

血清肝炎恢復患者の胸水内細胞にみられた 染色体異常について*

昭和42年5月30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

信州大学医学部附属病院中央検査部病理検査室

(部長：戸塚忠政教授)

丸 山 雄 造

信州大学医学部学生

村 上 昇

CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN HEPATIC CELLS OF A SERUM HEPATITIS PATIENT DURING CONVALESCENCE

Yoh Tanami, Yoshitsugu Yamada and Tadakatu Tazaki

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Shinshu University

Yuzo Maruyama

Central Clinical Laboratories, Shinshu University Hospital

(Director: Prof. T. Tozuka)

Noboru Murakami

Student of Faculty of Medicine, Shinshu University

まえがき

Nichols ら^① (1962) が麻疹患者について見出して以来、数多くのウイルス感染症、即ち、麻疹、流行性耳下腺炎、水痘、風疹などの際に流血中白血球に染色体異常が報告された^{②~⑩}。最近に至つて、伝染性および血清肝炎患者でも同様の核型異常（主に染色体切断）がおこることが確認され、ウイルス性肝炎の際の新しい知見として注目を惹いている^{④~⑦, ⑭}。

このことはヒト白血球が肝炎ウイルスに感受性をもつことを暗示し、白血球培養による肝炎ウイルスの分離培養の可能性を示唆する。

私どもは血清肝炎恢復過程にある患者の貯留胸水中の細胞（多数の肝細胞を含む）の核型分析を行つたところ non-random な傾向をもつ核型異常を見出した。現在のところ、この核型異常が血清肝炎の結果生じたという確証はないが上の諸報告と考えあわせてみると興味深い成績と考えられるので参考までにここに報告したい。

患者の病歴

本報告に関係があると考えられる項目について、以下簡単にのべる。

患者名 Y. M. 46才。男。会社員。

1965年9月15日、信州大学医学部附属病院（丸田外科）で胃潰瘍のため胃切除術をうけ、そのとき三人の供血者から夫々 100 ml ずつの新鮮血輸血をうけた。手術後の経過は良好であつたが、同年10月5日黄疸が発症し、GOT および GPT 値の上昇がみられた。上の手術時にうけた輸血による血清肝炎と推定され、治療によりトランスアミナーゼ値は低下し11月2日退院した。

翌1966年2月16日全身倦怠を訴えて、松本市A病院を訪れた。当時黄疸は認められず GOT、GPT 値は夫々50および55単位で軽度の上昇が認められた。また、肝一横指を触知し、肝炎の既往から一応その遷延化を疑い経過を観察した。4月19日の検査では GOT 値が97単位、GPT 値は137単位で明らかな上昇を示していた。肝は2横指触知したが柔らかかつた。

