

異性間骨髄移植後の血液細胞におけるキメリズムの 分子遺伝学的・分子細胞遺伝学的検討

家本 敦子

(武庫川女子大学家政学部食物学科)

Molecular biological and molecular cytogenetical studies on chimerism of blood cells after sex-mismatched bone marrow transplantation.

Atsuko Iemoto

Department of Food Sciences, Faculty of Home Economics,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan

In order to evaluate the chimeric state of blood cells after sex-mismatched bone marrow transplantation (BMT), polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques were applied. Both techniques were used for detecting Y-chromosome specific α -satellite DNA sequences. PCR positive bands were obtained when the DNA samples containing more than 0.1% of male subject-derived cells were used. PCR method is sufficiently sensitive to detect low frequent mixed chimerism. On the other hand, FISH technique using biotinylated α -satellite sequences as probes is efficient to detect Y chromosomes in interphase nuclei. As FITC-positive spots were detected in more than 99% of interphase nuclei of male-derived bone marrow (BM) cells, this technique was considered as useful to detect the surviving rate of the BM transplanted cells from a sex-mismatched donor to the recipient. Based on these results, the both PCR and FISH techniques were applied to 8 BMT patients. Comparing to the other methods such as chromosomal analysis, these techniques were more sensitive and accurate to monitor mixed chimeric state.

緒 言

骨髄移植 (bone marrow transplantation, BMT) は、白血病 (leukemia)¹⁾、再生不良性貧血 (aplastic anemia)²⁾³⁾⁴⁾、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome)⁴⁾⁵⁾⁶⁾ などの血液疾患や代謝異常症⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ 等の治療法として最近注目を浴びている。わが国でも 1975 年に急性リンパ性白血病に対して第一例目の BMT が行われて以来、1991 年までに約 1500 例の BMT 症例が累積されている¹¹⁾。BMT の予後を左右

する因子として最も注目されているのは、移植された骨髄細胞の生着率¹²⁾と移植片対宿主 (graft-versus-host, GVH) 反応¹³⁾である。そこで本研究では、BMT によって移植された骨髄細胞の生着率を検討することを目的とし、分子生物学的・分子細胞遺伝学的手法を用いて基礎的研究を行った。

現在まで、移植された骨髄細胞の生着率の検討には、異性間移植 (sex-mismatch) 症例において、血液細胞での X、Y 染色体の存在を分裂中期細胞を用いた染色体分析によって検討することが唯一の手段で

あった。しかしこの方法では、移植された骨髄細胞がまだ十分に分裂していないため、分裂中期細胞が得られない移植直後の時点での生着率を検討することは困難である。またこの方法では分析対象が分裂中期細胞に限られるため、細胞分裂周期に入っていない分裂間期 (interphase) 細胞の由来を検索できない。さらに染色体分析では、染色体分析の数が一般的には 20-50 個にとどまるため、低頻度のキメリズムが見逃される可能性もあった。以上の点から染色体分析から計算された生着率が、骨髄における実際の生着率と一致するかどうかについては疑問がもたれて来た。一方、末梢血ではレクチン等を加えない無刺激培養では分裂細胞は得られず、染色体分析は不可能であることから、生着率の検討には不適當であった。

そこで我々は染色体分析を用いず、Y 染色体特異 DNA の検出を試みることにした。このために polymerase chain reaction (PCR) 法と fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を用いた。PCR 法は、DNA ポリメラーゼ反応を利用して適当なプライマーを用いることにより、1 本鎖 DNA をテンプレートにして相補的な DNA を合成することができ、少量の DNA から目的の DNA 部分を約 100 万倍に増幅できることでよく知られる¹⁴⁾¹⁵⁾。一方 FISH 法は、プローブ DNA を用いたハイブリダイゼーションにより、遺伝子マッピングや染色体の同定に用いることができることで知られている¹⁶⁾。細胞周期は光学顕微鏡下では、分裂期 (M 期) とそれ以外の分裂間期 (G₀ 期, G₁ 期, S 期, G₂ 期) に区別される。細胞周期の長さにかかわらず分裂中期は約 1 時間で、分裂間期の方がはるかに長い。染色体分析は分裂中期に限られる。FISH 法は、分裂間期細胞でプローブがハイブリダイズするシグナルの数、大きさ、位置を分析することで染色体数や染色体異常を推定することができる場合があるため、分裂中期細胞に限られていた染色体分析を、分裂間期細胞に適用することを可能とした。検査対象の骨髄細胞では 95% 以上が、末梢血白血球ではほとんどが分裂間期にあり、分裂間期細胞を対象とした FISH 法では、少量の検体を得るのみで分析が可能である。

