

AUTORADIOGRAPHIC & FLUORESCENT STAINING STUDIES OF  
BONE MARROW CHROMOSOMES FROM A PATIENT WITH  
ACUTE GRANULOCYTIC LEUKEMIA

急性骨髄性白血病 1 例における骨髄染色体のオートラジオグラフ法  
および蛍光染色法による研究

TOSHIO SOFUNI, Sc.D. 祖父尼俊雄

HIROMU OKADA, M.D. 岡田 弘



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION

国立予防衛生研究所 - 原爆傷害調査委員会

JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE

## 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 groups, 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の日米専門職員、顧問、諮問機関ならびに政府および民間の関係諸団体の要求に応ずるための日英両語による公式報告記録であって、業績報告書集は決して通例の誌上発表論文に代わるものではない。

AUTORADIOGRAPHIC & FLUORESCENT STAINING STUDIES OF  
BONE MARROW CHROMOSOMES FROM A PATIENT WITH  
ACUTE GRANULOCYTTIC LEUKEMIA

急性骨髄性白血病 1 例における骨髄染色体のオートラジオグラフ法  
および蛍光染色法による研究

TOSHIO SOFUNI, Sc.D. 祖父尼俊雄

HIROMU OKADA, M.D. 岡田 弘



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

AUTORADIOGRAPHIC & FLUORESCENT STAINING STUDIES OF BONE MARROW CHROMOSOMES FROM A PATIENT WITH ACUTE GRANULOCYTIC LEUKEMIA

急性骨髄性白血病の骨髄染色体の放射線感光顕微鏡による研究

TOSHIO SOFUNI, S.D. 新井 俊夫  
HIROMI OKADA, M.D. 岡田 弘見

ACKNOWLEDGMENT

感謝のことば

We thank Dr. Howard B. Hamilton, Department of Clinical Laboratories, ABCC and Dr. Arthur D. Bloom, Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School for their advice and improvement of this report; and Mr. M. Hiramoto for his technical assistance.

助言および本報告書の改善に対して指導をいただいた ABCC 臨床検査部の Dr. Howard B. Hamilton および Michigan 大学医学部人類遺伝学教室の Dr. Arthur D. Bloom ならびに技術的援助をいただいた平本昌史氏に深く感謝する。

A paper based on this report was accepted for publication by *Cancer*.

本報告に基づく論文は *Cancer* に受理された。

## CONTENTS

### 目 次

Summary	要 約 .....	1
Introduction	緒 言 .....	1
Case Report	症例報告 .....	2
Cytogenetic Findings	細胞遺伝学的所見 .....	2
Discussion	考 察 .....	8
References	参考文献 .....	10

Table 表	1. Hematological data on blood and bone marrow samples from a patient with acute granulocytic leukemia 急性骨髄性白血病 1 例における血液および骨髄の血液学的検査成績 .....	3
	2. Chromosome number distribution in cells from bone marrow and peripheral blood of a patient with acute granulocytic leukemia 急性骨髄性白血病 1 例における骨髄および末梢血液細胞の染色体数分布 .....	3

Figure 図	1. Frequency of the additional and missing chromosomes in leukemic cells of bone marrow from a patient with acute granulocytic leukemia 急性骨髄性白血病 1 例における骨髄の白血病細胞にみられた染色体の過剰および欠如の頻度 .....	5
	2. Karyotype of a leukemic cell containing 43 chromosomes from the first bone marrow sample 1 回目の骨髄標本における染色体数43の白血病細胞の核型 .....	5
	3. Frequency of cells incorporating tritiated thymidine in cells cultured from the second bone marrow sample 2 回目の骨髄標本の培養における tritiated thymidine 標識細胞の頻度 .....	7
	4. Metaphases of a leukemic cell containing 46 chromosomes from a 24-hour culture of the second bone marrow sample 2 回目の骨髄標本の24時間培養から得た染色体数46の白血病細胞の分裂中期像 .....	7

Approved 承認 13 September 1973

AUTORADIOGRAPHIC & FLUORESCENT STAINING STUDIES OF BONE MARROW  
CHROMOSOMES FROM A PATIENT WITH ACUTE GRANULOCYTTIC LEUKEMIA急性骨髄性白血病 1 例における骨髄染色体のオートラジオグラフ法  
および蛍光染色法による研究TOSHIO SOFUNI, Sc.D. (祖父尼俊雄)<sup>1\*</sup>; HIROMU OKADA, M.D. (岡田 弘)<sup>2</sup>Departments of Clinical Laboratories<sup>1</sup> and Medicine<sup>2</sup>臨床検査部<sup>1</sup> および臨床部<sup>2</sup>

## SUMMARY

Results of cytogenetic studies of a patient with acute granulocytic leukemia are described. The modal number of chromosomes in cells from bone marrow samples was 43, and the karyotype was characterized by missing chromosomes in groups B, C, and E. According to successive studies of the same metaphases by fluorescent staining and autoradiographic techniques the Y chromosome in leukemic cells had a late-replicating pattern similar to that of normal male cells, but had an unusual fluorescent pattern, lacking the bright fluorescence characteristic of Y chromosomes in normal male cells.

## INTRODUCTION

Recently, fluorescent staining of human chromosomes has been developed to the point where each chromosome in the normal complement can be clearly identified, and further, various numerical and structural abnormalities from pathological conditions can be characterized.<sup>1-5</sup> Autoradiography is an established method for identification of some specific chromosomes.<sup>6</sup> The present paper describes the use of autoradiographic and fluorescent staining techniques to characterize the chromosome constitution and cytogenetic features of a patient with acute granulocytic leukemia.

