

TWO-DAY LEUKOCYTE CULTURES FOR HUMAN
CHROMOSOME STUDIES

ヒト染色体研究のための白血球2日間培養法

ARTHUR D. BLOOM, M.D.

SHOZO IIDA 飯田昭三



TECHNICAL REPORT SERIES

業 績 報 告 書 集

The ABCC Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, advisory councils, and affiliated government and private organizations. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

ABCC業績報告書は、ABCCの日本人および米人専門職員、顧問、評議会、政府ならびに民間の関係諸団体の要求に応じるための日英両語による記録である。業績報告書集は決して通例の誌上発表に代るものではない。

TWO-DAY LEUKOCYTE CULTURES FOR HUMAN CHROMOSOME STUDIES

ヒト染色体研究のための白血球2日間培養法

ARTHUR D. BLOOM, M.D.,†

SHOZO IIDA 飯田昭三

Approved 承認 · 30 March 1967

Department of Clinical Laboratories
臨床検査部



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION
HIROSHIMA AND NAGASAKI, JAPAN

A Cooperative Research Agency of
U.S.A. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - NATIONAL RESEARCH COUNCIL
and
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE

with funds provided by
U.S.A. ATOMIC ENERGY COMMISSION
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
U.S.A. PUBLIC HEALTH SERVICE

原 爆 傷 害 調 査 委 員 会

広島および長崎

米 国 学 士 院 - 学 術 会 議 と 厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所
と の 日 米 共 同 調 査 研 究 機 関

米国原子力委員会、厚生省国立予防衛生研究所および米国公衆衛生局の研究費による

† Senior Surgeon, US Public Health Service, the National Center for Radiological Health, Population Studies Program, assigned to ABCC
米国公衆衛生局放射線保健センター人口調査計画部門所属医師でABCCへ派遣

TWO-DAY LEUKOCYTE CULTURES FOR HUMAN
CHROMOSOME STUDIES
二日間の白血球培養による人間染色体研究

ARTICLE IN PRESS
JINRUI IDENGAKU ZASSHI
1967, 12, 38-42

Journal of Human Genetics
1967, 12, 38-42

A paper based on this report was published in the following journal
本報告に基づく論文は下記の雑誌に発表した

JINRUI IDENGAKU ZASSHI
1967, 12, 38-42

Journal of Human Genetics

Jinrui Idengaku Zasshi - Jap J Hum Genet 12:38-42, 1967

Journal of Human Genetics
1967, 12, 38-42

JINRUI IDENGAKU ZASSHI
1967, 12, 38-42

JINRUI IDENGAKU ZASSHI - JAP J HUM GENET 12:38-42, 1967

JINRUI IDENGAKU ZASSHI

JINRUI IDENGAKU ZASSHI - JAP J HUM GENET 12:38-42, 1967

JINRUI IDENGAKU ZASSHI - JAP J HUM GENET 12:38-42, 1967
JINRUI IDENGAKU ZASSHI - JAP J HUM GENET 12:38-42, 1967

CONTENTS

目次

Introduction	緒言	1
Methods and Materials	方法と材料	1
Results	結果	2
Discussion	考察	3
Summary	要約	5
References	参考文献	5

TABLES	1. Effect of different doses of Wellcome phytohemagglutinin in 2-day cultures	
表	2日間培養における Wellcome 製ファイトヘマグルチニンの量の影響	3
	2. Average percent distribution of cells by type in 25 2-day and 25 3-day leukocyte cultures	
	2日間培養25本, 3日間培養25本における細胞の種類別平均百分率分布	3

FIGURE	1. High power ($\times 400$) microscopic view of a field from a 2-day leukocyte culture preparation	
図	白血球の2日間培養標本の高倍率(400 \times)顕微鏡像	4

TWO-DAY LEUKOCYTE CULTURES FOR HUMAN CHROMOSOME STUDIES

ヒト染色体研究のための白血球2日間培養法

INTRODUCTION

To determine the chromosome complement of an individual in whom cell lines are stable, the 3-day peripheral leukocyte culture technique of Moorehead et al,¹ with some modifications, is generally used. This method provides many mitoses at 60-72 hours of culture, but it is a mixed culture, with both first and second division products being present.² It is theoretically possible that genetically unbalanced cells, with significant chromosomal rearrangements, of whatever origin, may not survive cell division, and may, by 3 days of culture, have been eliminated. This applies equally to the individual abnormal chromosomes or fragments of chromosomal material, as well as to the cells in which they are found.

