

氏 名 (本籍)                    曾                    宗                    仁

学 位 の 種 類                    医                    学                    博                    士

学 位 記 番 号                    医                    第                    1 6 3 1                    号

学 位 授 与 年 月 日                    昭 和 6 0 年 2 月 2 7 日

学 位 授 与 の 要 件                    学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                    昭 和 4 9 年 3 月  
台湾高雄医学院医学系卒業

学 位 論 文 題 目                    Spontaneous and MMC induced SCE in Lympho-  
cytes from Patients with Cervical Cancer.  
(子宮頸癌患者の末梢血リンパ球の姉妹染色分体  
交換)

(主 査)

論 文 審 査 委 員   教 授 鈴 木 雅 洲   教 授 山 本 敏 行

教 授 及 川 淳

# 論文内容要旨

## 目 的

姉妹染色分体交換 SCE は, carcinogen 等による DNA の損傷を最も鋭敏にあらわす変化であると考えられている。DNA 修復機構等の異常を示す患者は, SCE 頻度が高く, しかも Bloom 症候群のように癌化率が高いことが報告されている。また, 癌患者との関連も考えられており, すでに乳癌では SCE の上昇が報告されている。そこで, 子宮頸癌患者の遺伝的背景及び DNA の損傷の程度を知るために患者を期別分類して SCE 頻度を測定し, 検討した。

## 方 法

治療前の子宮頸癌患者22名(0期7名, I期5名, II期7名, III期3名)及び control として健康婦人12名を対象とした。平均年齢は, 子宮頸癌群 46.6 才, control 群 40.4 才であった。ヒトの末梢血をヘパリン処理した注射器で採取し, 20~30分静置したのち, その buffy coat から 0.3 ml を, 4 ml RPMI 1640 培地, 1 ml Fetal Calf Serum, 500  $\mu$ g AB·Pc, そして 0.2 ml PHA-M の入った tube 内で培養した。引き続き24時間 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の恒温槽で incubate したのち 5  $\mu$ g/ml BrdU を加え, その半分の tube に MMC (0.002  $\mu$ g/ml) を同時に加え, アルミ箔でつつみ, その後再び 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 恒温槽に移し, 70時間後に 0.1  $\mu$ g/ml colcemid を加え, 72時間後に標本作製した。cells は 0.075 MKCl で 10 分間低張処理し, カルノア液で 3 回固定した後, 空気乾燥法で標本作製した。標本の染色には, Fluorescence Plus Giemsa Technique いわゆる FPG 法を用いた。すなわち 33258 ヘキスト (4  $\mu$ g/ml) で 15 分染色した標本を McIlvain's buffer (pH 7.0) で封入して, 高圧水銀ランプを 50 cm の距離から 20 分間照射した。その後 20 分間 60°C の 2 SSC に入れ, 蒸留水洗滌後ギムザ液 (4%, pH 6.4) で 15 分間染色した。少なくとも 20 細胞を at random に選び, 46 chromosome であることを確認した後, 1000 倍顕微鏡下において SCE 頻度を数えた。centromere 付近の SCE は, 明らかな chromatid のねじれを除いて採点に加えた。cell cycle についても Replicative Index を用いて検討を加えた。

## 成 績

(1) control 群 12 名の末梢血リンパ球の自然発生 SCE 頻度は, 合計 285 の metaphases 中, SCE は計 1600 (range は 2~13) 平均値  $\pm$  S.D. は  $5.54 \pm 2.03$ , MMC 誘発 SCE は計 222 metaphases 中 SCE の数は 2,058 (range は 2~17), 平均値は  $9.24 \pm 2.77$  であった。(2) 子

宮頸癌 0 期の患者 7 名の末梢血リンパ球の自然発生 SCE は全部で 166 の metaphases のうち total SCE は 1,108 (range は 3~12), 平均値  $\pm$  S. D. は  $6.68 \pm 2.32$  であった。MMC 誘発 SCE は 170 metaphases を数え, SCE の数は 1,770 (range は 2~24), 平均値  $\pm$  S. D. は  $10.19 \pm 4.23$  であり, (3) 子宮頸癌 I 期の患者 5 名の自然発生 SCE は 110 metaphases 中 SCE 総数は 890 であり (range は 3~18) 平均 SCE 頻度は  $8.09 \pm 2.91$  である。MMC 誘発 SCE は, 115 metaphases 中総 SCE は 1,477 (range は 2~23) 平均 SCE 頻度は  $12.62 \pm 4.30$  であった。(4) 子宮頸癌 II 期の患者 7 名の自然発生 SCE は, 175 metaphases 中 total SCE は 1,546 (range は 3~14), 平均 SCE は,  $8.83 \pm 2.27$  であった。MMC 誘発 SCE は 191 の metaphases 中 total SCE は 2,697 (range は 5~25) 平均 MMC 誘発 SCE は  $14.11 \pm 3.87$  であった。(5) 子宮頸癌 III 期の患者 3 名の末梢血リンパ球の自然発生 SCE 90 metaphases 中 total SCE は 967 (range は 4~19) で, 平均 SCE 頻度は  $10.74 \pm 2.94$  であり, MMC 誘発 SCE は 80 metaphases 中 total SCE は 1,343 (range は 6~25) 平均値は  $16.78 \pm 3.52$  であった。(6) spontaneous cell cycle においては control 群の 1 st, 2 nd, 3 rd, division と R. I. は, それぞれ 58.1%, 35.7%, 6.1%, 1.48 であった。子宮頸癌群では, それぞれ 50.1%, 35%, 14.9%, 1.65 であった。MMC 誘発 cell cycle においては control 群でそれぞれ 51.4%, 38.4%, 10.2%, 1.59 であった。子宮頸癌群は, それぞれ 48%, 36.5%, 15.5%, 1.68 であった。