## 要 約

急性骨髄性白血病 1 例の細胞遺伝学的研究の結果を報告する。骨髄細胞における染色体の最頻値は43で、その核型の特徴はB, CおよびE群染色体の欠如であった。蛍光染色法とオートラジオグラフ法で同一の中期分裂像を連続して調べたところ、白血病細胞のY染色体は正常男性細胞のYと同じ後期複製パターンを示したが、蛍光染色パターンは異常で、正常のY染色体に特徴的な強い蛍光性はみられなかった。

## 緒 言

最近、ヒト染色体の蛍光染色法の進歩によって個々の正常染色体の明確な同定が可能になるとともに、各種疾病における染色体の数的および構造的異常の決定が可能になった。<sup>1-5</sup> オートラジオグラフ法も特定の染色体の同定法として確立されている。<sup>6</sup> 本報告では、急性骨髄性白血病 1 例における染色体構成とオートラジオグラフ法および蛍光染色法を用いて得られた細胞遺伝学的特徴について述べる。

\* Hiroshima Branch Laboratory, Japanese National Institute of Health

厚生省国立予防衛生研究所広島支所

## CASE REPORT

A boy (MF 478556), aged 7, was admitted to the ABCC ward in Hiroshima on 29 June 1970 because of anemia. Physical examination showed fever and minimal right axillary lymphadenopathy. Blood studies (Table 1) revealed markedly decreased red blood cell and platelet counts. The white blood cell count was low and showed a few immature granulocytes. Bone marrow showed 29.6% myeloblasts and promyelocytes, with occasional bi- or trinucleated normoblasts and megaloblastoid cells. Despite treatment with blood transfusion and combined programs of 6-MP or Vincristine and Dexamethasone, the patient did not improve, and died on 10 October 1970. Autopsy revealed infiltration of leukemic cells in the various organs as well as subarachnoid bleeding. The final diagnosis was acute granulocytic leukemia. Detailed clinical features and the family history of the patient have been given elsewhere,<sup>7</sup> since his sister also died of acute monocytic leukemia at the age of 14.

### Cytogenetic Findings

**Chromosome Constitution:** A bone marrow sample, taken prior to therapy, was prepared directly for chromosome analysis according to the technique of Tjio and Whang (1962).<sup>8</sup> A second bone marrow sample was taken on the 36th day after the initiation of chemotherapy and blood transfusion, and cells were incubated and grown in vitro for 6 and 24 hours in absence of phytohemagglutinin (PHA) and for 72 hours in the presence of PHA. On the 22nd day after chemotherapy and blood transfusions, leukocytes from the peripheral blood of the patient were cultured for 48 hours with PHA, and chromosome slides were prepared according to the routine air-dry method.

Table 2 shows the chromosome number distribution in cells from the bone marrow and peripheral blood. The cells from the first bone marrow sample had a modal chromosome number of 43. On detailed karyotypic analysis of the bone marrow cells, abnormal karyotypic patterns deviated from normal constitution were observed. The abnormalities did not appear to be random loss or gain of certain chromosomes, but seemed to be related to certain specific groups of chromosomes (Figure 1). The following abnormalities were seen in these cells: three chromosomes were missing, one each from group B4-5, group C6-X-12, and E17 (Figure 2).

## 症例報告

患者は7歳の少年(MF 478556)で、1970年6月29日、貧血のために広島ABCCに入院した。診察では、発熱および右腋窩部に軽微なリンパ結節肥大があった。血液検査の結果(表1)、赤血球数および血小板数の著しい減少が認められ、白血球数も低値を示し、未成熟の顆粒球が少数みられた。骨髄検査では、骨髄芽球および前骨髄球が29.6%を占め、2個または3個の核を有する正赤芽球および巨大赤芽球細胞が時々認められた。輸血ならびに6-MPあるいはVincristineとDexamethasoneの併用による治療を行ったが、軽快はみられず、1970年10月10日に死亡した。剖検の結果、くも膜下出血のほかにも各臓器に白血病性細胞浸潤が認められた。最終診断は急性骨髄性白血病であった。本例の姉も急性単球性白血病のために14歳で死亡したこともあって、本患者における臨床所見および家族歴については別に詳細な報告がある。<sup>7</sup>

### 細胞遺伝学的所見

**染色体構成:** 治療開始前に骨髄標本を採取し、TjioおよびWhang(1962年)<sup>8</sup>の直接法によって染色体標本作製した。次に、化学療法と輸血を開始して36日目に第2回目の骨髄標本を採り、phytohemagglutinin(PHA)を加えないで6時間および24時間、ならびにPHAを添加して72時間、それぞれ培養した。化学療法と輸血を開始して22日目に末梢血リンパ球をPHA混在下で48時間培養し、通常の空気乾燥法によって染色体標本作製した。

骨髄および末梢血液細胞の染色体数分布を表2に示す。最初の骨髄標本における染色体数の最頻値は43であった。骨髄細胞の詳細な核型分析の結果、正常な構成とは異なる異常パターンが認められた。この異常は、染色体の無作為的な欠如または過剰のためではなく、ある特定の群における染色体と関係があるように思われた(図1)。これらの細胞にみられた異常は次のとおりである。B4-5, C6-X-12, E17の各群のそれぞれ一つ、合計三つの染色体の欠如がみられた(図2)。この異常は染色体数のモードが43である細胞26個中17個(65%)にみられた。染