以上から、PCR と FISH の 2 法は、BMT 後未だ骨髄細胞が少ない時期にでも生着率の確認が可能であり、また正確な生着率の判断ができると考えられたため、これらの 2 法を併用して異性間移植症例における骨髄細胞の生着率の検討を行った。

材料および方法

1. 材料

A) B リンパ芽球様細胞株 (B-lymphoblastoid cell line, LCL)

正常男性、正常女性末梢血 B-リンパ球から Epstein-Barr Virus (EB ウィルス) を用いて樹立した¹⁷⁾¹⁸⁾。樹立株のうち正常男性由来の株は EB-NL-Ma, 正常女性由来の株は EB-NL-Ha を用いた。

B) 末梢血 (PB), 骨髄液 (BM)

ヘパリン採血を行った。BMT を受けた患者 (レシピエント) については BMT 前と後に、PB と BM について検索した。移植の供与者 (ドナー) については PB を用いた。コントロールとして BMT を受けていない血液疾患患者の PB と BM を用いた。異性間移植の BMT 例として、レシピエントが女性 / ドナーが男性を 3 例、レシピエントが男性 / ドナーが女性を 5 例について検討した。

2. PCR 法による Y 特異 DNA の検出

A) 細胞の限界希釈法による Y α サテライト DNA の検出

EB-NL-Ma 株浮遊液を段階的に PBS (-) (phosphate-buffered saline) で希釈し、最終的に 300 μ l に 1 細胞とし、この希釈液を 100 μ l ずつ 1.5ml エッペンドルフチューブに分注した。遠心して PBS (-) を除去後、H₂O 10 μ l を加えて電子レンジで 3 分加熱処理し、これをテンプレートとして PCR 法を 50 サイクル行った。

B) 男性・女性由来の LCL を混合した場合の Y α サテライト DNA の検出

EB-NL-Ma 株と EB-NL-Ha 株を 1:10⁴, 1:10³, 1:10², 1:10, 1:2, 1:1 の割合に混合し、各割合の総数を 10⁴ 個とした。PBS (-) で 3 回洗浄後、PBS (-) を除去、H₂O 30 μ l を加えて電子レンジで 3 分加熱処理し、これをテンプレートとして PCR 法を 50 サイクル行った。

C) 抽出 DNA からの Y α サテライト DNA の検出

注射筒にヘパリン採血した PB および BM の中に、PBS (-) を 1~2 倍量吸引し、針を上にしてた状態で数時間静置後、有核細胞を含むバッファーコート部分までを血漿とともに、50ml 遠心用チューブに移す。これを PBS (-) で希釈、遠心分離 (1200rpm, 10 分) する。PBS (-) 洗浄を 2 回繰り返す。有核細胞を分離した。LCL の場合は、10⁵ 細胞を PBS (-) で 2 回洗浄して用いた。

これらの細胞より IsoQuick (Nucleic acid extraction kit, MicroProbe) を用いて DNA を抽出し、これをテンプレートとして PCR 法を行った。DNA 抽出法は IsoQuick kit 使用方法の説明書に従った。

D) PCR 法の反応液

PCR 液の組成は 10 倍 PCR 緩衝液 (100mM Tris-HCl 緩衝液《pH8.3》, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01%ゼラチン) 5 μ l, 1.25mM の 4dNTP (dATP·dGTP·dCTP·dTTP, Pharmacia) を 8 μ l, 10% ホルムアミド (Boehringer) 5 μ l, 100ng/ μ l のプライマー 2 種 各 1 μ l, Taq ポリメラーゼ (Perkin-Elmer-Cetus) 1 ユニットにテンプレート DNA を加え総量 50 μ l とし、500 μ l エッペンドルフチューブに入れ、ミネラルオイル (Sigma) を約 100 μ l 重層した。Y 染色体動原体部分の DYZ3 ローカスの α サテライト DNA を増幅する PCR プライマーとしては Witt らの報告¹⁹⁾ による Y1:5'-ATGATAGAAACGGAAA TATG-3', Y2:5'-AGTAGAATGCAAAGG CTCC-3' を用いた。