As first suggested by Buckton and Pike,³ it seems desirable to examine cells which may contain complex, unbalanced aberrations in their first in vitro division, to approximate the in vivo situation as closely as possible. This is especially true for studies in aneuploid leukemic cell lines, for cells in which virus infection or drug exposure may have occurred, as well as for irradiated cells.

In the studies of A-bomb survivors, the authors have until recently utilized the 3-day culture.⁴ In order to reduce the likelihood of loss of abnormal cells and aberrations in culture, a 46-48 hour culture time is now being used. This report describes the approach to the establishment of the technique of 2-day leukocyte culture.

METHODS AND MATERIALS

Two methods were used in the preparation of leukocytes for culture. The first consisted of the addition of 0.2 ml of Difco Phytohemagglutinin (PHA) M to 10 ml of heparinized venous blood. This mixture was allowed to stand for 45 minutes at 3-4°C. The leukocytes were separated in a plasma suspension by centrifugation of the whole blood at 500rpm for 1 minute. From $6.0-8.0 \times 10^6$ leukocytes were then inoculated into 8 ml of Tissue Culture Medium 199 of Difco. A volume of fetal bovine serum equal to that of the cell suspension served as a supplementary protein

緒言

安定した細胞集団を有する個体の染色体構成を決定するためには、通常、Moorehead ら¹の末梢白血球3日間培養法に若干の修正を加えた方法が使用されている。この方法によれば、60-72時間培養後に多数の細胞分裂が得られる。しかし、これは、第1回目および第2回目の分裂細胞が混在しているものである。² 理論的には、有意な染色体再配列をもっていて、遺伝的に非平衡状態にある細胞は、それがいかなる起源のものであっても、細胞分裂の途中で死滅し、培養3日目までに消失する可能性がある。異常を有する細胞だけでなく、個々の異常染色体や染色体断片についても同じことがいえる。

Buckton および Pike³ が初めて指摘したように、生体内での状態をできるだけ忠実に再現するためには、複雑で非平衡的な染色体異常を有すると思われる細胞を検討する上で、培養による第1回目の分裂像を検査するのが望ましいと思われる。これは、特に、異数性の白血病細胞系統の研究、ウィルス感染または薬品処理を受けた可能性のある細胞、および放射線照射を受けた細胞についていえることである。

著者らの被爆者研究では、最近まで3日間培養法を使用していた。⁴ 培養中に異常細胞と染色体異常が消失する可能性をより少なくするために、現在では、46-48時間で固定を行なうようにしている。この報告書では、白血球の2日間培養法の確立のための試みについて述べる。

方法と材料

培養のための白血球の準備は2つの方法で行なわれた。第1の方法では、ヘパリン添加静脈血液10 ml に Difco 製ファイトヘマグルチニン (PHA) M 0.2 ml を加えた。この混合液を3-4°Cで45分間放置後、全血を1分間500 rpm で遠心して、白血球の血漿懸濁液を分離した。次に、白血球 $6.0-8.0 \times 10^6$ を培養液 (Medium 199; Difco 製) 8 ml に加えた。これに蛋白質供給の目的で細胞懸濁液と同量のウシ胎児血清を加えた。次に、Difco 製

source. Two drops (0.04 cc) of Difco Phytohemagglutinin P were then added to the final culture. Cultures were incubated at 37°C for 66-70 hours prior to the addition of colchicine.