TABLE 1 HEMATOLOGICAL DATA ON BLOOD AND BONE MARROW SAMPLES FROM A PATIENT WITH ACUTE GRANULOCYTIC LEUKEMIA

表1 急性骨髄性白血病1例における血液および骨髄の血液学的検査成績

Item	Blood			Item	Bone Marrow	
	Date Sampled				Date Sampled	
	6/29/70	7/20/70	8/3/70		6/29/70	8/4/70
RBC $\times 10^4$	164	246	280	DIFFERENTIAL COUNT (%)		
Hgb gm/100 ml	4.7	8.1	8.2	Blast cells	16.8	18.0
Platelet $\times 10^3$	50.0	30.0	60.0	Promyelocytes	12.8	2.8
WBC	3,250	2,750	4,550	N-Myelocytes	10.0	8.0
-----				N-Metamyelocytes	15.2	7.2
DIFFERENTIAL COUNT (%)				N-Stab	5.6	1.2
Blast cells	0	0	0	N-Seg.	2.0	0.4
Promyelocytes	0	1.0	0	Eosinophils	0.4	0.8
N-Myelocytes	3.0	1.5	0	Basophils	0	0
N-Metamyelocytes	2.0	0	0	Monocytes	0	0.4
N-Band	3.0	0	0.5	Lymphocytes	16.0	22.4
N-Seg.	11.0	5.0	1.0	Plasma cells	0.8	0.4
Eosinophils	0	0	0	Reticulum cells	1.2	1.2
Monocytes	4.0	1.0	0	Mitosis	0.8	0.4
Lymphocytes	77.0	90.0	97.5	Proerythroblasts	1.2	0.4
Immature lymph.	0	1.0	0.5	Erythroblasts		
Plasmacytes	0	0.5	0.5	Baso.	0.8	4.0
Nucleated red cells (per 100 WBC)	7.0	2.5	3.0	Poly.	8.0	13.6
				Ortho.	4.8	18.0
				Megaloblastoid cells	3.6	0.8

TABLE 2 CHROMOSOME NUMBER DISTRIBUTION IN CELLS FROM BONE MARROW AND PERIPHERAL BLOOD OF A PATIENT WITH ACUTE GRANULOCYTIC LEUKEMIA

表2 急性骨髄性白血病1例における骨髄および末梢血液細胞の染色体数分布

Date Sampled	Sample	Culture Time (hours)	PHA	Chromosome Number										Total
				41	42	43	44	45	46	47	4n	6n		
6/29/70	Bone marrow	0	-	1	6	26	1	3	2*	0	1	0	40	
7/21/70	Peripheral blood	48	+	0	0	0	0	0	20	0	0	0	20	
8/04/70	Bone marrow	6	-	2	7	12	2	6	0	0	2	2	33	
		24	-	2	4	6	5	8	2*	2	1	0	30	
		72	+	0	1	0	0	0	25	0	0	0	26	

\*Pseudodiploid



This abnormal constitution was found in 17 (65%) of 26 cells with a modal number of 43. Two cells having 46 chromosomes appeared to have abnormal chromosome constitutions, being pseudodiploid.

In the second bone marrow sample, the cells cultured in presence of PHA had a normal diploid complement, while the cells cultured in absence of PHA had a hypodiploid chromosome number. In the 6-hour culture without PHA, although the modal chromosome number was also 43, the range of numerical variation of chromosomes was slightly wider than that of the first bone marrow specimen (Table 2). Here only 12 of 33 cells had 43 chromosomes, compared with 26 of 40 cells in the first bone marrow specimen. This variability was more marked in the 24-hour culture without PHA, and a modal chromosome number was not evident. The same karyotypical characteristics seen in the first sample were also apparent in the second sample (Figure 1). Moreover, an additional element in group G21-22 was more frequent in the second sample, and this tendency was even more marked in the 24-hour culture than in the 6-hour culture (Figure 1). As in similar cases reported by others,<sup>9</sup> abnormal chromosomes, or so-called marker chromosomes, were found less frequently in the present case than in cells from solid cancers or their effusions. The above findings indicate that the cells growing in the bone marrow cultures without PHA, as well as the cells from the direct bone marrow preparation, seemed to be leukemic cells because all the cells had abnormal chromosome constituents, whereas the cells cultured with PHA might be derived from nonleukemic cells, since the cells selectively responsive to PHA and having a normal chromosome pattern were believed to be of nonleukemia origin. Indirect evidence for the above assumption was obtained from the peripheral blood culture with PHA in which 25 of 26 cells analysed had a normal chromosome constitution, regardless of these cells deriving from the host or the donors of transfusion.

**Autoradiographic Study.** Autoradiographic studies were carried out on bone marrow cells incubated for 6-, 24- and 72-hours. These cells were obtained on 4 August 1970.  $1 \mu\text{c}/\text{ml}$  of tritiated thymidine (specific activity  $5 \text{ c}/\text{mM}$ , the Radiochemical Center, Amersham, England) was added to the culture for 6 hours before fixation. The culture was treated with colchicine (final concentration  $20 \gamma/\text{ml}$ ) during the last 2 hours of incubation. Slides were prepared according to the air-dry method, and then stained with carbol fuchsin.<sup>10</sup> Autoradiography was performed with Sakura NRM-2 emulsion (Konishiroku