E) PCR 法の条件と Y 特異 DNA の判定

PCR 法の条件は denaturation:95 $^{\circ}$ C, 30 秒, annealing :54 $^{\circ}$ C, 10 秒, extension:72 $^{\circ}$ C, 30 秒で 50 サイクル行った。機器は DNA thermal cycler (Parkin-Elmer-Cetus) を用いた。PCR 後のサンプルは NuSeive GTG agarose (FMC) 2% に SeaKem agarose (FMC) 1% を加えて作製したゲルに、TAE buffer を用いて泳動し、エチジウムブロマイドで染色、UV 照射下で DNA 増幅バンドの有無を検討した。

3. FISH 法による染色体 DNA の検出

A) ハイブリダイゼーションプローブ

ハイブリダイゼーションプローブとしては、Y 染色体の Yq12 部分を検出する DYZ1 と、Y, X, 8 および 17 番染色体の動原体部分の α サテライト DNA (alphoid repeat) を検出する DYZ3, DXZ1, D8Z1 および D17Z1 を用いた。これらはいずれもビオチンラベルで市販されているプローブ (Oncor) である。

B) 染色体標本の作製

ヘパリン採血した PB および BM より有核細胞を分離した。これは DNA 抽出法の有核細胞分離法に準じ、同時に行った。0.075M KCl, 室温で 20 分間、低張処理を行い、酢酸 1 容-メタノール 3 容で固定した。遠心後、酢酸-メタノールを加える操作をさらに 2 回繰り返した。スライドガラス上に固定された細胞懸濁液を数滴滴下し、火炎固定を行った。

C) FISH 法

FISH 法は高橋らの方法^{20,21)} を一部改変して行った。スライド標本はホルムアミド 7 容-2 \times SSC 3 容の液中で 70 $^{\circ}$ C, 2 分間の変性を行った。次に氷冷した 70% エタノール, 100% エタノールを各 10 分間通して風乾した。プローブとしては 10ng/ μ l ビオチン標識されたプローブ DNA 2 μ l を用い、10mg/ml トランスファー RNA (Sigma) 0.25 μ l, 10mg/ml 変性サケ精子 DNA (Sigma) 0.25 μ l, ホルムアミド 10 μ l を混合し、75 $^{\circ}$ C, 10 分間、変性を行った。一方、20 \times SSC 2 μ l, 10mg/ml 牛血清アルブミン (Boehringer) 1.5 μ l, 50% 硫酸デキストラン (Sigma) 4 μ l を混合し、これに上記変性プローブ DNA 液を加えてハイブリダイゼーション液とした。このハイブリダイゼーション液を変性したスライド標本にのせ、その上にパラフィルムをかぶせて、気泡を除去しながら溶液を均一に拡げて、湿室で、4 時間ないし 18 時間、37 $^{\circ}$ C でハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション終了後、パラフィルムを除き、スライド標本をホルムアミド 1 容-2 \times SSC 1 溶液に浸し、時々振盪しながら、30 分間、42 $^{\circ}$ C で洗浄した。その後 2 \times SSC, 1 \times SSC で室温、各 10 分間、0.1% トリトン X を加えた 2 \times SSC, 2 \times SSC で各 10 分間洗浄した。つづいて 2.5mg/ml アビジン-FITC 液 (Boehringer) を 1% 牛血清アルブミンを加えた 4 \times SSC で 500 倍希釈し、スライド標本上にのせ、パラフィルムをかぶせ、5 分間室温でインキュベートした。その後 0.1% トリトン X を加えた 4 \times SSC, 4 \times SSC で室温、各 10 分間洗浄した。次に 20 μ g/ml となるように 0.1% トリトン X を加えた 4 \times SSC で希釈したビオチン(フナコシ)液で 5 分間室温で反応させ、前回と同様に洗浄した。再び上記のアビジン-FITC 染色液で 5 分間室温でインキュベートし、同様に洗浄した。その後プロピディウムアイオダイド液 (100 μ g のプロピディウムアイオダイド (Sigma) をグリセロール 90ml, diazabicyclooctain (Sigma) 1.25g, PBS(-) 10ml, pH8.8 に溶解したもの) で封入して 30 分以上カウンター染色した後、蛍光顕微鏡 (Nikon FLUOPHOT) B 励起を用いて観察した。FITC 特異蛍光の有無は B 励起 IF520~545 フィルターで確認した。写真撮影はコダックエクタクローム ASA400 で行った。