The second method differed from the first with regard to the Phytohemagglutinin and the incubation time. With this technique 0.1 ml of Burroughs Wellcome Phytohemagglutinin was added to the whole blood, and an additional 0.1 ml of this Phytohemagglutinin was added to the final culture. These cultures were incubated for 44-48 hours, at which point colchicine was added, and the cells harvested.

For both methods, cells were treated and were fixed in a 3:1 methanol:glacial acetic acid mixture. Slides were prepared by the air dry method, and stained with Giemsa.

A differential cell count was done on 1000 cells from each culture. Cells were classified as: "small" lymphocytes, "transformed" lymphocytes, or as cells in active division. "Small" lymphocytes were essentially the same as the small lymphocytes of uncultured peripheral blood: 8-10 μ in diameter, with a dark staining nucleus, and only a rim of cytoplasm visible. "Transformed" lymphocytes were generally large mononuclear cells of variable size, with considerable pale cytoplasm surrounding the centrally-located nucleus. Actively dividing cells were in an identifiable stage of mitosis. Occasionally, degenerated granulocytes were seen, but these were rare after 24 hours of culture.

In addition to the 2-day Wellcome PHA-stimulated cultures and the 3-day Difco PHA-stimulated cultures, 24-, 48-, and 72-hour cultures with each PHA were also examined for evidence of cellular transformation and mitotic activity.

RESULTS

With Difco PHA, as used in this laboratory, the mitotic index (defined as the number of cells in division per 1000 cells examined) of ten 24-hour cultures was essentially zero. By 48 hours, 10-15 mitoses per 1000 cells were seen, but the majority of cells (an average of 61.2% in 10 cultures) were still small, well-differentiated lymphocytes. The remaining cells were transformed, i.e., had undergone de-differentiation, presumably a step preceding active mitosis. By 72 hours, the mitotic index, as determined in 25 Difco PHA-stimulated cultures, ranged from 40-60, with an average of 73% of the cells being transformed, and 22% remaining as small lymphocytes.

ファイトヘマグルチニン P 液 2 滴 (0.04 cc) を最終培養液に加えた。コルヒチンを加えるまでの間、37°C で 66-70 時間恒温保存を行なった。

第 2 の方法において、第 1 の方法と異なる点は、ファイトヘマグルチニンと培養時間であった。この方法では、Burroughs Wellcome 製ファイトヘマグルチニン 0.1 ml を全血に加え、さらにこのファイトヘマグルチニン 0.1 ml を最終培養液にも追加した。培養は 44-48 時間行なってから、コルヒチンを加えて、細胞を採取した。

2 つの方法ともに細胞を 3:1 のメタノール、氷酸塩混合液で固定した。顕微鏡標本は空気乾燥法に従って作成し、Giemsa 染色を行なった。

各培養から細胞 1000 個について分類を行なった。細胞は、"小"リンパ球、"変態"リンパ球あるいは分裂中の細胞に分類した。"小"リンパ球は、非培養の末梢血液中の小リンパ球と本質的に同じで、直径 7-8 ミクロンで、核は濃染し、その周囲にほんのわずかな細胞質が認められる。"変態"リンパ球は、一般に、大きな単核細胞で、その大きさは多様であり、中央の核は色のうすいかなりの量の細胞質に囲まれている。分裂中の細胞は、分裂のいずれの時期にあるか明らかであった。時々、退行した顆粒球もみられたが、培養 24 時間後には、まれであった。

Wellcome 製 PHA による 2 日間培養と Difco 製 PHA による 3 日間培養のほかに、それぞれの PHA を使用して、24、48 および 72 時間培養も行なって細胞の変態と細胞分裂活動を調査した。

結 果

本研究室で使用した結果によれば、Difco 製 PHA では、24 時間培養 10 本における有糸分裂係数 (観察細胞 1000 個あたりの分裂細胞数) は本質的にゼロであった。48 時間培養後には、細胞 1000 個につき 10-15 個の有糸分裂がみられたが、ほとんどの細胞 (10 本の培養における平均 61.2%) は、小型のよく分化したリンパ球であった。残りの細胞は変態していた。すなわち、有糸分裂の前段階と考えられる脱分化を呈していた。72 時間培養後には、Difco 製 PHA 刺激による培養 25 本における有糸分裂係数は、40-60 の範囲で、平均して細胞の 73% が変態し、22% は小リンパ球として残っていた。