4月26日同病院に入院。5月6日肝生検を実施。その結果ではグ氏鞘へのリンパ球等の浸潤はなく、小葉間結合組織の増生が目立つ程度で著変は認められていない。

* 本研究の要旨は、昭和41年11月、日本組織培養学会第22回研究会（東京）“疾患と組織培養”に関するシンポジウムで報告した。

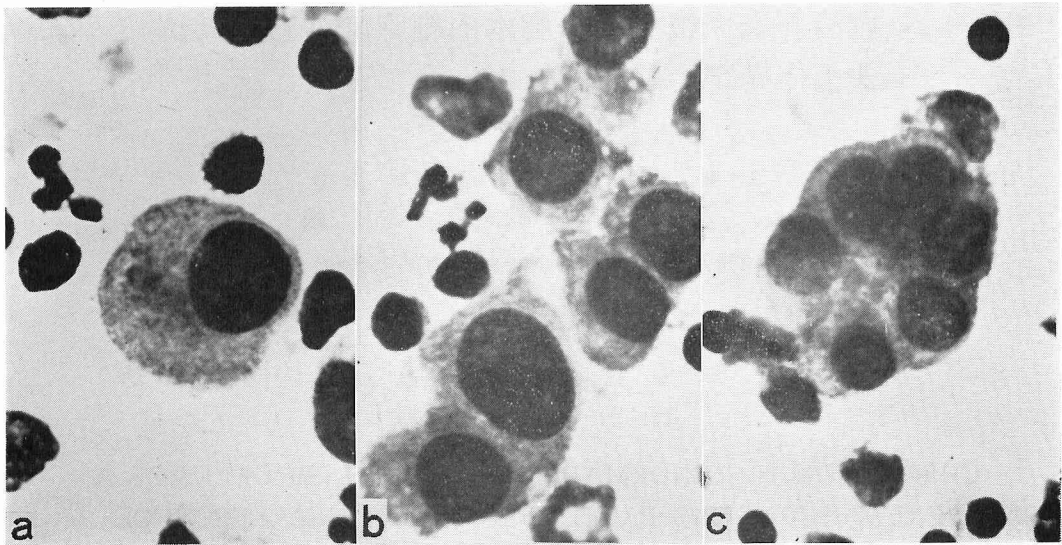


Fig. 1. Smear preparations for cytological examination of a specimen taken from the pleural effusion of a serum hepatitis patient. There can be seen many hepatic cells that are seemingly malignant, having large nuclei, basophilic cytoplasm and showing anisocytosis. Cells in picture c (right) are forming a pseudo-gall duct. Giemsa stain. Magnification : $\times 500$.

5月16日信州大学医学部附属病院小田内科に転入院。主訴は食思不振、全身倦怠感、 38°C 前後の発熱。当時皮膚はやや黄疸がみ、黄疸指数は10、血清 GOT, GPT 値は夫々40と66単位であつた。

6月16日患者は右胸部の疼痛を訴え、X線検査によつて右胸水貯留を見出した。6月17日採取した胸水の沈渣の細胞診の結果、多数の好中球、中皮細胞とともに肝癌細胞を疑わせる大型異型細胞が観察された(図1)。血液平板培養による胸水の細菌検索は陰性であつた。

6月27日、再び胸水約70mlを採取し、細胞診および細胞培養を行つた。細胞診では前と同様の異型細胞が多数見出された。

7月6日、 ^{198}Au (500 μC) を静注し、1時間後に肝部位のシンチレーション・スキヤニングを行つたが、肝腫瘍を疑わせるような所見は得られなかつた。

7月25日、胸水60mlを採取。夫々細胞診と細胞培養に供した。細胞診の結果先の異型細胞の著減が認められた。

8月に入ると、全身状態の回復とともに、胸水貯留が減少し、9月7日のX線検査に至つてその完全な消失が認められた。

1966年11月8日退院。

以後、経過観察のため時折来院しているが、1967年

5月現在までのところでは、悪性腫瘍を疑わせるような所見は全く得られていない。

細胞培養と核型分析法

細胞培養法 上の患者から、1966年6月27日と、7月25日夫々採取した胸水について次の要領で胸水内細胞の培養を行つた。

採取した胸水(約10ml)に等量の Eagle-Hanks 培養液(10% 仔牛血清, Penicillin-G 100 units/ml, Streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加)をまぜ、数本の培養角瓶に分注して 37°C で静置培養した。翌日までに中皮細胞と肝細胞はガラス壁に固着し、増殖の態勢を示していたが、リンパ球、好中球などは萎縮して了解開を示さなかつた。

培養液は2～3日毎に交換した。

核型分析法 いわゆる乾燥法によつた。その手順のあらましは次の通りである。6月27日採取した胸水の培養(第1回目の培養と呼ぶ)では4日目に、7月25日採取した胸水の培養(第2回目の培養と呼ぶ)では培養開始後14日目に細胞の増殖が顕著になつて来たので核型分析を行つた。

コルヒチン処理に先だち、前日に新しい培養液に交換して細胞の増殖率を高めておき、コルヒチン(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を含む新しい培養液で8～10時間培養する。