染色体数46の細胞2個にも染色体構成の異常があり、偽2倍性構成を示した。

2回目の骨髄標本において、PHA存在下で培養した細胞は正常な2倍性構成であったのに対して、PHAを加えないで培養した細胞の染色体数は低2倍性を示した。PHAを添加しなかった6時間培養では、染色体数のモードが同じく43であったとはいえ、最初の骨髄標本に比べて染色体数の変異幅がやや著しい(表2)。染色体数43の細胞が最初の骨髄標本に40個中26個あったのに対し、この場合は細胞33個中12個あるにすぎない。PHAを添加しない24時間培養では、変異幅は一層顕著であり、染色体数のモードは明らかでない。最初の標本と同様の核型上の特徴が2回目の標本にもみられた(図1)。そのうえ、2回目の標本では、G21-22群に過剰の染色体が認められることがより多く、この傾向は6時間培養よりも24時間培養において著しい(図1)。その他の同様な症例の報告にもみられる如く、<sup>9</sup> 本例でも異常染色体、いわゆる指標染色体の出現は、孤立性癌やその浸出液における細胞の場合に比べて低率であった。以上の所見から次のことが考えられる。PHAを加えなかった骨髄培養における細胞および直接法で作製した骨髄標本における細胞はすべて染色体構成が異常であったことから、白血病細胞と推定されるのに対して、PHA混在下で増殖した細胞は非白血病細胞に由来するものと思われる。すなわち、PHAに選択的に反応し、しかも正常な染色体像を示す細胞は、非白血病細胞を起源とすると考えられる。この推測の間接的証拠所見として、PHAを添加した末梢血培養では、細胞が受血者または供血者に由来するものであるか否かに関係なく、分析の行われた細胞26個中25個は染色体構成が正常であることが挙げられる。

**オートラジオグラフィ法検査。** 6時間、24時間および72時間培養した骨髄細胞を用いてオートラジオグラフィ法検査を行った。細胞は1970年8月4日に入手したものであった。固定の6時間前に培養に $1 \mu\text{c}/\text{ml}$ のtritiated thymidine(比放射能 $5 \text{ c}/\text{mM}$ , 英国 Amersham 市 Radiochemical Center 社製)を加えた。培養の最後の2時間に colchicine 処理を行った(最終濃度 $20 \gamma/\text{ml}$ )。標本は空気乾燥法で作製して石炭酸フクシンで染色した。<sup>10</sup> オートラジオグラフィ法は、さくら NRM-2 乳剤(小西六写真工業社製)

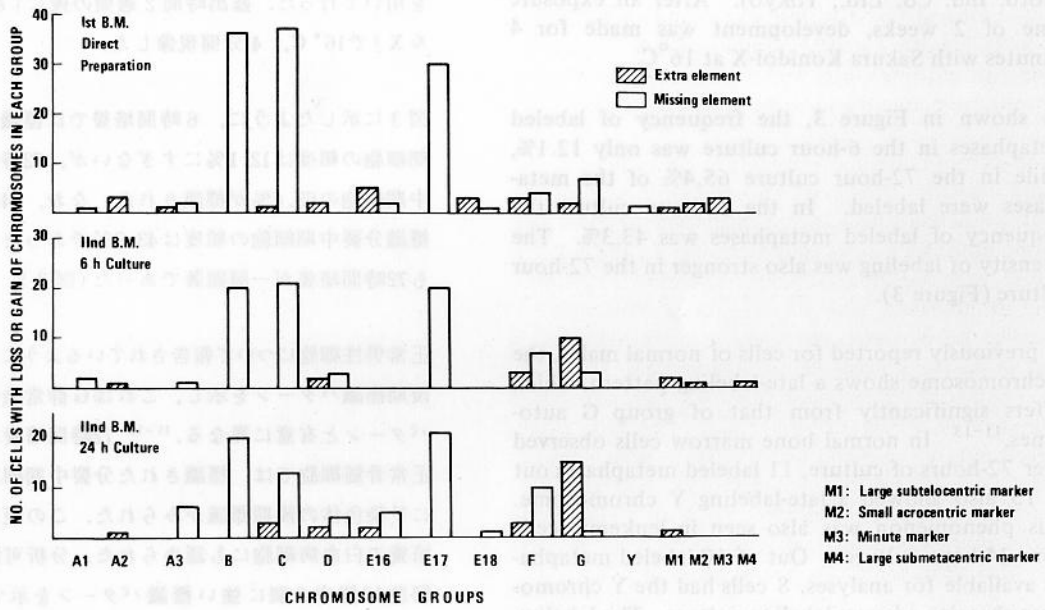


FIGURE 1. Frequency of the additional & missing chromosomes in leukemic cells of bone marrow from a patient with acute granulocytic leukemia.