TABLE 1 EFFECT OF DIFFERENT DOSES OF WELLCOME PHYTOHEMAGGLUTININ
IN 2-DAY CULTURES

表1 2日間培養における Wellcome 製ファイトヘマグルチニンの量の影響

Dose* 量	Distribution 分布 %		
	Lymphocytes リンパ球		Mitoses 有糸分裂
	Small 小	Transformed 変態	
0.01 cc	78.7	20.8	0.3
0.02	59.7	39.7	0.7
0.03	36.7	62.9	0.4
0.05	33.1	58.0	0.9
0.10	28.6	68.9	2.5
0.15	No Growth — cells clumped		
0.20	増殖なし — 細胞は凝集		

* Dose represents volume of Wellcome PHA added to whole blood, and again to the final culture.
量は、全血および最終培養液にそれぞれ追加した Wellcome 製 PHA の量を表わす。

TABLE 2 AVERAGE PERCENT DISTRIBUTION OF CELLS BY TYPE
IN 25 2-DAY AND 25 3-DAY LEUKOCYTE CULTURES

表2 2日間培養25本、3日間培養25本における細胞の種類別
平均百分率分布

Culture Time 培養時間	Distribution 分布 %		
	Lymphocytes リンパ球		Mitoses 有糸分裂
	Small 小	Transformed 変態	
48 hours (Wellcome PHA)			
48時間 (Wellcome 製 PHA)	23.5	68.3	8.2
72 hours (Difco PHA)			
72時間(Difco 製 PHA)	21.7	72.5	5.8

First experiments here with Wellcome PHA involved establishment of an optimal dose for the 2-day culture. Table 1 gives the results of studies on seven cultures, at different doses of Wellcome PHA, from blood sampled from a normal volunteer. The same dose was added to the whole blood, and again to the culture prior to incubation.

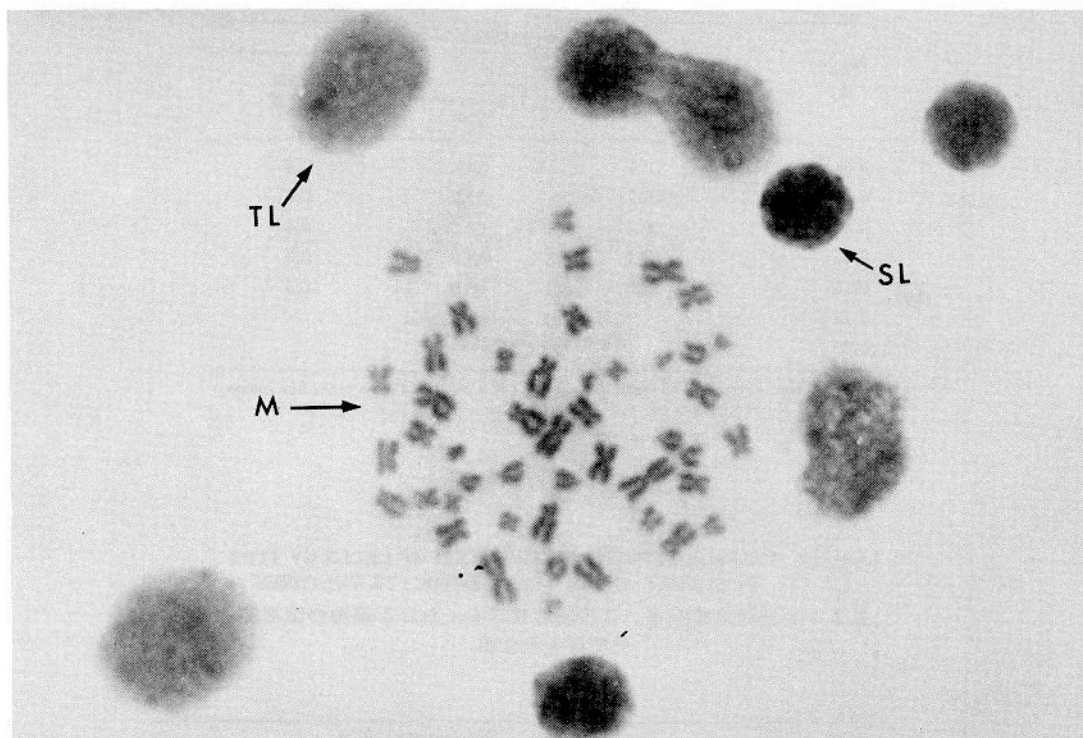
On the basis of this experiment, and similar ones, the 0.1 ml dose appeared to be optimal. The results of 25 such 2-day cultures are presented in Table 2, and are compared with 25 3-day Difco PHA-treated cultures, in terms of the percentages of small lymphocytes, transformed cells, and actively dividing cells. Figure 1 gives an illustration of a typical microscopic field from a 2-day culture.

