

P 63

PI 染色による DNA-RNA 顕微蛍光多重測光法の試み

蒲池正浩、藤本高久、浦田洋二、竹下秀之、
諸富直文、葛原 啓、岡部英俊*、土橋康成、
芦原 司
(京都府医大・病理、*滋賀医大・検査部
病理)

細胞蛍光多重測光法によるDNA-RNA同時定量法は、細胞動態の有用な解析法であること、及びその標準化法をこれまで報告してきた。本研究は、(1)プロピジウム・アイオダイド(PI)蛍光染色を最近試作開発した自動ステージ顕微蛍光測光装置(NIKON PI-AUTO)に応用したDNA-RNA定量法を案出する、(2)従来用いていたアクリジン・オレンジ(AO)による解析と比較する、(3)細胞のRNA量変動の意義を検索する、ことを目的とした。

〔材料と方法〕ラットの単離肝細胞の塗抹標本を作製後、70%冷エタノール固定した。PI染色後、まず自動ステージ機構で各細胞の座標位置、並びに核数を決定し、個々の細胞のDNA+RNA量を測光定量した。次いで同一標本をRNase処理後、再びPI染色して再走査することにより、同一細胞についてDNA定量した。以上より、細胞のDNA-RNA量分布を求めて各種グラフに表示した。

〔結果と考察〕本法はAO染色を用いた場合と同様の成績を与えたが、とくにDNA量を対照としたRNA含量を評価でき、これまで困難であった標本間のRNA含量の比較が可能となった。また、RNAの増量は、一般には細胞の成熟傾向に対応した。

P 64

培養細胞を用いた in situ DNA cytofluorometry の試み

竹下秀之、楠崎克之*、辻 吉郎、葛原 啓、
蒲池正浩、浦田洋二、岡部英俊**、芦原 司
(京都府立医大・病理、*整形外科)
(**滋賀医大・検査部 病理)

細胞周期の各相で生じる細胞の構造変化は、従来から同調培養法で解析されているが、多くの同調法では薬剤の影響を無視できず、また同調度にも問題点が残されている。そこで我々は高精度の細胞動態研究法として、培養下の in situ DNA cytofluorometry を試みた。(材料と方法)培養下で活発な運動性をもつとともに著しい細胞形態変化を示しながら増殖する、ラット 4-HAQO 誘発肉腫由来の細胞株を用いた。位相差顕微鏡の観察下で目的とする細胞集団のフラスコ底面に目印をつけ、写真撮影後直ちに変法カルノア液を培養液中に徐々に添加して固定した。風乾後、フラスコから培養面を取りはずし、RNase処理後PI染色を施した。次いで、落射型顕微蛍光測光装置を用い、培養面の目印と写真を基に、培養細胞の位置関係を確認しながら個々の細胞の核DNA定量を行った。

(結果)本手法により、細胞形態、及び細胞分布様式などの培養所見と1対1で対応した細胞核DNA定量が可能となった。細胞周期の進行に伴う細胞形態の変化、及び分裂後の娘細胞の同調性などについて詳細に検討した。