図1 急性骨髄性白血病1例における骨髄の白血病細胞にみられた染色体の過剰および欠如の頻度

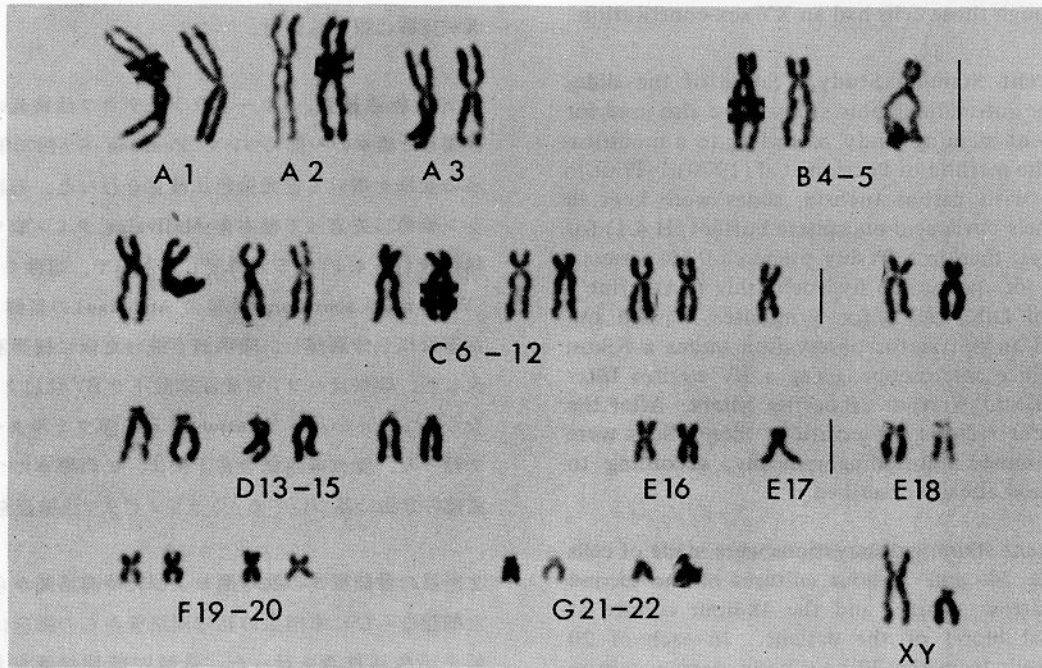


FIGURE 2. Karyotype of a leukemic cell containing 43 chromosomes from the first bone marrow sample. Three chromosomes are missing, one each from group B4-5, group C6-X-12, & E17.

図2 1回目の骨髄標本における染色体数43の白血病細胞の核型. B4-5, C6-X-12, E17群から各1個, 合計3個の染色体が欠如している.

Photo. Ind. Co. Ltd., Tokyo). After an exposure time of 2 weeks, development was made for 4 minutes with Sakura Konidol-X at 16°C.

As shown in Figure 3, the frequency of labeled metaphases in the 6-hour culture was only 12.1%, while in the 72-hour culture 65.4% of the metaphases were labeled. In the 24-hour culture the frequency of labeled metaphases was 43.3%. The intensity of labeling was also stronger in the 72-hour culture (Figure 3).

As previously reported for cells of normal males, the Y chromosome shows a late-labeling pattern, which differs significantly from that of group G autosomes.<sup>11-13</sup> In normal bone marrow cells observed after 72-hours of culture, 11 labeled metaphases out of 13 also showed a late-labeling Y chromosome. This phenomenon was also seen in leukemic cells from 24-hour cultures. Out of 10 labeled metaphases available for analyses, 8 cells had the Y chromosome showing a heavy labeling pattern. The labeling patterns of other autosomes of leukemic cells were generally similar to those observed in normal cultured leukocytes. However, it is interesting to note that several leukemic cells had a late-replicating chromosome in group C6-X-12 which was similar to the late-replicating X chromosome in female cells, even though those cells had an XY sex-constitution.

**Fluorescent Staining Study.** Some of the slides made for autoradiographic study were also used for fluorescent staining study according to a modification of the method of Pearson et al (1970).<sup>1</sup> Prior to staining with carbol fuchsin, slides were kept in McIlvaine's citric acid-phosphate buffer (pH 4.1) for 5 minutes, then in a freshly prepared 0.5% aqueous solution of quinacrine hydrochloride ("Atabrine", Winthrop Lab., N.Y.) for 5 minutes, washed and mounted in buffer for observation under a Nikon fluorescence microscope, using a BV excitor filter and Y51 and Wratten 2B barrier filters. After the fluorescent staining observation, these slides were also examined autoradiographically, according to the method already described.

Fluorescent staining observations were made of cells from the 24- and 72-hour cultures of the second bone marrow sample, and the 48-hour culture of peripheral blood of the patient. In each of 20 normal cells from the 72-hour bone marrow culture and the 48-hour blood culture, a brightly fluorescing Y chromosome was seen identical with that observed in cells of normal male individuals.<sup>1,2</sup> On the other hand, in 43 leukemic cells from the 24-hour bone

を用いて行った。露出時間 2 週間の後に「さくらコニドール X」で 16°C, 4 分間現像した。

図 3 に示したように、6 時間培養では標識された分裂中期細胞の頻度は 12.1% にすぎないが、72 時間培養で分裂中期細胞の 65.4% が標識された。なお、24 時間培養での標識分裂中期細胞の頻度は 43.3% であった。標識の程度も 72 時間培養が一層顕著であった (図 3)。

正常男性細胞について報告されているように、Y 染色体は後期標識パターンを示し、これは G 群常染色体におけるパターンと有意に異なる。<sup>11-13</sup> 72 時間培養で認められた正常骨髄細胞では、標識された分裂中期細胞 13 個中 11 個に Y 染色体の後期標識がみられた。この現象は、24 時間培養の白血病細胞にも認められた。分析可能な分裂中期細胞 10 個中 8 個に強い標識パターンを示す Y 染色体があった。白血病細胞におけるその他の常染色体の標識パターンは、正常リンパ球の培養で認められているものとおおむね類似していた。しかし、数個の白血病細胞では、性染色体構成が XY であるにもかかわらず、女性細胞の後期複製 X 染色体に類似した後期複製染色体が C6-X-12 群に認められた。

**蛍光染色法検査。** オートラジオグラフ法検査のために作製した標本の一部について Pearson ら (1970 年)<sup>1</sup> の方法の変法を用いて蛍光染色法検査を行った。石炭酸フクシン染色に先立って標本を McIlvaine クエン酸リン酸塩緩衝液 (pH 4.1) に 5 分間浸し、次いで、塩酸キナクリン (Winthrop Laboratory 社製の Atabrine) の新鮮な 0.5% 水溶液に 5 分間浸し、緩衝液で洗った後に緩衝液内に封入した。観察はニコン蛍光顕微鏡下で BV 励起フィルターならびに Y 51 および Wratten 2 B 干渉フィルターを用いて行った。蛍光染色法の完了後に、この標本についても前記の方法に基づいてオートラジオグラフ法検査を行った。

