

長期間培養した家兎水晶体上皮細胞の 核型について (第2報)

田波 洋 山田 喜紹 田崎 忠勝

信州大学医学部細菌学教室

松岡 紀夫

信州大学医学部眼科学教室 (主任: 加藤静一教授)

Karyograms in a Long-Term Cultured Cell Line Derived From Rabbit Lens Epithelial Tissues

Yoh TANAMI, Yoshitsugu YAMADA and Tadakatu TAZAKI

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine

Shinshu University

Norio MATSUOKA

Department of Ophthalmology (Director: Prof. S. KATO)

まえがき

前報¹⁾において、私たちは家兎水晶体上皮由来の RLE 細胞系がガラス器内での長期間 (16ヶ月) の培養にも拘らずなお diploid 型の核型を保っていることを報告した。しかし、その後に行った核型分析では、すでに polyploid (低4倍) 性になってしまっていることが判明した。

本論文では4低倍性に変化した RLE 細胞の核型が依然として家兎特有のマーカー染色体を維持していること、および核型変化と関連した増殖速度の変化などについて報告したい。

材料と方法

RLE 細胞系の培養経過: 前報¹⁾および田村²⁾ (1965) により詳しくのべられているので、こゝではごく簡単にのべる。

(1) 初代培養 1964年9月7日、体重約2kgの健康白色家兎(♂)の水晶体上皮組織を細切し、プラズマ・クロット法によってタンザク瓶(三陽ガラスKK)内に transplant し、37°C で静置培養した。培養液は、はじめの12ヶ月間は Morgan の 199 培地を主成分とし、LAH 0.25%, 仔牛血清 10%, Penicillin G 100 単位/ml, Dihydrostreptomycin 100 mcg/ml 添加したものを用いた。12ヶ月以後は 199 培地のかわりに Eagle-Hanks の基礎培地を用いた。

(2) 継代培養 培養開始後18日目に最初の継代を行ない、76日目に第2回目の継代を行った。以後約2

月ごとに subculture をくりかえしている。当初の増殖速度はきわめて遅く、doubling time は5~7日であった(田村, 1965)。

1969年4月(培養開始後4年7ヶ月)現在も RLE 細胞は私たちの研究室で維持されているが、subculture の代数は、まだ20代程度にすぎない。うえつぎ回数が少ない理由は、RLE 細胞の増殖速度がおそいためと、この細胞は一旦 monolayer を完成してしまうと(定期的に液交換さえ行えば)長期間維持できるという特長のためである。現在まで1年半以上の長期に亘って、同一瓶内で(subculture せずに)維持しつづけている monolayer もある。

核型分析法: 新しい subculture の培養液に2~3 mcg/ml のコルヒチンを加え、6~10時間培養後、低滲透圧処理(1.12% クエン酸水溶液で20分間処理)によって細胞を膨化させ、metaphase の染色体を分散させる。次に細胞をカルノア液で固定後、冷却した、清浄なセガラス上で急激に乾燥させて染色体標本をつくる。染色体の染色には45%醋酸溶液に1%の割にゲンチアナ紫を溶かした液を用いた。核型分析はすべて顕微鏡写真によった。

成績

1968年8月(RLE 細胞の培養開始後48ヶ月目)に行った核型例を図1, 2にまた細胞あたりの染色体数の頻度分布を、図3および表1に夫々示す。図3には比較のため1966年2月(培養開始後約17ヶ月目)に