EDTA 処理 (室温 5 分) で細胞をガラス壁からはがし、ゆるい回転 (500 rpm, 5 分) で細胞を集め、1.12% クエン酸水溶液に浮べて低浸透圧処理 (室温 15 ~ 20 分) をする。再び、低速回転で細胞を遠心沈澱し、カルノア液に再浮遊させて固定 (5 分) する。再び遠心操作によつて細胞を集め、 $1/10$ 量のカルノア液にうかべて濃い細胞浮遊液をつくる。これを 0°C にひやした清浄のセガラス (予かじめ HCl アルコールでよく磨いたのち、蒸溜水に浸し冷蔵庫に保存する) 上

に滴下し、急に乾かして染色体の分離をおこさせる。

染色体の染色には 45% 醋酸溶液に 1% の割合にゲンチアナ紫を溶かした液を用い、核型分析はすべて顕微鏡写真像に基づいて行つた。

末梢血中の白血球培養は行わなかつた。

成 績

夫々第 1 回と第 2 回細胞培養についてえられた染色体数の頻度分布を図 2 に示す。

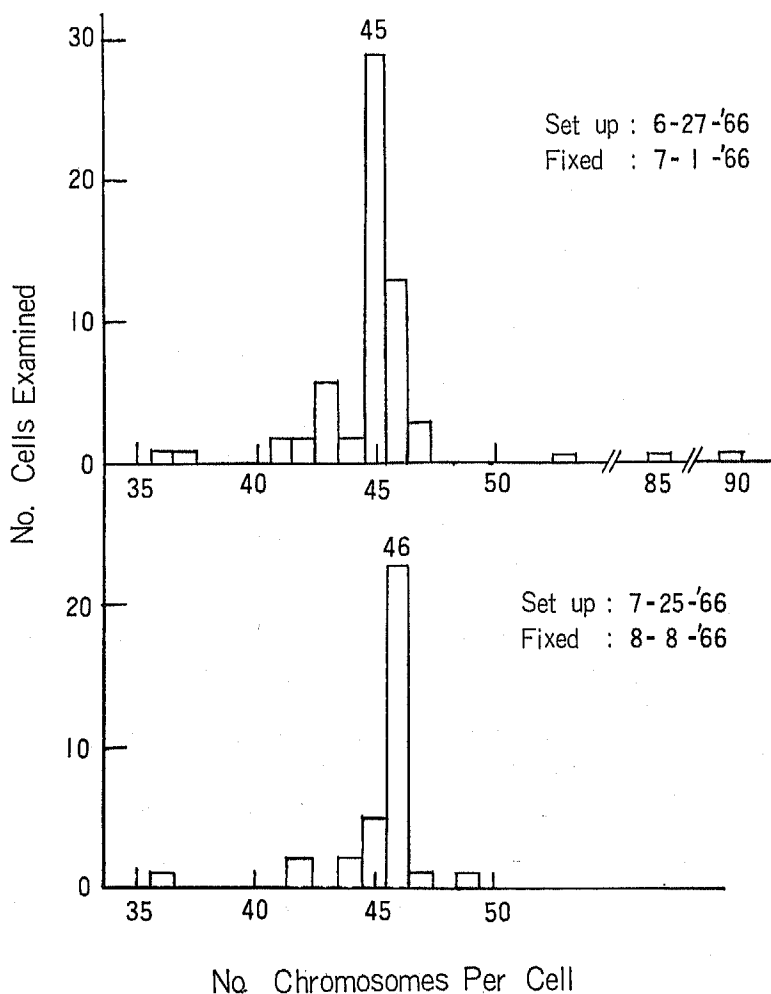


Fig. 2. Frequency distributions of chromosome numbers per cell in cell cultures originated from pleural effusions of a serum hepatitis patient during convalescence. It is noted that in the first cell culture (above) which contained many hepatic cells, cells with subdiploidy of 45 chromosomes were predominant. Whereas, in the second cell culture (below), which contained only a small number of hepatic cells, euploidy cells with 46 chromosomes were predominant.

