

家兎水晶体上皮組織より確立されたRLE細胞系の核型について*

昭和42年11月21日 受付

信州大学医学部細菌学教室

田 波 洋 山 田 喜 紹 田 崎 忠 勝

信州大学医学部眼科学教室

(主任：加藤静一教授)

田 村 茂 博

信州大学医学部学生

村 上 昇

Karyotypes in the RLE- cell line derived from rabbit lens epithelial tissues.

Yoh Tanami, Yoshikazu Yamada, Tadakatu Tazaki,

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine,
Shinshu University.

Shigehiro Tamura

Ophthalmological Clinic, Shinshu University.

(Director : Prof. S. Kato)

Noboru Murakami

Student of Faculty of Medicine, Shinshu University

哺乳動物細胞を *in vitro* で長期間培養すると、diploid (2倍性) の細胞は数ヶ月のうちに消滅してしまい、もし更にひきつづいて長期間培養可能な細胞がえられるとき^(註)、その核型は3倍性ないし4倍性の heteroploid (異数性) に変つていくことが一般に認められている^①。

こうして得られる heteroploid の細胞系は、ウイルス感受性が primary culture とは変つていたり、潜在的な腫瘍化をおこしている怖れがあるのでウイルス・ワクチンの製造には用いられない^{①②}。また、*in vivo* におけると同様の分化機能をもっている細胞系を確立する必要もあつて、培養細胞を長期間に亘り diploid に保つことがこの領域での焦点のひとつになっている。

私どもは田村 (1965) ^③ が確立した家兎水晶体上皮組織由来の培養細胞系——以下 Rabbit lens epithelial cell line, 略して RLE 細胞系と呼ぶ——

をひきつづき継代しているが、培養開始後16ヶ月たつても大部分の細胞は near diploid の核型を保つていくことがわかつたので、その成績をこゝに報告したい。

材料と方法

RLE 細胞系の培養経過 (I) 初代培養 1964年9月7日、体重約2kgの健康白色家兎 (♂) を耳静脈への空気注入で殺し、たゞちに眼球を摘出した。水晶体の赤道部上皮組織を1~2mm大に細切し、タンザク瓶 (三陽ガラスKK) 内にプラズマ・クロット法に従つて外移植し、37°C で静置培養した。培養に先だち、接種材料を鏡検し、それが水晶体上皮のみで他組織の混入がないことを確めた。

培養は毎日鏡検し、培養液は5~7日毎に交換した。培養開始後1~2日目に、組織片の周囲に突起状の細胞増殖が認められた。

(II) 培養液の組成 最初の12ヶ月は下の処方を用いたが、12ヶ月以後は199培地のかわりに Eagle-Hanks の培養液を用いた。その他の成分は下と同じである。

〔脚注〕 継続的に長期間培養可能となつた細胞を established cell line (確立された細胞系) と呼ぼうという提案が最近アメリカ組織培養学会で出されている。こゝでは簡単のため cell line (細胞系) と呼ぶことにする。

*本研究の要旨は、昭和41年5月、第21回日本組織培養学会研究会 (福岡) で発表した。

Mixture 199 (千葉県血清研製) 90%
 Lactoalbuminhydrolysate (Difco社製) 0.25%
 仔牛血清 (56°C, 30分間加温) 約 10%
 Penicillin G 100units/ml
 Dihydrostreptomycin 100μg/ml

(iii) 継代培養 培養開始後18日目に、新しい瓶への最初の継代を行つた。この植えつぎは、プラズマ・クロット法を用いず、注射針の先で丁寧に剥した細胞を新しいタンザク瓶に植え、培養液を加えて静置培養した。数日後から細胞の遅い増殖がみられ、約1ヶ月かゝつて単層シートを形成した。

この時期の細胞は三角形、三ヶ月形、紡錘形、類円形、イチヨウ葉形などの多形性を示し、一般に fibroblast と epithelioid の中間形を示している。(写真1, 2)

培養を始めてから76日目にトリプシンによつて細胞を軽く消化し、2代目の継代を行つた。このころの細胞増殖速度はかなり遅く、doubling time は約5日

であつた。(一般の established cell line, 例えば HeLa 細胞系やL細胞系での doubling time は20時間前後である)。

約12ヶ月ごろから、増殖速度は多少速くなつて doubling time は約3日となり、植えつぎも安定して来た。そこで培養液も Eagle Hanks 培養液に変え、植えつぎのときの細胞処理も EDTA 液を用いることにした。