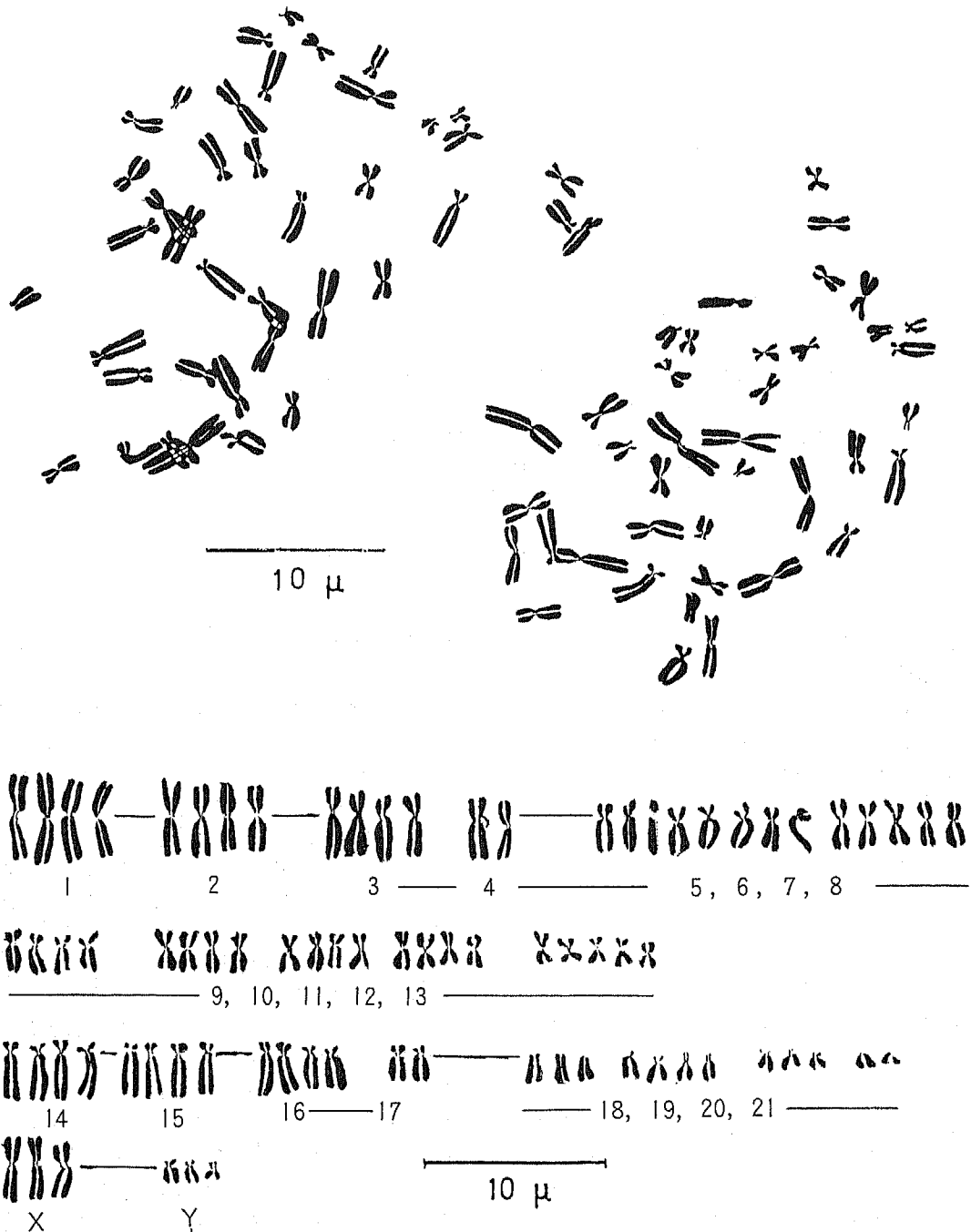


Fig. 1. An example of the karyogram in hypotetraploid rabbit lens epithelial (RLE) cell line.

行なった染色体数の頻度分布を併記した。こゝにみられるように、1966年2月の成績では染色体数が44本 (= 2n) の細胞が最も多く、全体として near diploid であるのに対し、1968年8月の成績では、大部分の細胞の染色体数は72~80 (モードは78の) 間に分布し、

核型としては hypotetraploid (低4倍性) に変化している。

染色体構成については、後でのべるが、正常染色体の構成群である No. 1~21 および X, Y 染色体の各々が (ほぼ平均して 3~4 本ずつ) 維持されていること