ここに見られるように、胸水貯留の最も多かった6月27日に採取した第1回培養材料では45本の染色体をもつ subdiploid の核型が最も多く全体の47%を占めているのに対し、胸水減少期の7月25日採取材料(第2回培養)については、正常の diploid 型(46本)が最多数(66%)であることが注目される。病歴の項でのべたように、第1回培養材料中には多数の異型細胞が含まれていたが、第2回培養材料中には同細胞はごく僅かしか含まれていなかった。それ故、第1回目の培養で高頻度に見出された subdiploid の核型は、恐らく肝由来の異型細胞の核型異常を反映しているものと推量される。

第1回培養において見出された異常核型の idio-gram のいくつかを次に示す。

図3に示す核型はE群染色体(No. 16~18)のうちのひとつを欠いた45本型で、この形式の異常が最も多く見出された(表1)。

図4~6に示す核型ではD群(No. 13~15)染色体の一員と、E群の一員とが terminal fusion をおこしており、その結果染色体数はみかけ上45本となつてゐる。

図7にはD群染色体のひとつが欠失したことによる45本型の核型を示す。

図8には、第2回目培養で最も多くみられた正常核型の1例を示す。

以上各種の異常核型の出現頻度分布を表1にまとめて示した。ここにもみられるように、染色体の欠失ないしは融合の異常が、D、E群を中心におこっている non-random なものである点が興味深く思われる。

Table 1. Frequency distribution of abnormal karyotypes seen in cells obtained from pleural effusions of a serum hepatitis patient during convalescence.

Abnormalities	Frequencies
Missing of two members of the group C.	3
Monosomy for a member in the group E.	9
Terminal fusion between members belonging to the groups D/E.	4
Monosomy for a member in the group D.	1
Monosomy for a member in groups D and E, respectively.	1
(Total	18)

考 え 方

Nichols ら^{①-③}(1962, 1963, 1964)が麻疹患者の白血球に高頻度に染色糸(体)切断がおこることを報告して以来、ウイルス病と染色体異常の関係が注意をひくようになった。

生体レベルの知見では黄熱ウイルス生ワクチン接種の際(Harnden^④, 1964)、流行性耳下腺炎、水痘患者(Aula^⑤, 1963)に高い頻度で染色体切断が見出されている。

In vitro 培養細胞へのウイルス感染実験では、単純ヘルペス・ウイルス/チャイニーズ・ハムスター細胞系(Hamper & Ellison^⑥, 1963)のほか、SV40, Polyoma, Rous sarcoma ウイルス等の腫瘍ウイルス感染に際し、染色体切断や特定の傾向をもつた染色体異常がみられている^⑦。

内海ら^⑧(1965)によれば、興味深いことには、In vivo でシリアン・ハムスターに腫瘍をつくるヒト由来アデノ・ウイルス12型および18型を In vitro でハムスター胎児細胞に感染させた場合著しい染色体切断をおこさず、逆に造腫瘍性でない5型と7型の感染の際に、激しい染色体切断がみられたという。

いずれにしても、一般的な考え方として、多くのウイルス感染症において、患者の体細胞に染色体レベルの“病変”がおこる点は記憶する必要がある。

ウイルス性肝炎(伝染性および血清肝炎)の際にみられる末梢血白血球の染色体切断はとくにB群(No. 4~5)やD群(No. 13~15)染色体の長腕中部に好発するという(El-Alfi^④, 1965; Aya & Makino^⑥, 1966; Aya, Makino & Hirayama^⑦, 1966)。

その他、染色体切断、転移、chromatid interchange, その他の染色体異常も見出されているが、細胞あたりの染色体数の異常例は一般には認められないという。

私どもの例についてみると、上に示された核型異常が果して血清肝炎の結果生じたものかどうか、現在のところ断定できないが、染色体の異常が主にD、E群を中心におこっている点に興味を抱いている。

本患者にみられた核型異常が、潜伏中の悪性腫瘍の核型異常を反映しているという可能性は、少なくとも現時点(1967年5月)において、悪性腫瘍の兆候が全く認められない事実と一致しない。

× × ×

終りに本題に関連があると思われる事柄として、次の報告をつけ加えたい。Stoller & Collman^⑨(1965)はオーストラリアのビクトリア州における伝染性肝炎の流行時期に約一年遅れて Down's syndrom