なお、この RLE 細胞系は、1966年11月現在(培養開始26ヶ月後)も依然として活発な増殖をつづけている。

核型分析法 一般に用いられているように、細胞をコルヒチン処理(2~3 μg/ml で16~30時間処理)したのち、低浸透圧処理(1.12%クエン酸水溶液で20分間)によつて染色体を分散させ、カルノー液で固定後、冷却した清浄のセガラス上で急激に乾燥して染色体標本をつくつた。染色体の染色には45%ゲンチアナ紫醋酸溶液または1%ダーリア液を用い、核型分析はすべて顕微鏡写真像によつた。

写真 1, 2

培養開始後約1ヶ月目のRLE細胞の形態(100×)。



成 績

1966年1月から2月にかけて行つた RLE 細胞系の核型分析の成績を失々図1~4に示す。染色体の配列は Dave et al. (1965)^④ に従つた。その理由は後でのべる。

細胞あたりの染色体数の分布を図1に示すが、こゝにみられるように、約90%の細胞の染色体数は36~46の間に分布し、最頻度は44本(これは diploid に相当する。このような diploid 型細胞の全体に対する比率は64%)であつた。

残りの約60%の細胞は染色体数が60~94の間に分布する3倍性ないし4倍性の heteroploid であつた。

Idiogram の分析は少数の標本についてしか行えなかつたが、いずれも家兎に特有の核型排列を示している。代表的な例を失々図2~4に示そう。

図2に示す核型は正常の diploid のものである。これに対し図3, 4に示す核型は、みかけ上の染色体数は44本(quasi-diploid)だが染色体構成の一部に異常が認められる。図3の例では No. 2群に monosomy が、No. 18~19群に trisomy がみられ、図4では No. 12群に monosomy が、No. 18~19群のどちらかに trisomy がみられる。このような染色体構成の

