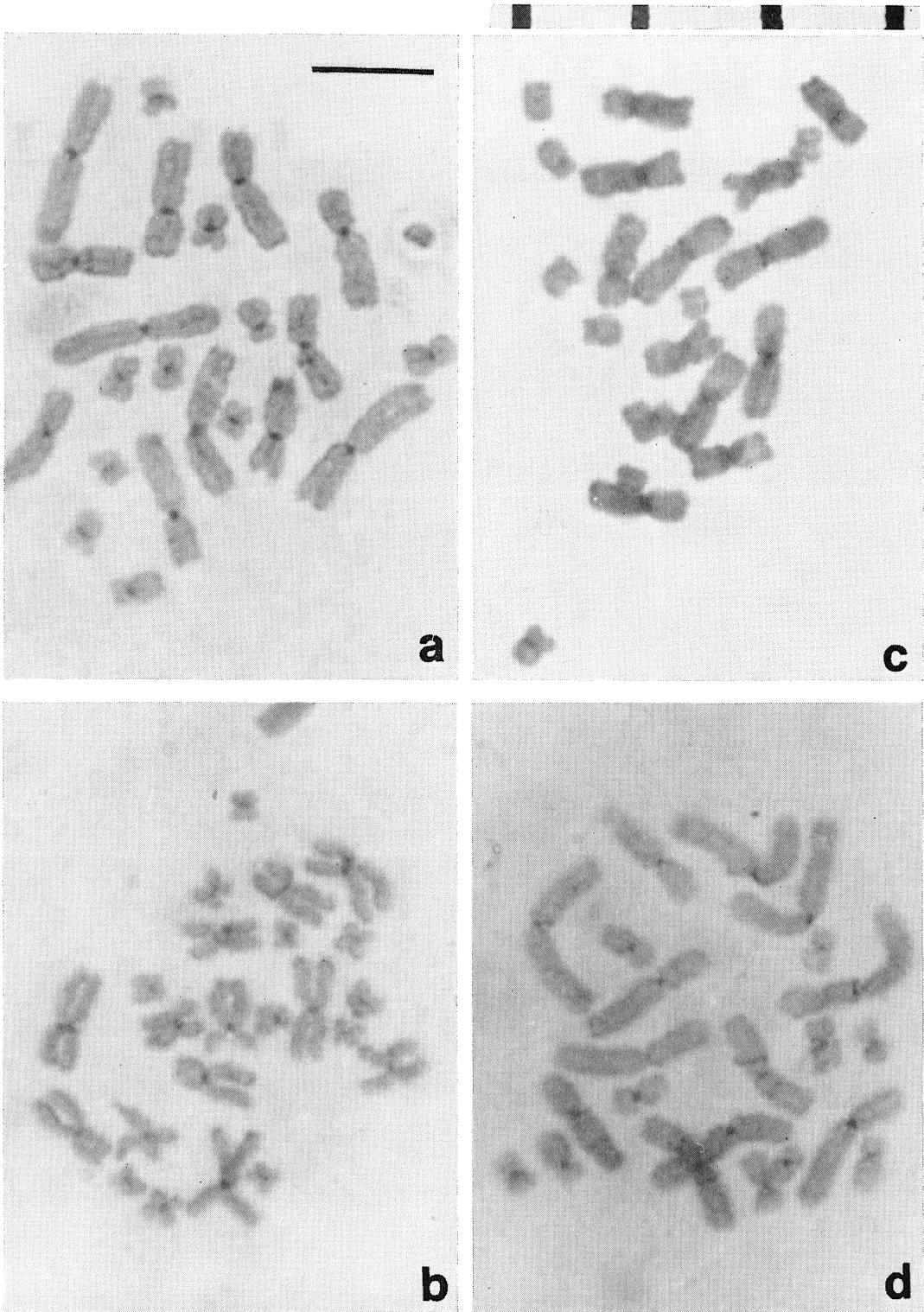


Fig. 6.