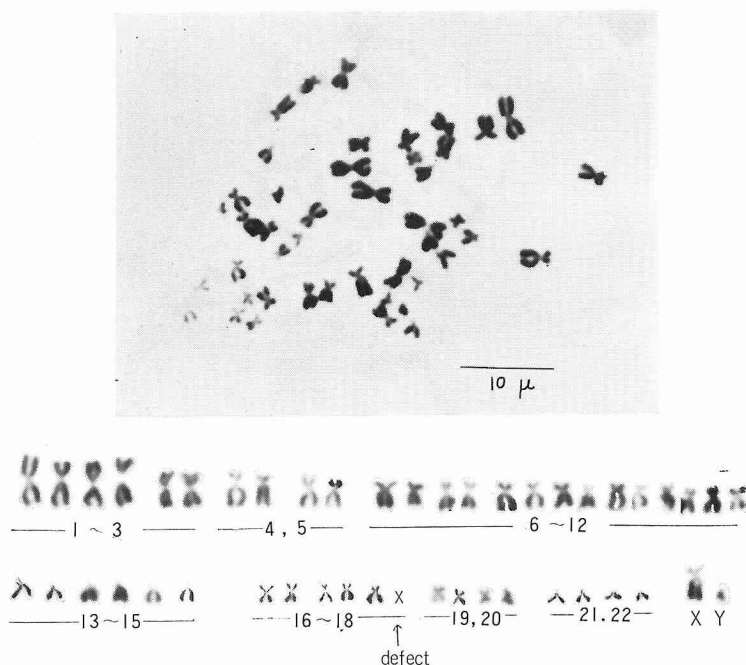


Fig. 3. The karyotype has 45 chromosomes with monosomy for a member in the group E (No. 16 to 18). This chromosomal deletion was detected most frequently.

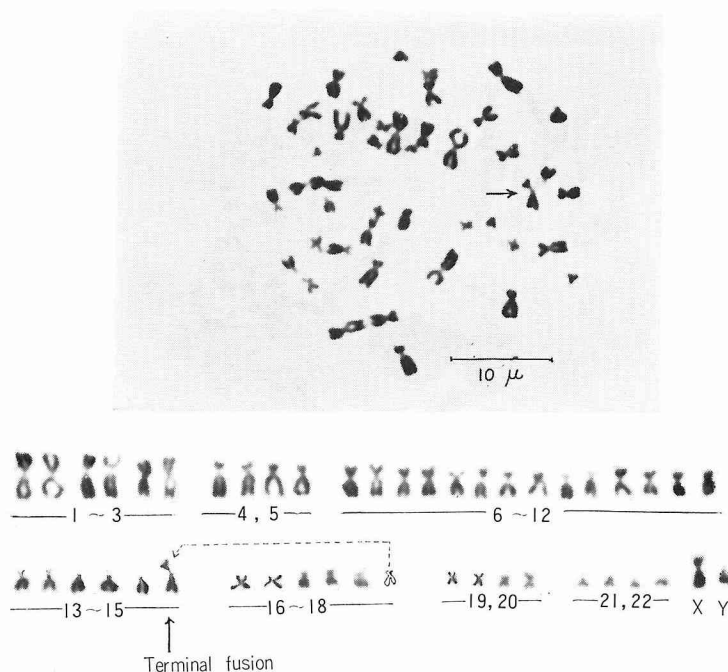


Fig. 4. The karyotype is subdiploid (45 chromosomes) with an end-to-end alignment of the members belonging to the D and E groups. Thus, a member of the E group was apparently lost.