2 回目の骨髄標本の 24 時間および 72 時間培養から得られた細胞ならびに末梢血の 48 時間培養からの細胞について蛍光染色法検査を行った。骨髄 72 時間培養および血液 48 時間培養からそれぞれ 20 個の正常細胞について調べたところ、正常男性細胞に認められていると同様の強い蛍光性を示す Y 染色体がみられた。<sup>1,2</sup> 一方、骨髄 24 時間

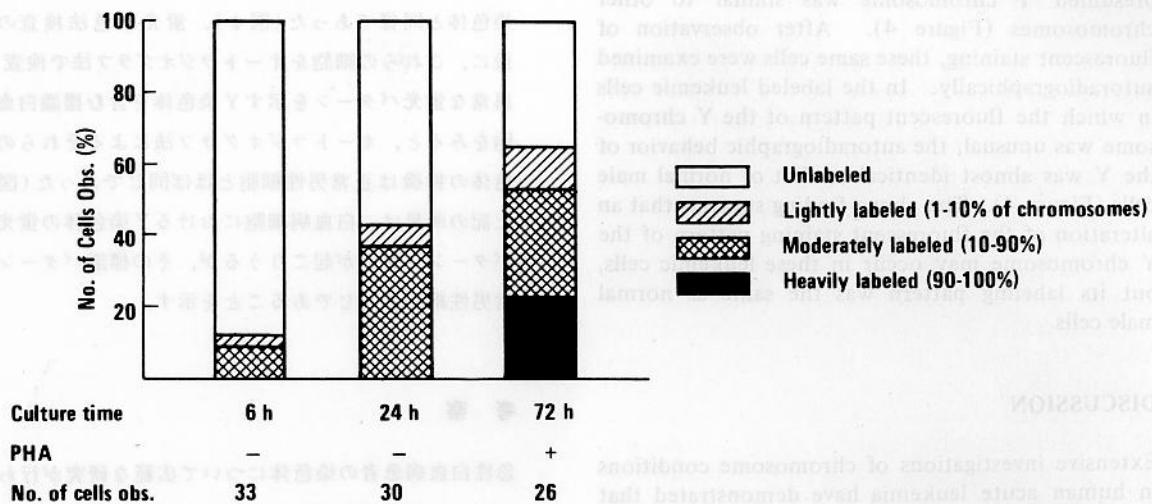


FIGURE 3. Frequency of cells incorporating tritiated thymidine in cells cultured from the second bone marrow sample.

図3 2回目の骨髄標本の培養における tritiated thymidine 標識細胞の頻度.

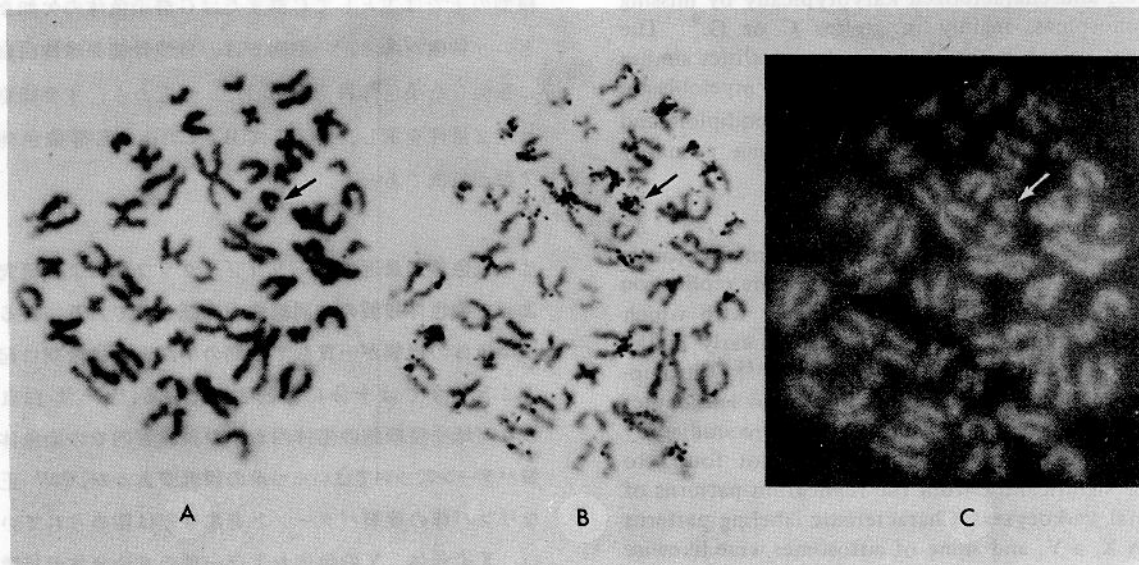


FIGURE 4. Metaphases of a leukemic cell containing 46 chromosomes from a 24-hour culture of the second bone marrow sample. A: a fuchsin-stained metaphase having pseudodiploid constitution with a Y chromosome (arrow) (46; XY; -B, -C, -17, +F, +G, +G). B: the same metaphase after autoradiography, showing a heavily labeled Y chromosome (arrow). C: the same metaphase stained by quinacrine hydrochloride, showing the moderately fluorescing Y chromosome (arrow).