D) 検出率

コントロール検体の PB または BM 細胞を用いて分裂間期核 1000 個以上をカウントし、シグナル数ごとに割合を計算した。また BMT 症例についても同様に、ドナー細胞の数を百分率で表した。

結果および考察

1. PCR 法による Y 特異 DNA の検出

A) 限界希釈法による Y α サテライト DNA の検出

PCR 法を行った計 30 個中、12 個に PCR 産物が検出された(図 1)。300 μ l 中に 1 個の細胞があるように希釈されたものを 100 μ l ずつ 3 本のチューブに分注を行ったため、理論的には 3 本のチューブのうち 1 本にのみ細胞があることになり、実際 1/3 の確率で PCR 産物が得られた。このことは絶対数として 1 個の細胞があれば Y α サテライト DNA が検出できることを示していると考えられた。

B) 男性・女性由来の LCL を混合した場合の Y α サテライト DNA の検出

EB-NL-Ha 株 10⁴ 個に EB-NL-Ma 株 10 個を加えた場合 PCR 産物が検出された(図 2 lane 7)。しかし 10⁴ 個に 1 個加えた場合には検出されなかった(図 2 lane 8)。これらの結果から 10³ 個に 1 個の割合で Y 染色体をもつ細胞があれば PCR 産物が検出できることがわかった。DYZ3 は 1 細胞あたり 3000copy あると報告²²⁾²³⁾されており、このような高感度で検出できることが判明した。

C) 男性・女性由来の LCL を混合し抽出した DNA からの Y α サテライト DNA の検出

計 10⁵ 個の LCL を用い EB-NL-Ha 株 10⁵ 個に EB-NL-Ma 株 10² 個の割合で混合した場合、PCR 産物が検出された(図 3 lane 7)。10⁵ 個に 10 個加えた場合は検出されなかった(図 3 lane 8)。これらの結果は上記と同様に 10³ 個に 1 個以上の頻度で陽性細胞が存在すると PCR 法において全てポジティブになることを示している。

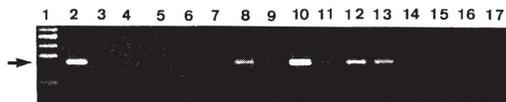


Fig. 1. PCR analysis of Y- α satellite DNA using limiting dilution

→: 170-bp Y-chromosome specific PCR product

lane 1: DNA size marker (phi X Hae III digest)

lane 2: positive control

lane 3-17: Five sets of 300 μ l PBS(-) containing a male derived-LCL were evenly divided into fifteen tubes. Each tube was used as a PCR template.

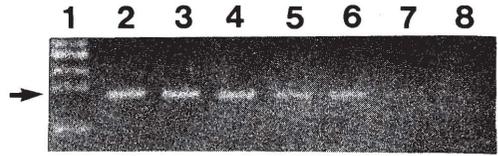


Fig. 2. PCR analysis of Y- α satellite DNA using mixed male-origin and female-origin LCL.

→: 170-bp Y-chromosome specific PCR product

lane 1: DNA size marker (phi X Hae III digest)

lane 2-8: LCL mixture of male-origin and female-origin at a ratio of lane2; 1:0, lane3; 1:1, lane4; 1:2, lane5; 1:10, lane6; 1:10², lane7; 1:10³, lane8; 1:10⁴, was used as a PCR template.

PCR 法を用いた Y α サテライト DNA の検出は迅速で、検体採取後 3 時間以内に結果を得ることが可能、しかも高感度で少量の残存細胞を検出するには適していた。しかし以上の結果から、男性由来細胞が 1/10³ 以上の場合、正確なキメリズムやモザイクの頻度の判定は困難であることが判明した。



Fig 3. PCR analysis of Y- α satellite DNA extracted from mixed male-origin and female-origin LCL.

→: 170-bp Y-chromosome specific PCR product

lane 1: DNA size marker (phi X Hae III digest)

lane 2-8: DNA extracted from LCL mixture of male-origin and female-origin at a ratio of lane2; 1:0, lane3; 1:1, lane4; 1:2, lane5; 1:10, lane6; 1:10², lane7; 1:10³, lane8; 1:10⁴, was used as a PCR template.