Wellcome 製 PHA について著者らの行なった第1の実験は、2日間培養のための最適量の決定であった。表1には、1人の患者から採取した血液に、異なる量の Wellcome 製 PHA を加えた培養7本の結果を示した。全血および培養に先立って培養液にそれぞれ同量の PHA を加えた。

この実験およびその他の同様の実験の結果、投与量は、0.1 ml が最適と思われた。表2は、2日間培養25本の結果であり、小リンパ球、変態細胞および分裂中の細胞の百分率に関して、Difco 製 PHA 処理3日間培養25本と比較した。図1に2日間培養の典型的な顕微鏡像を示す。

FIGURE 1 HIGH POWER ($\times 400$) MICROSCOPIC VIEW OF A FIELD FROM A 2-DAY
LEUKOCYTE CULTURE PREPARATION

図1 白血球の2日間培養標本の高倍率(400 \times)顕微鏡像



SL = Small Lymphocyte TL = Transformed Lymphocyte M = Metaphase
小リンパ球 変態リンパ球 有糸分裂中期

DISCUSSION

The major potential advantage in using the 2-day culture system in the cytogenetic examination of cells from patients with genetically unbalanced and mitotically unstable abnormalities* is that of maximizing the yield of aberrations which exist in the soma. In their studies of therapeutically irradiated persons, Buckton and Pike³ found a significantly greater percentage of unstable aberrations in 44-48 hour cultures than in 68-72 hour cultures. Ishihara and Kumatori⁵ similarly found a decrease in unstable abnormalities with increased time in culture in the leukocytes of Thorotrast-injected patients. In their studies on the Bikini fishermen exposed to fallout, however, they found no such trend.⁶ In general, there is no disadvantage to the 2-day system, and it gives, potentially at least, a more accurate estimate of the in vivo picture.

考 察

遺伝的に非平衡状態にあり、かつ有糸分裂上不安定な異常*をもつ可能性のある患者の細胞に対する細胞遺伝学的検査に、2日間培養法を使用することの最も大きな潜在的な利点は、体内に存在する異常を最大限に発見できるということである。治療用放射線照射を受けた人に関する研究で、Buckton および Pike³ は、68-72時間培養よりも44-48時間培養に不安定型異常がかなり多くみられることを認めた。石原と熊取⁵も、同様に、トロトラスト注射例の白血球培養において、時間が増すと不安定な異常が減るということを認めた。しかしながら、ビキニで降下物に被曝した漁師における調査では、このような傾向はみられなかった。⁶ 一般に、2日間培養に不利な点はなく、少なくとも生体内の状態について、より正確な推定ができるのではないかとと思われる。