図4 2回目の骨髄標本の24時間培養から得た染色体数46の白血病細胞の分裂中期像。A: フクシン染色をした分裂中期像で、偽2倍性構成を示し、Y染色体(矢印)がある(46; XY; -B, -C, -17, +F, +G, +G)。B: オートラジオグラフィ法による同じ分裂中期像で、強く標識されたY染色体(矢印)がみられる。C: 同じ分裂中期像の塩酸キナクリン染色で、中等度の蛍光性を示すY染色体(矢印)がみられる。

marrow culture, there was no brightly fluorescing small chromosome, and the fluorescence of the presumed Y chromosome was similar to other chromosomes (Figure 4). After observation of fluorescent staining, these same cells were examined autoradiographically. In the labeled leukemic cells in which the fluorescent pattern of the Y chromosome was unusual, the autoradiographic behavior of the Y was almost identical to that of normal male cells (Figure 4). The above finding suggests that an alteration of the fluorescent staining pattern of the Y chromosome may occur in these leukemic cells, but its labeling pattern was the same as normal male cells.

## DISCUSSION

Extensive investigations of chromosome conditions in human acute leukemia have demonstrated that the majority of cases with this disease have shown inconsistent chromosomal patterns with aneuploidy or pseudodiploidy, but that such chromosome abnormalities appeared to be unique for each case. Further, acute myeloblastic leukemia was shown to have aneuploidy which was invariably hypodiploid with the occasional appearance of marker chromosomes, and characterized karyotypically by missing chromosomes, mainly in groups C or G.<sup>9</sup> The present case has chromosome abnormalities similar to that found in cases with acute myeloblastic leukemia; that is, the stemline was hypodiploid and characterized by chromosomes missing primarily from groups B, C, and E.

Recent autoradiographic studies of human chromosomes have established that chromosome replication is asynchronous and the consistency with which certain chromosomes replicate late or early in the S period is now well documented.<sup>11,12,14</sup> Chromosome replication patterns in leukemic leukocytes and cancer cells *in vivo* and *in vitro* were studied by several investigators,<sup>15-17</sup> and were not found to differ significantly from the replication patterns of normal leukocytes. Characteristic labeling patterns of an X, a Y, and some of autosomes were likewise not different from normal. The findings of the present study are in accord with these data and conclusions.

In the present study, the labeling frequency of bone marrow leukemic cells in 24-hour cultures was lower than that of normal bone marrow cells in 72-hour cultures, which seems to indicate that the rate of incorporation of tritiated thymidine into

培養の白血病細胞43個には強い蛍光性を示す小型の染色体はなく、Y染色体と思われるものの蛍光性はその他の染色体と同様であった(図4)。蛍光染色法検査の終了後に、これらの細胞をオートラジオグラフ法で検査した。異常な蛍光パターンを示すY染色体を含む標識白血病細胞をみると、オートラジオグラフ法によるそれらのY染色体の特徴は正常男性細胞とほぼ同じであった(図4)。上記の所見は、白血病細胞におけるY染色体の蛍光染色パターンに変化が起こりうるが、その標識パターンは正常男性細胞と同じであることを示す。

## 考 察

急性白血病患者の染色体について広範な研究が行われており、患者の大部分には一貫した染色体パターンはなく、異数性も偽2倍性も認められている。しかし、各例についてみれば、特異的な染色体異常がみられるようである。急性骨髄芽球性白血病では異数性、それもきまって低2倍性を示すこと、時には指標染色体が認められること、核型の上では主としてC群またはG群染色体の欠如などという特徴がある。<sup>9</sup> 本例では、急性骨髄芽球性白血病に類似した染色体異常があった。すなわち、主要細胞系は低2倍性を示し、主としてB、CおよびE群染色体の欠如が特徴であった。

ヒト染色体の最近のオートラジオグラフ法による研究によって染色体複製の非同調性が立証されており、ある種の染色体の複製が一貫してS期の早期または後期に起こることも今では十分に確認されている。<sup>11,12,14</sup> 白血病リンパ球や癌細胞の生体内および試験管内での染色体複製パターンについてはいくつかの研究があるが、<sup>15-17</sup> 正常なリンパ球の複製パターンと有意な差は認められていない。X染色体、Y染色体および一部の常染色体の特徴的な標識パターンにも変化は認められない。今回の研究所見は、それらの資料や結論と一致する。

本研究では、骨髄24時間培養における白血病細胞は骨髄72時間培養の正常細胞よりも標識される頻度が低かった。このことは、白血病細胞は正常細胞よりも試験管内での

leukemic cells was lower than that of normal cells in vitro. Further, the labeling frequency of the leukemic cells was lower in the short period culture (6 h) than in the longer period culture (24 h). These findings suggest that the duration of G<sub>2</sub> period of leukemic cells is longer than that of normal cells in vitro, but may shorten with prolonged culture time. Several reports,<sup>17,18</sup> suggested the possibility that the G<sub>2</sub> period of leukemic cells was longer than that of normal leukocytes in the presence of PHA in vitro. Our observations seem to be consistent with the data of the earlier studies.

The fluorescent staining of human chromosomes was recently developed, making it now possible to identify with certainty the Y chromosome and also each of the autosomes.<sup>1-5</sup> It is noteworthy that in the present case the Y chromosome in leukemic cells from 24-hour bone marrow culture did not show a bright fluorescing pattern, while almost all normal cells from leukocyte culture and 72-hour bone marrow culture from this patient, as well, had a strong fluorescing Y chromosome. This finding suggests that the fluorescent staining pattern of the Y chromosome in the leukemic cells of the present case seems to differ from that of normal male cells, although this may not be a common characteristic of the leukemic cells, because brightly fluorescing Y chromosomes were found in Ph<sup>1</sup>-positive cells from the bone marrow of a patient with chronic myelocytic leukemia.<sup>19</sup>