2. FISH 法による染色体 DNA の検出

A) 検出対象となる細胞

男性由来の血液細胞を用いて DYZ1 プローブで FISH 法を行うと、単核球、顆粒球のいずれにおいても、ハイブリダイズするシグナル 1 個が検出された(図 4)。このように FISH 法を用いれば、これまで分裂中期細胞が得られないため染色体分析は不可能で

あった顆粒球細胞等でもプローブ DNA とハイブリダイズするシグナルの存在が確認できた。ただし変性の際、核が変形するために細胞の種類を形態学的に判定することが困難な場合もあった。

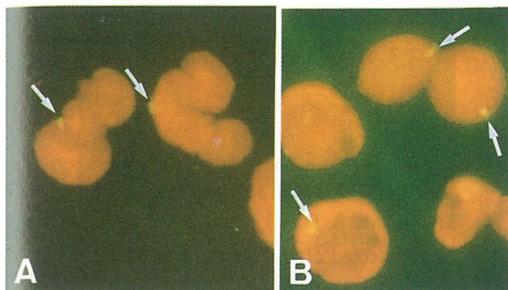


Fig. 4. A Y-chromosome was detected in each interphase nucleus from male-origin BM cells using FISH method with DYZ1 probe DNA.

A : granulocyte
 B : monocyte
 ⇨ : DYZ1-positive spot

B) BM細胞での FISH 法による染色体 DNA の検出
 BMT をうけていない男性コントロールの分裂間期 BM 細胞を用いた場合の FISH シグナルの検出率を表 1 に示した。Y 染色体は性染色体なので核内に 1 個のシグナル、8 および 17 番染色体は常染色体なのでそれぞれ 2 個のシグナルが検出されることになる。DYZ1 ではシグナル 1 個が 99.2%、D8Z1 ではシグナル 2 個が 99.5%、D17Z1 ではシグナル 2 個が 98.8% であった。DYZ1 で 2 個、D8Z1 および D17Z1 で 4 個が確認された細胞も、DYZ1 で 0.4%、D17Z1 で 0.6% 確認された、これは分裂準備期(G₂期)細胞を示しているものと考えられる。またシグナルが検出されない細胞は、DYZ1 で 0.4%、D8Z1 で 0.5%、D17Z1 で 0.2% であった。

以上のように今回の方法では、FISH シグナルの検出率は 99% 以上と高く、どのプローブを用いても同様の結果が得られたため見逃しが少なく、キメリズム頻度の正確な判定に有用と考えられた。また、検体採取から 8 時間～1 日で比較的迅速に結果が得られ、1 枚のスライド標本から 1000 個以上の細胞がカウントできることが多く、1000 個カウントするのに要する時間も、10～30 分と短い。このため臨床検体にも迅速に適応できることも解ったため、BMT 症例の検討に用いることができると考えられた。

Table 1. Detection rate of number of chromosomal signals by FISH method.

No. of signals	DYZ1	D8Z1	D17Z1
0	0.4%	0.5%	0.2%
1	99.2	0	0.4
2	0.4	99.5	98.8
3	0	0	0
4	0	0	0.6

1000 BM cells obtained from a male control subject were examined. The centromeric probes, DYZ1, D8Z1 and D17Z1, were used to detect the number of chromosomes in interphase nuclei of BM cells.

3. 症例の検討

A) 症例 1 (31 歳 男性) 急性非リンパ性白血病

1992 年 3 月、非照射レジメで女性のドナーから BMT をうけ、現在まで 1 年 6 カ月経過している。BMT 後 1 日で白血球数 700/cmm となったため、granulocyte colony stimulating factor (GCSF) が 2 日間投与された。BMT 後 3 日目の染色体検査では 100% がドナー由来とされた(表 2) が、経時的に FISH 法を行った結果、BMT 後 3 日目ではまだレシピエント細胞が 86% 残存していた。しかし 11 日目では 5% 以下に減少し、以降も 3% 以下を保ち生着が確認された。

Table 2. Cytogenetical and molecular genetical analyses of BM cells after BMT.