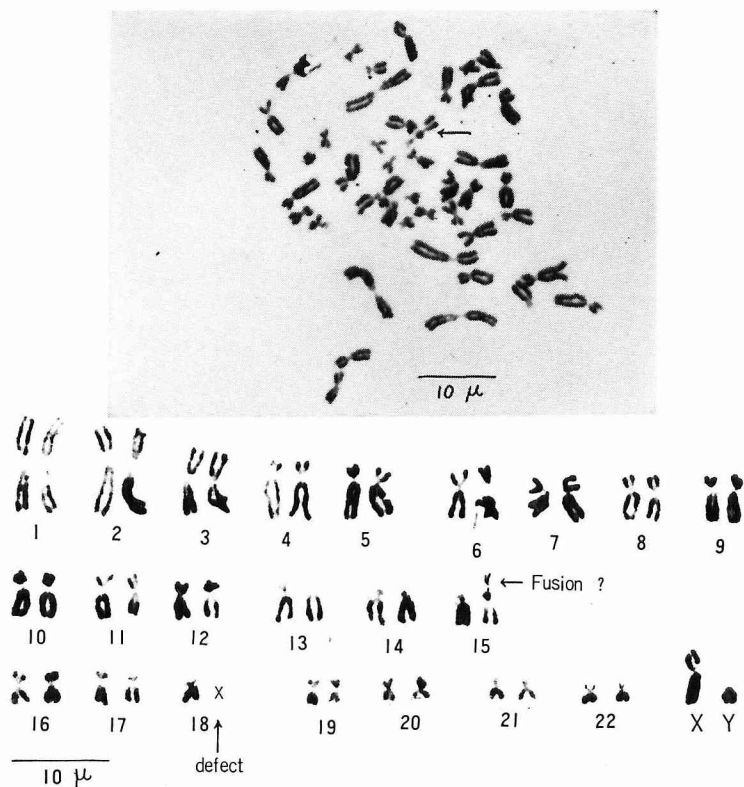


Fig. 5. The karyotype is similar to that in Fig. 4.

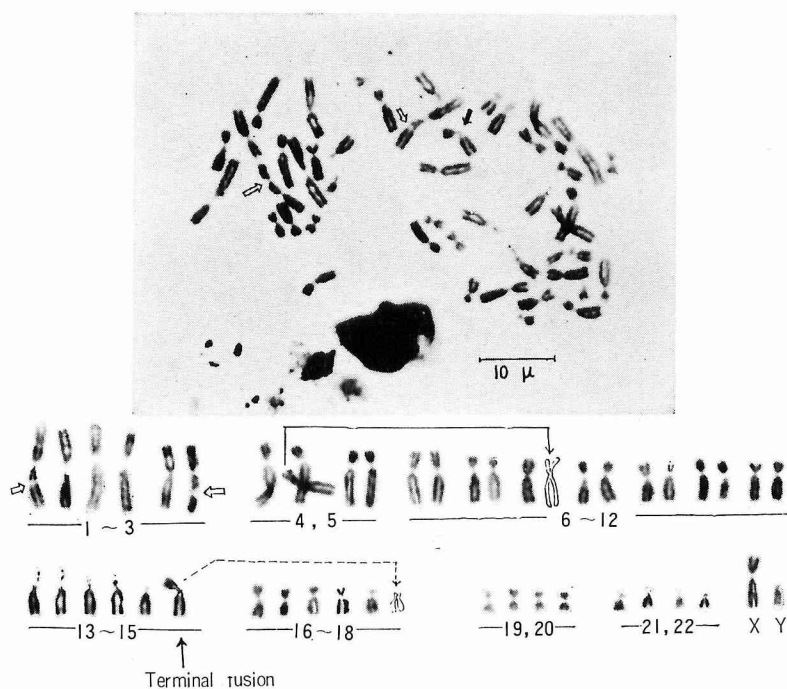


Fig. 6. The karyotype is similar to that in Fig. 4. A terminal fusion is indicated by a black arrow. Chromatid breaks are seen in large meta-centric chromosomes as indicated by white arrows.