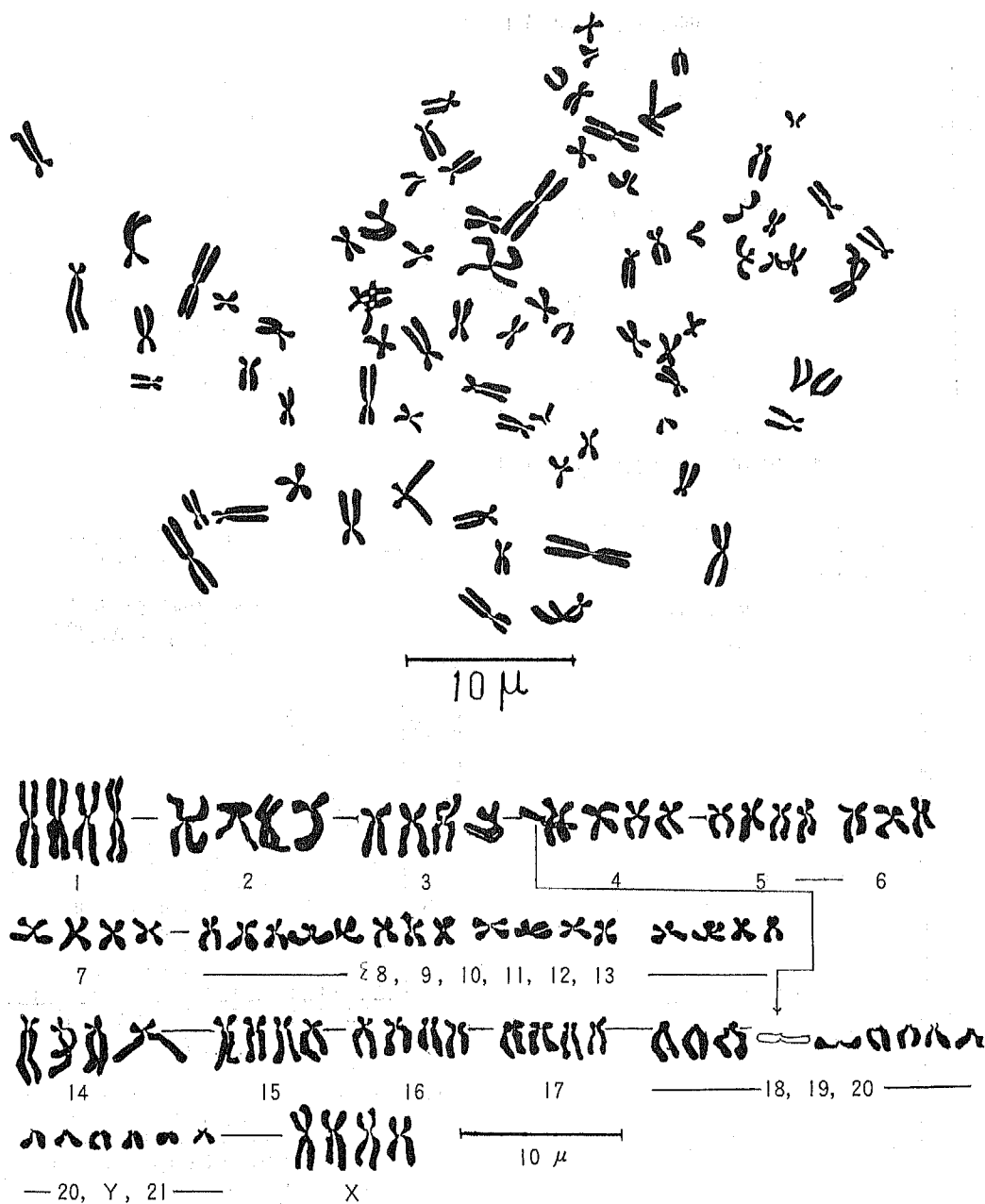


Fig. 2. An example of the karyogram in hypotetraploid RLE cell line.

がうかぶえる。

また、一般に認められているように、低4倍性のRLE細胞の増殖速度は著しく速くなっており、37°Cにおける generation time (doubling time) は約24時間であった。1965年2月に測定した diploid 型のRLE細胞の doubling time は約5~7日であったのに比べれば、polyploidy細胞の増殖速度がいかに

やいかに驚ろく程である(図4)。

このように増殖速度が早い点と、核型が異常であることから考えて、低4倍性RLE細胞が悪性転換をしているのではなからうかと疑い、約10⁶個の細胞を2匹の成熟家兎の前眼房に注射し、異常増殖がおこるか否かしらべた。しかし1ヶ月に亘る観察期間中においては、著しい細胞増殖は認められなかった。

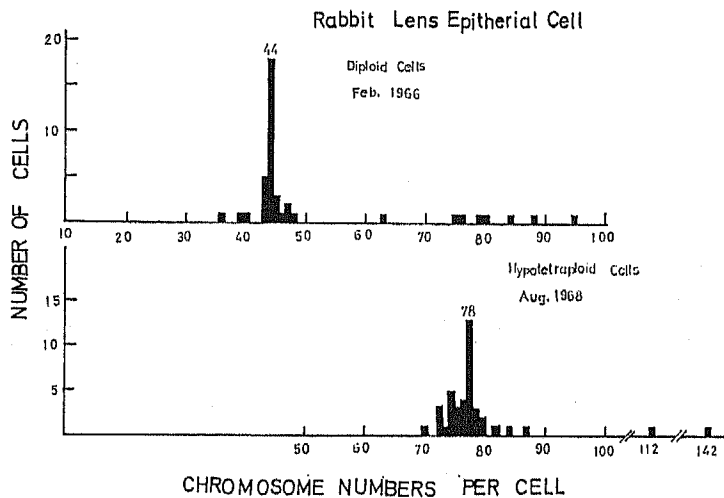


Fig. 3. Frequency distributions of chromosome number per cell in the rabbit lens epithelial (RLE) cell line in 1966 and in 1968. In February 1966, 17th months after the *in vitro* cultivation began, diploidy cells with 44 chromosomes were predominant. In August 1968, however, the karyotype became heteroploidy and 78 chromosomes were predominant in the cell population.