図 1

培養開始後16~17ヶ月目における RLE 細胞系の染色体数の分布

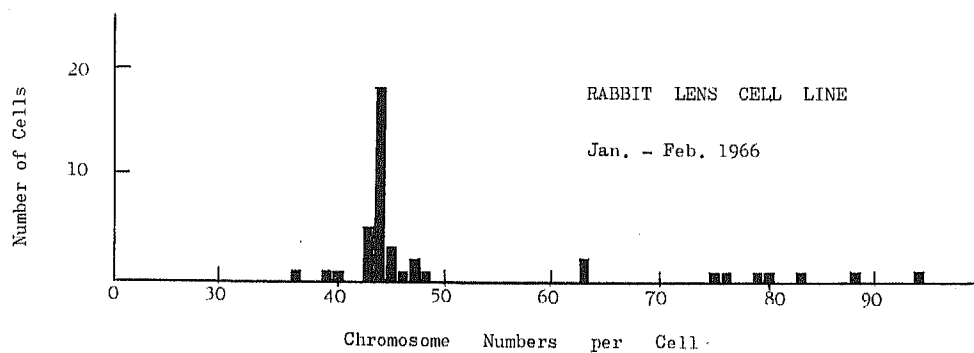


図 2

長期培養（16ヶ月）後の RLE 細胞の核型の 1 例。Euploid 型を示す

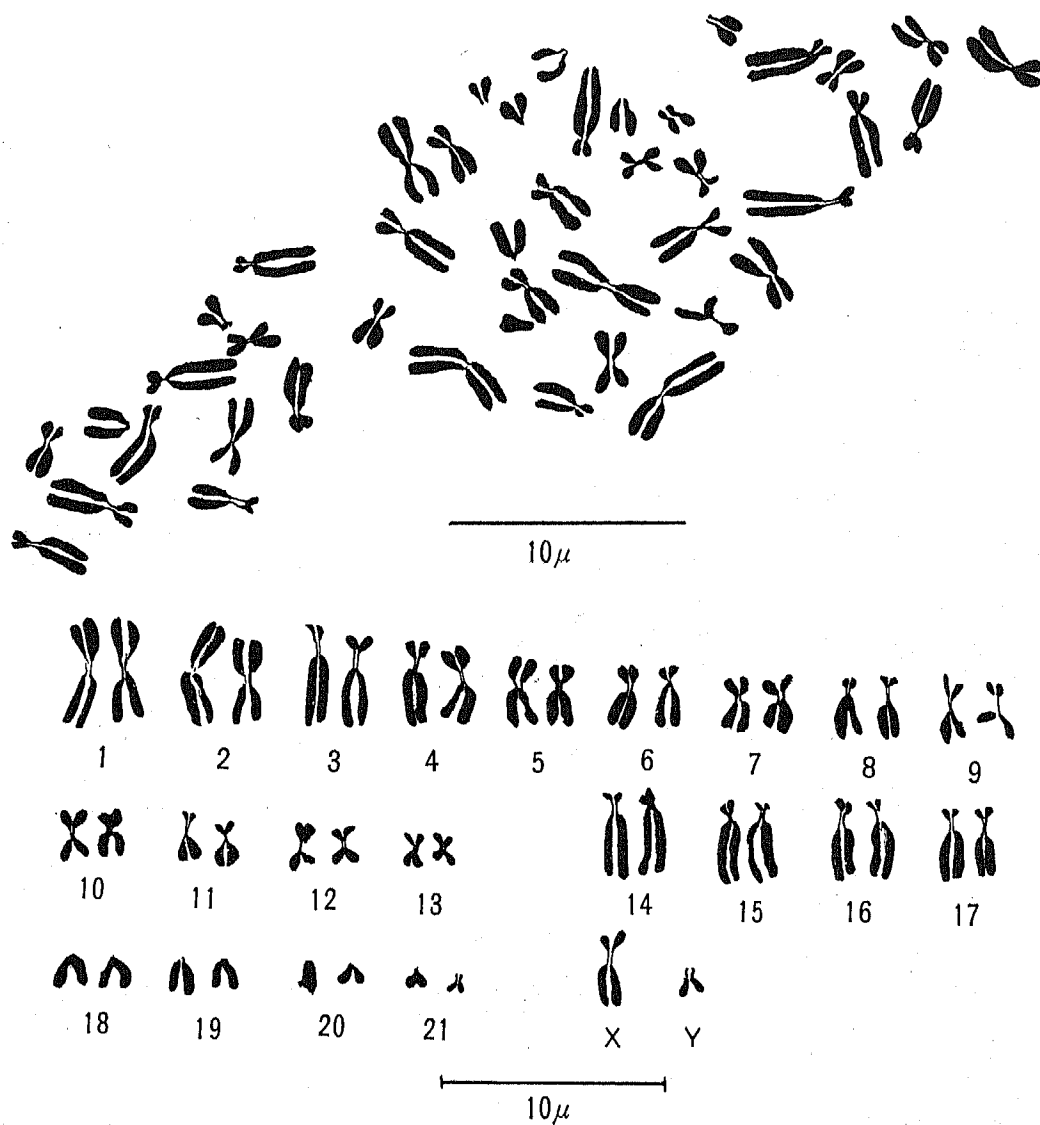
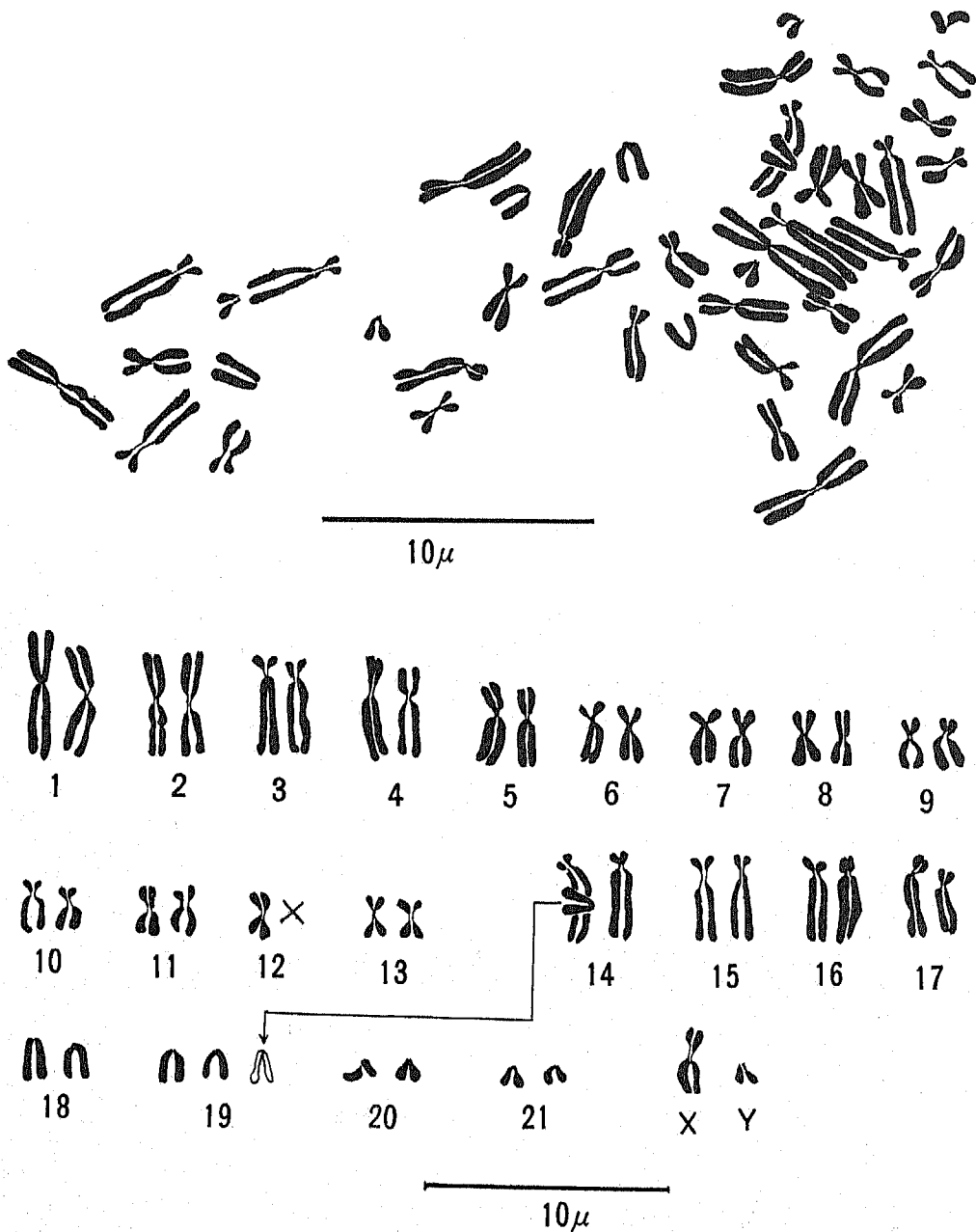