According to the sequential studies of the same metaphases of leukemic cells by fluorescent staining and autoradiographic techniques, we have clearly demonstrated that the Y chromosome with an abnormal fluorescing pattern nevertheless has a labeling pattern almost identical with that of normal male cells. These results indicate that any alteration of the fluorescing pattern of the Y chromosome in leukemic cells is not necessarily accompanied by a detectable change in its replication pattern. Although detailed analyses of fluorescent pattern of other autosomes in the leukemic cell population of this patient were not performed, analyses by fluorescent staining and autoradiographic techniques of the same metaphases will undoubtedly provide new information for understanding the cytogenetic aspects of normal and malignant cells.

tritiated thymidine 摂取率が低いことを示すものと思われる。なお、長期培養(24時間)よりも短期培養(6時間)の方が白血病細胞の標識頻度が低かった。これらの所見は、試験管内での白血病細胞のG<sub>2</sub>期が正常細胞よりも長く、その期間は培養時間の延長とともに短縮することを示している。試験管内でのPHA存在下における白血病細胞は正常白血球よりもG<sub>2</sub>期が長いことを示す報告がいくつかある。<sup>17,18</sup> われわれの観察結果は、これらの研究の成績と一致する。

ヒト染色体の蛍光染色法は最近開発された技法であり、それによって今ではY染色体や各常染色体の確実な同定が可能になった。<sup>1-5</sup> 本例では、骨髄24時間培養における白血病細胞のY染色体が強い蛍光パターンを示さなかったのに対して、その白血球培養および骨髄72時間培養における正常細胞のほとんどすべてに強い蛍光性を示すY染色体があった。この所見は、本例における白血病細胞のY染色体の蛍光染色パターンが正常細胞とは異なることを示唆するが、しかし白血病細胞の共通した特徴とはいえないであろう。その根拠としては、慢性骨髄性白血病の1例において、その骨髄におけるPh<sup>1</sup>陽性細胞に強い蛍光性を示すY染色体が認められていることがあげられる。<sup>19</sup>

蛍光染色法とオートラジオグラフ法を用いて白血病細胞における同一の分裂中期像を連続して調べた結果、Y染色体が異常蛍光パターンを示すにもかかわらず、正常男性細胞のY染色体とほぼ同じ標識パターンを示すことが明らかに認められた。この結果は、白血病細胞におけるY染色体の蛍光パターンについてのある種の変化が複製パターンの検出可能な変化を必ずしも伴うものではないことを示している。本例における白血病細胞集団におけるその他の常染色体の蛍光パターンについての詳細な分析は行われなかったとはいえ、蛍光染色法およびオートラジオグラフ法を用いて同一の分裂中期像を分析することから、正常および悪性細胞の細胞遺伝学的特性を理解するうえでの新しい知見がもたらされることは疑う余地がないところである。

## REFERENCES

### 参考文献

1. PEARSON PL, BOBROW M, VOSA CG: Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. *Nature* 226:78-80, 1970
2. CASPERSSON T, ZECH L, JOHANSSON C: Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exptl Cell Res* 62:490-2, 1970
3. O'RIORDAN ML, ROBINSON JA, BUCKTON IE, EVANS HJ: Distinguishing between the chromosomes involved in Down's syndrome (Trisomy 21) and chronic myeloid leukaemia (Ph<sup>1</sup>) by fluorescence. *Nature* 230:167-8, 1971
4. MILLER DA, ALLDERDICE PW, MILLER OJ, BREG WR: Quinacrine fluorescence patterns of human D group chromosomes. *Nature* 232:24-7, 1971
5. BREG WR, MILLER OL, MILLER DA, ALLDERDICE PW: Distinctive fluorescence of quinacrine-labeled human G group chromosomes. *Nature New Biol* 231:276-7, 1971
6. MILLER OJ: Autoradiography in human cytogenetics. *Adv Hum Genet* 1:35-130, 1970
7. OKADA H, ISHIMARU T: Two instances of leukemia in siblings. *ABCC TR* 3-72
8. TJIO JH, WHANG J: Chromosome preparations of bone marrow cells without prior in vitro culture or in vivo colchicine administration. *Stain Technol* 37:17-20, 1962
9. SANDBERG AA, ISHIHARA T, KIKUCHI Y, CROSSWHITE LH: Chromosomal differences among the acute leukemias. *Ann NY Acad Sci* 113:663-716, 1964
10. CARR DH, WALKER JE: Carbol fuchsin as a stain for human chromosomes. *Stain Technol* 36:233-6, 1961
11. SCHMID W: DNA replication patterns of human chromosomes. *Cytogenetics* 2:175-93, 1963
12. GERMAN JL: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells. *J Cell Biol* 20:37-55, 1964
13. KIKUCHI Y, SANDBERG AA: Chronology and pattern of human chromosome replication. 2. Autoradiographic behavior of various Y and X chromosomes. *J Natl Cancer Inst* 34:795-813, 1965
14. KIKUCHI Y, SANDBERG AA: Chronology and pattern of human chromosome replication. 1. Blood leukocytes of normal subjects. *J Natl Cancer Inst* 32:1109-43, 1964
15. GAVOSTO F, PILERI A, PEGORARO L, MOMIGLIANO A: In vivo incorporation of tritiated thymidine in acute leukemia chromosomes. *Nature* 200:807-9, 1963
16. YAMADA K, SANDBERG AA: Chronology and pattern of human chromosome replication. 3. Autoradiographic studies on cells from cancer effusions. *J Natl Cancer Inst* 36:1057-73, 1966
17. SOFUNI T, KIKUCHI Y, SANDBERG AA: Chronology and pattern of human-chromosome replication. 5. Blood leukocytes of chronic myelocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 38:141-56, 1967
18. HAINES H: Autoradiographic studies of the chromosomes in chronic granulocytic leukemia. *Nature* 207: 552-3, 1965
19. SOFUNI T: Unpublished data, 1972