Table 1 Frequency distributions of chromosome number per cell of the rabbit lens epithelial (RLE) cell line

Chromosome number per cell	Frequencies	
	Feb. 1966	Aug. 1968
<35		
36	2	
37		
38		
39	1	
40	1	
41		
42		
43	5	
44	18	
45	3	
46	1	
47	2	
48	1	
49		
50		
...		
63	1	
64		
65		
66		
67		
68		
69		
70		1
71		
72		
73		3
74		1
75	1	5
76	1	3
77		4
78		13
79	1	3
80	1	1
81		1
82		
83		
>84	3	5

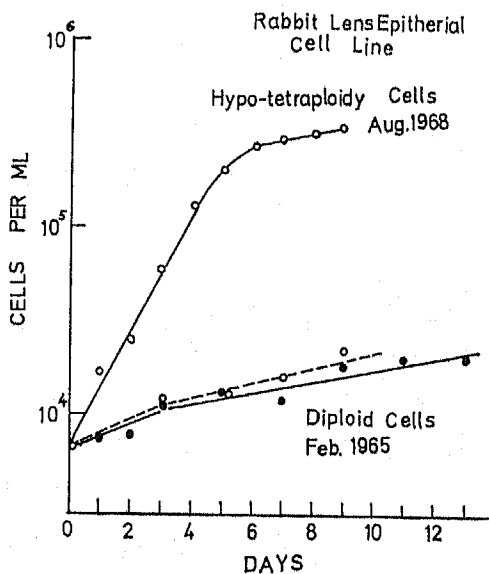


Fig. 4. Growth rates of the "Rabbit Lens Epithelial" cell line in 1965 and in 1968. In February 1965, the doubling time of the cells whose karyotype was near diploidy was approximately 5 days. Whereas, in August 1968, it was found that the cells grew very rapidly with a doubling time of about 24 hours at 37°C, and that their karyotype was heteroploidy in which 78 chromosomes were predominant.

考え方

家兔染色体の分類方式について：前報でも触れたように、家兔 (domestic rabbit) の正常染色体は44本で、21対の常染色体と1対の性染色体より構成されて

いることは Painter²⁾(1926) 以来ひろく認められている。しかし、染色体群の分類方式、配列のし方、記号のつけ方などは研究者によってまちまちで、統一を欠いているようである¹⁾。

最近 Valenti & Friedman⁴⁾(1968) はヒトの核型の標準的な表現方式 (Denver in 1960, London in 1963, Chicago in 1966) にならって、染色体を大きい順から配列し、かつ着糸点の位置を規準として家兎核型を A, B, C, D, E, F および X, Y であらわすことを提唱している。たしかに、この方式は従来の報告 (例えば最近の Pruniéras *et al.*⁵⁾, (1965) の成績) にもよく適合するし、有用のように思われる。

しかし、私たちは、前報と同様に Dave *et al.*⁶⁾ (1965) の方式に従って、やまゝ大まかな核型分析に止めたい。(図5および表2参照)。なぜなら、長期間培養された異数性の細胞においては、各染色体にかなりの変化がおこっていると考えられるので、あ

まり詳しい分析は意味が少ないと思われるからである。

この grouping に従って、低4倍性 RLE 細胞の染色体を配列した結果を図1, 2に示す。こゝにみられるように、約80個の染色体は図5に示した模式図に似た次の4群の group で構成されていることがわかる。A群(大, 中, 小型の Meta ないし Submetacentric, No. 1~13 および X 染色体), B群(大型の Subtelocentric, No. 14~17), C群(小型の Telocentric, No. 18, 19), および D群(小型の Acrocentric, No. 20, 21, および Y 染色体)。

これらの核型において家兎に特有の marker chromosomes である No. 14~17 の Subtelocentric および No. 18, 19 の Telocentric な染色体が明らかに認められるので、私たちの RLE 細胞系が家兎由来のものであることは明らかである。また私たちがうえついでいる HeLa, VERO, L, Hamster Kidney 細胞系によるコンタミネーションもはっきり否定できる。

まとめ

1964年9月7日に培養を始めた家兎水晶体上皮組織由来の RLE 細胞系は、17ヶ月後までは diploid 型の核型を維持していたが48ヶ月後の分析では異数(低4倍)性に変化していることが認められた。