* The unstable aberrations referred to here are the Cu cells of Buckton et al,⁸ and include dicentrics, tricentrics, rings, and acentric fragments. ここでいう不安定な異常とは、Buckton ら⁸の報告したCu細胞で、2動原体性、3動原体性、環状染色体およびacentric断片を含む。

From our results, it is clear that with this technique, lymphocytes are able to transform and divide more rapidly than they do in most 72-hour cultures.⁷ The rapid increase in both transformed cells and in dividing cells by 46-48 hours of culture illustrates that the 2-day method is technically feasible. With Wellcome PHA, at the doses given, the numbers of metaphases, even accounting for some variation from individual to individual, are adequate for examination of 100-200, or more, cells per patient.

SUMMARY

The desirability of doing 2-day, as opposed to 3-day, cultures of human peripheral leukocytes in individuals with potentially unbalanced rearrangements is clear. This report gives results of experiments with Wellcome Phytohemagglutinin, at a dose of 0.1 ml into the whole blood, and an additional 0.1 ml directly into the culture. Adequate numbers of metaphases can readily be obtained with the method outlined.

著者らの調査の結果から、この方法を用いると、多くの72時間培養法よりはリンパ球の変態および分裂が速く生ずるということが明らかである。⁷ 培養46-48時間で、変態細胞および分裂中の細胞の急速な増加があることは、2日間培養法の使用が技術的に妥当であることを示している。Wellcome 製 PHA については、ここに示した投与量を使うと、分裂中期の細胞数は、たとえ個人差を考慮に入れても、1人につき100-200個またはそれ以上の細胞を検査するのに十分である。

要 約

非平衡状態の染色体再配列を有する可能性のある人の末梢白血球について、3日間培養よりは2日間培養法を採用することが望ましいことは明らかである。この報告書では、Wellcome 製ファイトヘマグルチニン 0.1 ml を全血に加え、さらに0.1 ml を直接培養液の中に追加して行なった実験の結果を示す。本報告による方法に基づき、適当数の分裂中期細胞が容易に得られる。

REFERENCES

参考文献

1. MOOREHEAD PS, NOWELL PO, et al: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:613-6, 1960
(人間の末梢血液から培養した白血球の染色体標本)
2. BENDER MA, PRESCOTT DM: DNA synthesis and mitosis in cultures of human peripheral leukocytes. *Exp Cell Res* 27:221-9, 1962
(人間の末梢白血球培養におけるDNA合成と有糸分裂)
3. BUCKTON KE, PIKE MC: Time in culture: An important variable in studying in vivo radiation-induced chromosome damage in man. *Int J Rad Biol* 8:439-52, 1964
(培養における時間: 生体内の放射線誘発性染色体障害の研究における重要な変数)
4. BLOOM AD, NERIISHI S, et al: Cytogenetic investigation of survivors of the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki. *Lancet* 2:672-674, 1966
(広島および長崎の被爆者における細胞遺伝学的研究)
5. 石原隆昭, 熊取敏之: 白血球染色体に及ぼす電離放射線の影響. *日本血液学会雑誌* 28: 291-307, 1965年
(ISHIHARA T, KUMATORI T: Chromosome aberrations in human leukocytes irradiated in vivo and in vitro. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi—Acta Haemat Jap*)
6. ISHIHARA T, KUMATORI T: Chromosome studies on Japanese exposed to radiation resulting from nuclear bomb explosion. In *Human Radiation Cytogenetics*. Amsterdam, North Holland, 1967. In press
(原爆放射線照射を受けた日本人の染色体研究)
7. BLOOM AD, WAJIMA T, TSUCHIOKA M: Lactic dehydrogenase and the in vitro metabolism of human leukocytes. *Science*, In press
(ヒト白血球の乳酸脱水素酵素と試験管内代謝)
8. BUCKTON KE, JACOBS PA, et al: A study of the chromosome damage persisting after X-ray therapy for ankylosing spondylitis. *Lancet* 2:676-82, 1962
(強直性脊椎炎のレントゲン治療後に持続する染色体障害の研究)