Case 1 (31 year-old male): acute non-lymphocytic leukemia

Date of sampling	FISH *%	PCR Y-specific DNA	chromosome **%
1992/ 3/ 8 (2days)	8.0	+	
3/ 9 (3days)	14.0	+	100
3/13 (7days)	83.0	+	
3/17 (11days)	97.6	+	
3/24 (18days)	97.7	+	
4/ 7 (1month)	98.8	+	100
1993/ 3/ 9 (1year)	99.2	+	

Date of BMT: 1992/3/6, () : period after BMT

* Number of Y-negative cells/total number of cells counted. More than 1000 BM cells were counted. As the donor is a female, no DYZ1 positive spots could be observed in the donor-derived cells.

** Y chromosome negative cells / 20 BM cells

B) 症例2(36歳 男性)慢性骨髄性白血病

1986年6月, 女性のドナーからBMTを受け, 現在まで7年経過している. BMT後3年の1989年6月, 慢性骨髄性白血病に特異な bcr-abl mRNA²⁴⁾²⁵⁾は陽性, BMT後5年の1991年6月, 6年の1992年3月には陰性となっている(表3). BMT後5年の1991年以後, PCR法による Y α サテライト DNA の検出は骨髄細胞において常に陽性である. 染色体分析は1990年まで, 46, XX で, 5年経過後の1991年6月46, XY が33個中3個観察されているが, 6年経過後の1992年3月の20個の分析では46, XX が100%であった. BMT後5年からFISH法による生着率の検討を行った結果, 常に98%以上と高い生着率が得られた.

この症例では, 染色体分析では100%ドナー由来細胞とされたが, FISH法では0.6~1.5%の低頻度のレシピエントの細胞の残存を検出した. 経過に示したように, レシピエント細胞はいったん消失したが, その後再出現していた(図5). しかし現在のところ bcr-abl mRNA は検出されず, これはCML再発とは考えられない.

Table 3. Cytogenetical and molecular genetical analyses of BM cells after BMT.

Case2 (36 year-old male):chronic myelogenous leukemia

Date of sampling	FISH *% Y-specific DNA	PCR Y-specific DNA	chromosome ***%	bcr-abl mRNA
1989/6(3years)	N.T.	N.T.	100.0	+
1991/6(5years)	98.5	+	90.9	-
1992/3(6years)	99.4	+	100.0	-

Date of BMT:1986/6/13, ():period after BMT, N. T. :not tested

* Number of Y-negative cells/total number of cells counted. More than 1000 BM cells were counted. As the donor is a female, no DYZ1 positive spots could be observed in the donor-derived cells.

*** Y chromosome negative cells / 20 BM cells

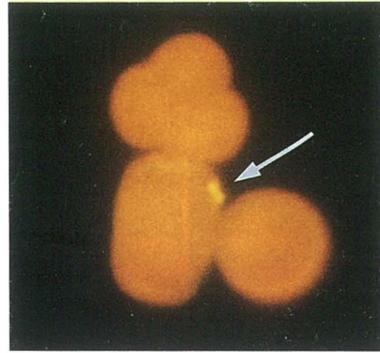


Fig. 5. In case 2, DYZ1 positive BM cells (1.5%) were detected after 5 years of BMT.
⇒: DYZ1-positive spot

C) 症例のまとめ

上記2例以外にBMT患者6例で, BMT後のFISH法を行って生着率の検討を行った(表4). いずれも生着率は87.0~99.8%と高く, 正確な生着率を確認できた.

以上の結果から1/10³という低頻度キメリズムの検出が確実なPCR法と, 正確な生着率の判定が可能なFISH法を併用することは, 骨髄移植の予後判定を正確にするうえで, 大変有用と考えられた.

Table 4. Surviving rate of donor cells after BMT detected by FISH method.