細胞の増殖速度も diploid 型の時代(37°C における doubling time は5~7日)に比べ著しくはや

Table 2 Chromosome grouping of the karyotype of the domestic rabbit proposed by Dave *et al.*⁶⁾(1965)

Group	Number	Description of the chromosomes
A	1 to 13 and X	Meta-Submetacentric
B	14 to 17	Subtelocentric
C	18, 19	Telocentric
D	20, 21 and Y	Acrocentric

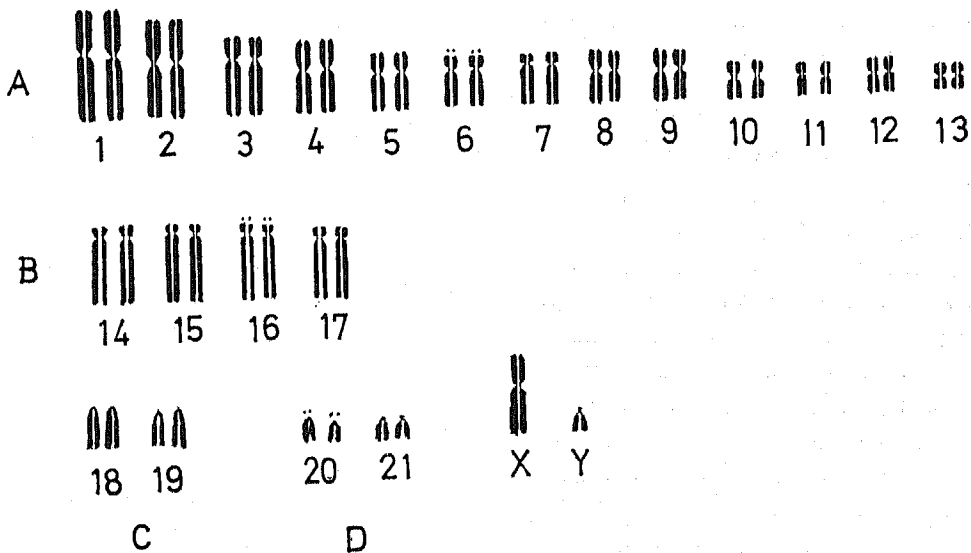


Fig. 5. Schematic representation of the chromosomes of the domestic rabbit (male). Classification is done according to Dave *et al.* (1965). Satellites are seen on chromosomes of No. 6, 16 and 20 (Pruniéras *et al.*, 1965).

くなり、約24時間の doubling time で活潑な増殖を続けている。

ただし、成熟家兎の前眼房内接種によっては RLE 細胞の異常（悪性）増殖は認められなかった。

（1969年11月現在培養続行中。希望者には株分与に応ずる）。

lated into anterior chambers of some adult rabbits.

（昭和44年5月16日 受付）

文 献

- 1) 山波 洋・山田喜紹・田崎忠勝・田村茂博・村上昇：家兎水晶体上皮組織より確立された R L E 細胞系の核型について，信州医誌，16：68，1967.
- 2) 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，69：317，1965；Long-term cultures of epithelial cells of a rabbit lens. Jap. J. Ophthal. 9：177，1965.
- 3) Painter, T. S. : Studies in mammalian spermatogenesis. VI. The chromosomes of the rabbit. J Morph. 43：1，1926.
- 4) Valenti, C., and Friedman, E. A. : Long-term cultivation of diploid rabbit skin cells. Texas Reports Biol. & Med. 26：363，1968.
- 5) Pruniéras, M., Jaquemont, C., et Mathivon, M. F. : Études sur les relations virus-chromosomes V. Le caryotype du lapin domestique. Ann. Inst. Pasteur, 109：465，1965.
- 6) Dave, M. L., Takagi, N., Oishi, H., and Kikuchi, Y. : Chromosome studies on the Hare and the Rabbit. Proc. Japan Acad 41：224，1965.

ABSTRACT

The karyograms in a long-term cultured cell line, established in our laboratory from rabbit lens epithelial tissues, have been investigated. The rabbit lens epithelial (RLE) cells have had near diploidal karyogram with 44 chromosomes until 17th month after the initiation of *in vitro* cultivation. However, the karyotypes of the cell line in 48th month have been found to be hypotetraploidy, where 78 chromosomes are predominant in the cell population.

The hypotetraploid RLE cells grow rapidly in monolayers at 37°C with a doubling time of approximately 24 hours. However, they fail to propagate *in vivo* even when 10⁶ cells are inocu-