図4 長期培養(16ヶ月)後のRLE細胞の核型の1例。12群に monosomy が, 19群に trisomy が見られる



であることを証拠だてている。

考え方

長期培養細胞系を確立する過程で、同じ研究室で維持している別種の細胞系の“汚染”によって、細胞培

養のなかみがすりかわってしまうことは、稀ではない。

Clausen & Syvertson^⑤ (1962) は各研究所で確立されたと称する31系の細胞の核型をしらべ、そのうち約半数の15系統の核型は表面上の由来動物のそれと

は全く異つていた、とのべている。即ち“レッテル”によれば、夫々サル(2系)、家兎(6系)、ブタ(1系)、ウシ(1系)などから由来したことになつている計10系の細胞群の核型がすべてヒトの核型に一致しており、また、夫々ヒト(4系)またはサル(1系)由来といわれていた計5系の細胞群の核型がマウス由来の Earle の L 細胞系のそれに驚ろく程似ていたという。

従つて、新しい細胞系を確立した場合は、その核型が由来動物のそれと一致することを示さなければならない。

家兎(domestic rabbit)の正常染色体数は44本で、21対の常染色体と、1対の性染色体から構成されていることは Painter (1926)^⑥以来多くの研究者によつて確認されている^{⑦-⑩}。しかし、核型の詳細については研究者によつて多少のちがいが認められる。

Clausen & Syvertson^⑧ (1962) は家兎の常染色体は14対の meta- ないし submetacentric, 4対の subtelocentric, および3対の acrocentric な染色体群よりなるとのべているのに対し、Dave *et al.*^④ (1965) は上の3群は夫々13対, 4対, および4対の染色体群から構成されている、とのべている。