CASE Disease* SEX(R/D)**	3	4	5	6	7	8
	SAA F/M	SAA M/F	ANL M/F	ALL F/M	CML F/M	Mf M/F
Time after BMT	*** %					
1month	7.0					
2months	89.7		83.0			
4months	97.0					
6months				94.7		95.0
1year				99.8		87.0
2years						88.7
3years						97.4

* SAA:aplastic anemia, ANL:acute non-lymphocytic leukemia, ALL:acute lymphocytic leukemia, CML:chronic myelogenous leukemia, Mf:myelofibrosis

** Recipient/Donor

*** Number of donor-origin cells / total number of BM cells counted. More than 1000 BM cells were observed.

要 約

1. PCR 法

A) PCR 法の感度

男性・女性由来細胞を混合した場合 $1/10^3$ という低頻度で $Y\alpha$ サテライト DNA が検出された。

限界希釈法により 1 細胞から $Y\alpha$ サテライト DNA が検出された。このように検出率が高いことは、低頻度のキメリズムを見逃さないが、population の変化を観察するには適さなかった。

B) PCR 法の迅速性

PCR 法を用いた $Y\alpha$ サテライト DNA の検出は検体採取後 3 時間と迅速であった。

2. FISH 法

A) FISH 法の感度

FISH シグナル検出率は 99% 以上と高く、どのプローブを用いても同様の結果が得られた。

B) FISH 法の迅速性

FISH 法のシグナル検出は検体採取から 8 時間～1 日と比較的迅速に結果が得られた。

C) FISH 法の検出対象となる細胞

細胞の種類にかかわらず有核細胞であればシグナルが検出できたため、従来は検討が不可能であった分裂間期細胞を対象とすることができた。

D) FISH 法を用いた場合のキメリズムの定量性

FISH 法を用いると異性間骨髄移植において生着の確認、移植後のキメリズムの解析が定量的に行えた。

3. PCR 法での $1/10^3$ という低頻度キメリズムの検出と FISH 法を用いた定量的キメリズムの判定は骨髄移植の正確な予後判定のため大変有用であった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導頂きました、兵庫医科大学 遺伝学教室 古山順一教授、橋本知子講師、第 2 内科 武元良整講師に深く感謝致します。

文 献

- 1) 岡本真一郎, 浅野茂隆, 最新医学, **47**, 1129-1135 (1992).
- 2) Gluckman, E. et al., *Blood*, **79**, 269-275 (1992)
- 3) Bortin, M. M. et al., *Bone Marrow Transplant.*, **10**, 113-122 (1992)
- 4) 金丸昭久, 医学のあゆみ, **164**, 694-698 (1993)

- 5) De Witte, T. et al., *Br. J. Haematol.*, **74**, 151-155 (1990)
- 6) Appelbaum, F. R. et al., *Ann. Int. Med.*, **112**, 590-597 (1990)
- 7) 加藤俊一, 医学のあゆみ, **164**, 703-706 (1993)
- 8) Krivit, W. et al., *N. Engl. J. Med.*, **311**, 1606-1611 (1984)
- 9) Krivit, W. et al., *N. Engl. J. Med.*, **322**, 28-32 (1990)
- 10) Aubourg, P. et al., *N. Engl. J. Med.*, **322**, 1860-1866 (1990)
- 11) 岡本真一郎, 医学のあゆみ, **164**, 685-689 (1993)
- 12) Nemunaitis, J. et al., *Blood*, **76**, 245-253 (1990)
- 13) Morishima, Y. et al., *Blood*, **74**, 2252-2256 (1989)
- 14) 榊佳之, 実験医学, **8**, 1008-1011 (1990)
- 15) 加藤郁之進, 蛋白質 核酸 酵素, **35**, 2957-2976 (1990)
- 16) Takahashi, E. et al., *Hum. Genet.*, **86**, 14-16 (1990)
- 17) Hashimoto, T. et al., *Hum. Genet.*, **63**, 75-76 (1983)
- 18) 古山順一, 橋本 知子, 新生化学実験講座 18 細胞培養技術, 東京化学同人, 東京, pp. 249-254 (1990)
- 19) Witt, M., and Erickson, R. P., *Hum. Genet.*, **82**, 271-274 (1989)
- 20) Takahashi, E. et al., *Hum. Genet.*, **88**, 119-121 (1991)
- 21) 高橋永一, 実験医学別冊 細胞工学ハンドブック, 羊土社, 東京, pp. 111-116 (1992)
- 22) 中込弥男, 中掘 豊, 田村 高志, 細胞工学, **8**, 845-849 (1989)
- 23) 中込弥男, 永渕 成夫, 中掘 豊, 蛋白質 核酸 酵素, **37**, 2191-2195 (1992)
- 24) Nakamura, E. et al., *Br. J. Haematol.*, **78**, 130-132 (1991)
- 25) Miyamura, K. et al., *Blood*, **79**, 1366-1370 (1992)