



Title	Cockayne症候群の迅速羊水診断法について
Author(s)	河井, 和彦
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34852
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	かわ	い	かず	ひと
	河	井	和	彦
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6708	号	
学位授与の日付	昭和60年2月26日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	Cockayne 症候群の迅速羊水診断法について			
論文審査委員	(主査)			
	教授	熊原	雄一	
	(副査)			
	教授	近藤	宗平	教授 藪内 百治

論文内容の要旨

(目 的)

Cockayne 症候群 (CS) は低身長、視力障害、精神障害、日光過敏などを特徴とする稀な常染色体性劣性遺伝病である。この疾患では、皮膚線維芽細胞とともに羊水細胞でも紫外線 (UV) に対して高感受性であることが知られており、これは羊水診断に利用されている。

従来の CS の羊水診断では羊水細胞の検査必要細胞数までの培養日数と colony formation assay を用いた羊水細胞の UV 感受性検査日数は各々 21 日間と 14 日間で計 35 日間が必要とされていた。今回我々は UV 感受性検査の方法を改良し、より短期間で行える CS の羊水診断法について検討を行った。

(方法ならびに成績)

細胞：既に colony formation assay で CS と診断され、人工流産の結果得られた胎児の皮膚線維芽細胞 (CS2OS 細胞) と、この際診断に用いられた培養羊水細胞 (CSAF 細胞) を用いた。正常対照としての皮膚線維芽細胞 (NHKK 細胞) 及び羊水細胞 (NAF 細胞) については、それぞれ継代数をそろえて用いた。

培養：線維芽細胞については 10% FCS 添加 minimum essential medium (MEM) を用い羊水細胞については必須、非必須アミノ酸、ビタミン及び 20% FCS 添加 MEM を用いて 5% CO₂ 下 37℃ で培養した。

10⁵/dish の割でまかれた CSAF, NAF, CS2OS, NHKK 細胞を [¹⁴C]-TdR で前ラベルし、翌日 8 J/m² の UV 照射後、経時的に [³H]-TdR (10 μCi/ml) で 60 分間パルスラベルを行い、S 期 DNA 合成の経時的变化を調べた。アルカリ処理後これらの細胞を回収し液体シンチレーションカウンターで

UV 照射後 S 期 DNA 合成を [^3H] カウント数 / [^{14}C] カウント数として測定した結果、正常群の羊水及び線維芽細胞では UV 照射後 2～4 時間で S 期 DNA 合成は 30～40% のレベルに低下していたが、UV 照射後 12 時間では 85～90% にまで回復していた。一方 CS 群の羊水、線維芽細胞では、ともに UV 照射後 12 時間経ても S 期 DNA 合成の回復は認めず、それぞれ 30%、15% と低下したままであった。

別の方法として、上記の 4 種の細胞を 3×10^4 / dish の割でカバースリップの上で培養し、 12 J/m^2 の UV 照射後経時的に $0.3 \mu\text{Ci/ml}$ の [^3H]-TdR で 15 分間パルスラベルを行った。その後 14 日間かけてオートラジオグラフィーを用い細胞核上に出現した銀粒子の数を数えて S 期 DNA 合成を測定したが、CS 群と正常群は上記と同じ傾向を示した。

これらのことは液体シンチレーション法あるいは、オートラジオグラフィー法で UV 照射後の S 期 DNA を測定することにより羊水細胞あるいは皮膚線維芽細胞の UV 感受性を colony formation assay と同様に調べることができることを意味する。

特に UV 照射後 12 時間で CS 細胞と正常細胞の S 期 DNA 合成の差が著明であることから UV 照射後 12 時間の one point assay を行うと液体シンチレーション法では必要細胞数は 5×10^5 で、これは羊水穿刺後 21 日間の培養日数が必要で、測定日数の 4 日間をあわせて診断日数は 25 日間であった。オートラジオグラフィーの方法では特に [^3H]-TdR の濃度をあげ ($1 \mu\text{Ci/ml}$)、パルス時間を延長 (30 分間) した方法では必要細胞数 10^5 (羊水穿刺後 14 日間で得られる) で測定日数も 7 日間となり診断必要日数も 21 日間となった。

(総括)

CS の羊水診断において羊水細胞の UV 感受性の測定は UV 照射後の colony formation assay とともに UV 照射後の S 期 DNA 合成を測定することでも可能であり、後者を指標とした液体シンチレーション法あるいはオートラジオグラフィー法を用いると従来の羊水診断必要日数の 40% を短縮し得る。

論文の審査結果の要旨

Cockayne 症候群は稀な劣性遺伝病であるため主論文に示す羊水診断に関する情報は極めて貴重である。また紫外線感受性についての新しい指標を用い Cockayne 症候群の羊水診断を迅速にすることは臨床的な面においても意義あることと思われる。

副論文に示されたコケイン症候群の相補性群の発見、あるいは受精卵を用いた遺伝子発現に関する研究など、貴重かつ意義ある研究内容であり、あわせて博士論文にふさわしいものである。