さらにX染色体の大きさや腕比(=長腕の長さ/短腕の長さ)についても両者の間には意見の食い違いがみられる。

即ち、前者^⑤ではX染色体はかなり小型(染色体の長さの総計あたりの per cent length でいうと3.2%)で、腕比が3.0の Subtelocentric 型であるのに対し、後者^④の報告では、かなり大型(5~6%の長さでいたい No. 3 の染色体に近いという)で、腕比が約1.8の metacentric 型であるとされている。

これらの差異が用いた家兎の個体差によるものか、あるいは標本作成技法上の誤差によるものか、いまのところはつきりしていない。

私どもの成績(図2~4)を上 の成績と比べてみると、常染色体の構成が13対の meta- ないし submetacentric, 4対の subtelocentric, および4対の acrocentric 型からなつていること、と、X染色体が大型の metacentric 型であるなどの点から、Dave *et al.*^④ (1965) の報告に一致する。

ただ正常核型に比べて、No. 3 の染色体の着糸点が端にずれて subtelocentric 型になつている点異なるが、これは長期間培養の影響によるものと考えられる。

以上の点からみて、私どもの維持している RLE 細胞系が家兎由来のものであつて(他の確立細胞系のコンタミネーションによるものではない)ことは明らか

である。しかも16~17ヶ月に亘る長期間培養後も、大部分の細胞が依然として near diploid である事は注目すべきことだと考えられる。この点と、田村^③も指摘しているように本細胞が非常に透明だということ、および増殖速度が(一般に例を見ない程)遅いという事は、いずれも本細胞系の由来組織である水晶体上皮の“分化機能”を或程度維持していることを物語つていて興味深い。

まとめ

健康家兎の水晶体上皮由来の RLE 細胞系の核型分析を行つたところ、培養開始後16ヶ月経過していたにも拘らず、大部分(90%)の細胞は diploid ないしは quasi-diploid であることがわかつた。Idiogram 分析によつて diploid 型の核型は家兎特有のもの、即ち、13対の meta- ないし submetacentric, 4対の subtelocentric, 4対の acrocentric, および1対の性染色体よりなつていることが確認された。

RLE 細胞系の増殖速度は比較的遅く doubling time は3~5日(37°Cで)であつた。瓶から瓶への植えつきは1½~2ヶ月毎で、1966年11月現在までの継代数は10~12代である。長期間の培養にも拘らず、核型異常が軽度である理由は、総世代数が比較的少いためと考えられる。

文 献

- ① Hayflick, L., and Moorhead, P. S. : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621, 1961
- ② Hayflick, L. : Human diploid cell strains as host for viruses. *Perspectives in Virology* 3, 213-237, 1963
- ③ 田村茂博 : 家兎水晶体上皮細胞のガラス瓶内培養に関する研究, *日眼会誌*, 69, 317-320, 1965 ; Long-term cultures of epithelial cells of a rabbit lens. *Jap. J. Ophthal.* 9, 177-181, 1965
- ④ Dave, M. J., Takagi, N., Oishi, H., and Kikuchi, Y. : Chromosome study on the hare and the rabbit. *Proc. Japan Acad.* 41, 244-248, 1965
- ⑤ Clausen, J. J., and Syvertson, J. T. : Comparative chromosomal studies of 31 cultured mammalian cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* 28, 117-145, 1962
- ⑥ Painter, T. S. : Studies in mammalian spermatogenesis. VI. The chromosomes of the rabbit. *J. Morph.* 43, 1-54, 1926
- ⑦ 立石新吉 : タイワンノウサキ並に家兎の染色体に就て, *動物学雑誌*, 48, 617-625, 1936
- ⑧ 牧野佐二郎 : 家畜の染

染色体研究. 動物学雑誌 56, 8-15, 1944 ; A contribution to the study of the che chromosomes in Asiatic mammals. Cytologia 16, 288-301, 1952
⑩Melander, Y. : The chromosome complement of the rabbit. Hereditas 42, 432-435, 1956 ⑩

McMichael, H., Wagner, J. E., Nowell, P. C., and Hungerford, D. A. : Chromosome studies of virus-induced papillomas and derived primary carcinomas. J. Nat. Cancer Inst. 31, 1197-1215, 1963