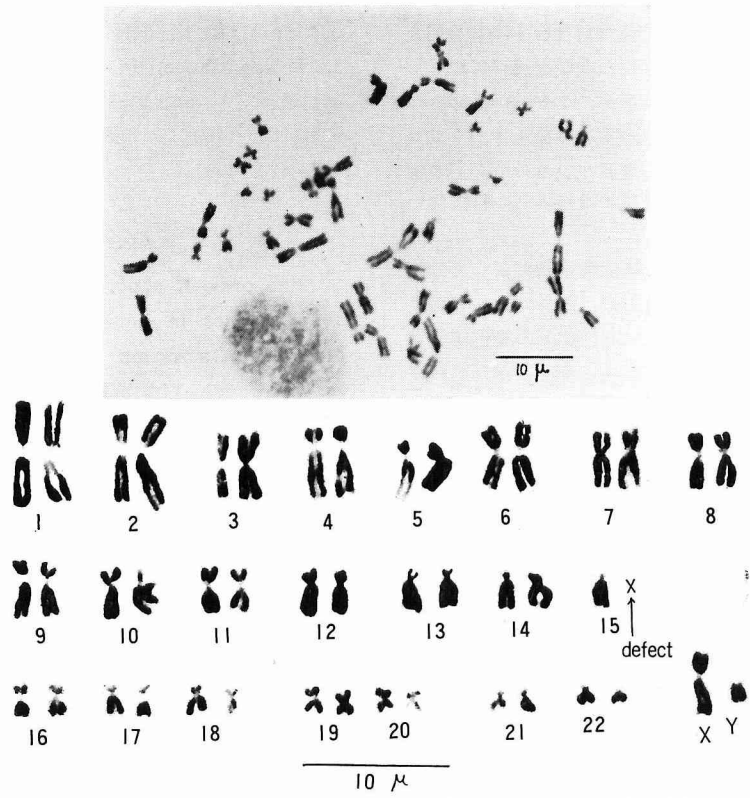


Fig. 7. The karyotype was subdiploid also (45 chromosomes) with one member of the group D missing.

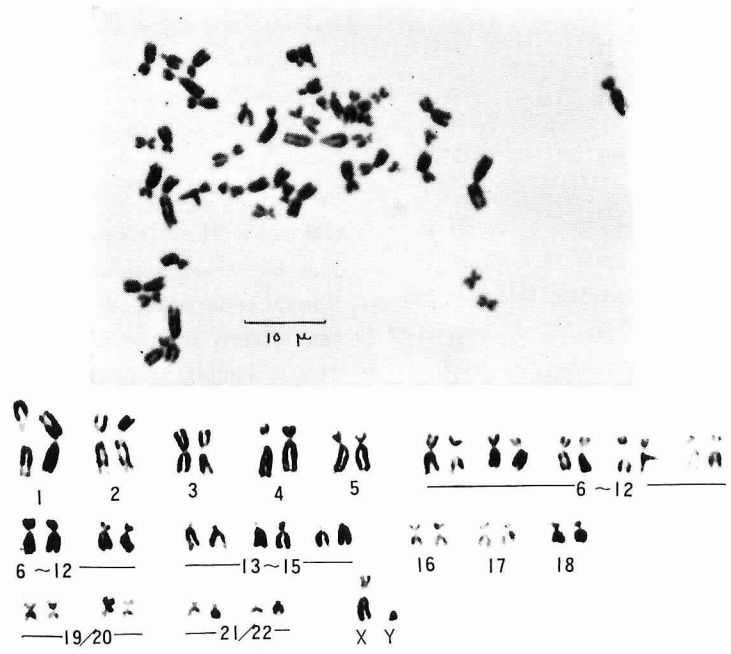


Fig. 8. This shows a normal euploid karyotype which was predominant in the second cell culture in which there was only a small number of hepatic cells.

(Mongolism) 患者の多発がおこるという疫学的相関々係から、両疾患の間に染色体異常でむすばれる何らかの因果関係があるのではなからうかと述べている。この推量の当否は今後の問題だが、Down's syndromeでは染色体の一部の異常(第21番目の染色体がトリソミーである)が疾病の特徴とされているので、上の推量が単なる“こじつけ”とばかりはいいきれない^⑭。

肝炎ウイルスを小動物または組織培養によつて分離する、という今後の課題とともに、肝炎ウイルス感染によつて生ずる患者体細胞ないし性細胞の染色体異常が子孫に遺伝的影響を与えるか否か今後みきわめねばならぬ重要な問題と考えられる。

ま と め

恢復期の血清肝炎患者の胸水内細胞(肝細胞を含む)を培養し、核型分析を行つたところ、E群染色体のひとつの欠失と、D/E群間の terminal fusion に基づく subdiploid 型の核型異常がみとめられた。