## ま と め

①子宮頸癌患者 22 名の SCE 頻度は,  $8.35 \pm 2.93$  S.D. で, control 群の  $5.54 \pm 2.03$  に比較して有意な増加を認めた。②子宮頸癌の stage が, 0 期, I 期, II 期, III 期となるに従って SCE 頻度は, それぞれ  $6.68 \pm 2.32$ ,  $8.09 \pm 2.91$ ,  $8.83 \pm 2.27$ ,  $10.74 \pm 2.94$  と増加傾向にあった。③ control 群に比して全 stage で有意な増加があった。④ MMC 誘発 SCE 頻度は, 子宮頸癌群, control 群共に, 自然発生 SCE より高い値を示した。また, stage が進むにつれその頻度は増加した。⑤ MMC 誘発 SCE 頻度は, control 群に比べて子宮頸癌群の方が有意に高かった。また, 頸癌群では, その stage が進むにつれてその増加幅が大きくなる傾向が認められた。⑥ cell cycle を Replicative Index でみると, control 群に比べ, 子宮頸癌患者群で増加がみられたが, 有意ではなかった。

## 審査結果の要旨

姉妹染色分体交換 SCE は、Carcinogen 等による DNA の傷害を最も鋭敏にあらわす変化であると考えられている。DNA 修復機構等の異常を示す患者は、SCE 頻度が高く、しかも Bloom 症候群のように癌化率が高いことが報告されている。また、癌患者との関連も考えられており、すでに乳癌では SCE の上昇が報告されている。そこで、子宮頸癌患者の遺伝的背景及び DNA の損傷の程度を知るために患者を期別分類して SCE 頻度を測定し、検討した。

治療前の子宮頸癌患者 22 名及び control として健康婦人 12 名を対象とした。ヒトの末梢血をヘパリン処理した注射器で採取し、4 ml RPMI 1640 培地、1 ml Fetal Calf Serum、500  $\mu\text{g}$  AB-PC、そして 0.2 ml PHA-M の入った tube 内で培養した。引き続き 24 時間 37°C、5% CO<sub>2</sub> の恒温槽で incubate したのち 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BrdU を加え、その半分の tube に MMC (0.002  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を同時に加え、再び 37°C、5% CO<sub>2</sub> の恒温槽に移し、70 時間後に 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  colcemid を加え、72 時間後に標本を作製した。cells は 0.075 MKCl で 10 分間低張処理し、カルノア液で 3 回固定後、乾燥法で標本を作製した。標本の染色には FPG 法を用いた。33258 ヘキスト (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で 15 分染色した標本を McIlvaine's buffer (PH 7.0) で封入して、高圧水銀ランプを 50 cm の距離から 20 分間照射した。その後 20 分間 60°C 2SSC に入れ、蒸留水洗滌後 Giemsa 液 (4%, PH 6.4) で 15 分間染色した。少なくとも 20 細胞を at random に選び、46 Chromosome であることを確認し、1000 倍顕微鏡下において SCE 頻度を数えた。cell cycle についても Replicative Index を用いて検討を加えた。

Control 群 12 名の末梢血リンパ球の自然 SCE 頻度は  $5.54 \pm 2.03$  (平均値  $\pm$  S.D.)、MMC 誘発 SCE は  $9.24 \pm 2.77$ 。子宮頸癌 0 期の患者 7 名の自然発生 SCE は  $6.68 \pm 2.32$ 、MMC 誘発 SCE は  $10.19 \pm 4.23$ 。子宮頸癌 I 期の患者 5 名の自然発生 SCE は  $8.09 \pm 2.91$  である。MMC 誘発 SCE は  $12.62 \pm 4.30$ 。子宮頸癌 II 期の患者 7 名の自然発生 SCE は平均  $8.83 \pm 2.27$  で、MMC 誘発 SCE は  $14.11 \pm 3.87$  であった。子宮頸癌 III 期の患者 3 名の自然発生 SCE は  $10.74 \pm 2.94$  で、MMC 誘発 SCE は  $16.78 \pm 3.52$  であった。spontaneous cell cycle においては control 群の 1st, 2nd, 3rd, division と R.I. は、それぞれ 58.1%, 35.7%, 6.1%, 1.48% であった。子宮頸癌群では、50.1%, 35%, 14.9%, 1.65% であった。MMC 誘発 SCE は、control 群で 51.4%, 38.4%, 10.9%, 1.59% であった。子宮頸癌群は 48%, 36.5%, 1.55%, 1.68% であった。

子宮頸癌患者 22 名の SCE 頻度は、control 群に比較して有意な増加を認めた。頸癌の stage が、0 期・I 期・II 期・III 期となるに従って SCE 頻度は増加傾向にあった。control 群に比して全 stage で有意な増加があった。MMC 誘発 SCE 頻度は、両群共に、自然 SCE より高い値を示した。stage が進むにつれその頻度は増加した。MMC 誘発 SCE 頻度は、control 群に比べて癌群の方が有意に高かった。cell cycle を R.I. でみると、癌患者群で増加がみられたが、有意ではなかった。以上の研究は、学位を授与するに価するものと判定した。