しかし、これらの核型異常が、直接血清肝炎の結果生じたものかどうかは結論づけられなかつた。

謝 辞

終りに、原稿の御校閲を賜つた信州大学医学部小田教授、ならびに資料の提供に便宜を与えられたほか、種々の御助言を賜つた荻原助教授に厚く謝意を表します。

文 献

- ①Nichols, W. W., Levan, A., Hall, B., and Ostergren, G.: *Hereditas* **48**, 367-370, 1962
- ②Nichols, W. W.: *Hereditas* **50**, 53-80, 1963
- ③Nichols, W. W., Levan, A., and Kihlman, B. A.: In "Cytogenetics of cells in Culture", Academic Press, N. Y. & London, 1964, pp. 255-271
- ④El-Alfi, O. S., Smith, P. M., and Bieseke, J. J.: *Hereditas* **52**, 285-294, 1965
- ⑤Mella, B., and Lang, D. J.: *Science* **155**, 80-81, 1967
- ⑥Aya, T., and Makino, S.: *Proc. Jap. Acad.* **42**, 648-653, 1966
- ⑦Aya, T., Makino, S., and Hirayama, A.: *Proc. Jap. Acad.* **42**, 1088-1093, 1966
- ⑧Harnden, D. G.: *Am. J. Human Genetics* **16**, 204-213, 1964
- ⑨Aula, P.: *Hereditas* **49**, 451-453, 1963
- ⑩Hamper, B., and Ellison, S. A.: *Proc. N. A. S. U. S.* **49**, 474-480, 1963
- ⑪内海和彦:

Jap. J. Genetics **40**, 241-249, 1965 (総説)

⑫Utsumi, K. R., Kitamura, I., and Trentin, J. J.: *J. Nat. Cancer Inst.* **35**, 759-767, 1965

⑬Stoller, A., and Collman, R. D.: *Nature* **208**, 903-904, 1965

⑭Evans, H. J.: *Nature* **214**, 419-420, 1967

ABSTRACT

The present paper deals with chromosomal abnormalities in hepatic cells from pleural effusions of a serum hepatitis patient during convalescence. The patient (46 years old, male) had a gastric resection due to a gastric ulcer on September 15, 1965. On October 5, 1965, jaundice occurred and was considered to be caused by a serum hepatitis virus infection associated with transfusions during the above operation. By the end of October, the jaundice subsided. On February 11, 1966, he complained general languor. At that time SGOT and SGPT tests were positive. On June 16, X-ray examination showed pleural effusion of the right pleural cavity. Cytological examinations of the effusions revealed many hepatic cells, lymphocytes, red blood cells and mesodermal cells. The hepatic cells were seemingly malignant but this was not certain. The pleural effusion diminished gradually in August, and the hepatic cells disappeared by the end of August.

Cells harvested from pleural effusions were cultivated and karyotypes were analysed. Several abnormal karyotypes were found in the cell culture from the specimen taken on June 27, which contained many hepatic cells. Where cells with subdiploidy of 45 chromosomes were predominant (29 out of 62 cells). The chromosomal deletion effect was associated mainly with the absence of a certain member of the group E or to a terminal fusion between members belonging to the D/E groups. Chromatid breaks were seen occasionally but were not considered significant.

On the contrary, in the cell culture from the pleural effusion taken from the patient one month later, which contained only a small number of hepatic cells, euploidy cells of 46

chromosomes were predominant. This observation indicates that the abnormal karyotypes of the first specimen are probably associated with the hepatic cells which appeared transiently in the pleural effusions.

The hepatic cells appeared in the pleural effusions were seemingly malignant in character. However, clinical examinations (X-ray and scintillation scanning) of the liver region fai-

led to show any sign of neoplasm. Although it is plausible, results presented here do not provide conclusive evidence that these chromosomal changes are associated specifically with serum hepatitis infection. More evidence is required to confirm a direct relationship between serum hepatitis virus infection and specific chromosomal abnormalities.