原 著

塗抹乾燥標本および Bromodeoxyuridine を用いた
in vivo におけるヒト白血病細胞動態の解析

金沢大学医学部第3内科

中村 忍 武田 康 小林 和美
吉田 喬 大竹 茂樹 伊藤 恵子
神野 正敏 平井 潤子 松田 保

細胞形態と同時に、*in vivo* での細胞の増殖動態を観察する方法を検討する目的で、急性白血病未治療例に bromodeoxyuridine (BrdU) を静脈内注射した後、骨髓液塗抹乾燥標本を作製し、抗 BrdU 抗体を用いて免疫組織科学的に白血病細胞の BrdU 標識率 (labeling index, LI) を算定した。

1. BrdU 200 mg/m² を one shot で静脈内注射し、30 分後に骨髓穿刺を行い塗抹乾燥標本を作製したが、骨髓中の白血病細胞の LI は 3.0~7.5% と、これまで報告されている BrdU 点滴法およびトリチウムチミジン法と同様な値であった。この結果、BrdU は迅速に S 期の細胞に取り込まれ、細胞の増殖動態の解析にきわめて有用と考えられた。

2. 塗抹乾燥標本下で酵素抗体法間接法を用いて BrdU 標識細胞を検出したが、標識の有無の鑑別は容易であった。

3. 細胞形態の観察のために、後染色としてギムザ染色を施したが、細胞の同定は可能なものの詳細な観察にはまだ改良を要すると考えられた。

4. 良好な標本を作製するためには、塗抹後ただちに 2 時間以上冷風にて乾燥することが重要と思われた。

Key words : Acute leukemia—Bromodeoxyuridine (BrdU)—Monoclonal antibody to BrdU—Labeling index—Air-dried smear

I. はじめに

腫瘍細胞の増殖動態を明らかにすることは、基礎的研

Cytokinetic analysis of human leukemic cells *in vivo* with bromodeoxyuridine using air-dried smear

Shinobu NAKAMURA, M.D., Yasushi TAKEDA, M.D., Kazumi KOBAYASHI, M.D., Takashi YOSHIDA, M.D., Shigeki OHTAKE, M.D., Keiko ITOH, M.D., Masatoshi KANNO, M.D., Junko HIRAI, M.D., and Tamotsu MATSUDA, M.D.

The Third Department of Medicine, Kanazawa University School of Medicine

論文別刷請求先 ☎920 金沢市宝町 13 の 1 金沢大学医学部第3内科 中村 忍

昭和 62 年 12 月 7 日受付

昭和 63 年 4 月 15 日受理

究のみならず臨床的にも効果的な治療を行ううえで極めて重要である。これまで、細胞動態の解析のための一つの方法として、³H-thymidine を用いて DNA 合成期 (S 期) にある細胞の標識がなされているが、本法はアイソトープを使用するために設備の規制があり、また、判定に autoradiography 法を用いるために結果を得るまでに長時間を要するなど、臨床には適さない。

近年、thymidine の analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体 (抗 BrdU 抗体) が開発され³⁾、アイソトープを用いることなく迅速に標識率 (labeling index, LI) が得られるようになった^{2,11,12)}。また、BrdU はすでに放射線増感剤として臨床的に使用されており⁷⁾、直接生体内に投与できるために、これまで不可能であった *in vivo* での LI の測定が可能

表 1 BrdU 投与症例

症例	性	年齢	病型 (FAB)
1	M	79	AML (M1)
2	M	61	AML (M1)
3	F	41	AML (M2)
4	M	78	AMMoL (M4)
5	M	17	AMoL (M5a)
6	F	19	ALL (L1)

となった^{6,9,10,12}). BrdU を用いての LI の測定は flow cytometry 法あるいは免疫組織化学的方法のいずれでも可能である。前者は大量の細胞について観察可能であるが、目的とする細胞の占める割合の少ない検体では、個々の細胞を同定しながら LI を測定する必要が生ずる。

今回、急性白血病患者に BrdU を静脈内注射し、*in vivo* での骨髓中の白血病細胞の LI を、免疫組織化学的手法を用いて、塗抹乾燥標本下で細胞形態と同時に観察する方法を検討したので報告する。

II. 対象および方法

1. 対象 (表 1)

対象は、急性白血病の末治療例で、急性骨髓性白血病 (AML) M1 2 例, M2 1 例, 急性骨髄単球性白血病 (AMMoL) M4 1 例, 急性単球性白血病 (AMoL) M5a 1 例および急性リンパ性白血病 (ALL) L2 1 例の計 6 例である。年齢は 19 歳から 79 歳までで、男性 4 例女性 2 例である。いずれの患者にも本研究の主旨を十分に説明し、了解を得た上で実施した。

2. 方法

表 2 に方法を示し、要点を述べる。白血病の治療前に、BrdU 200 mg/m² を静脈内注射し、30 分後に骨髓穿刺を行って骨髓液を採取し、型のごとく塗抹標本を作製した。塗抹後ただちにドライヤーを用いて冷風にて 2 時間以上乾燥させた後、室温にて 70% エタノールで 30 分間固定した。次に一旦標本を乾燥させ、0.3% 過酸化水素加メタノールに 30 分間浸して内因性ペルオキシダーゼ (POX) を阻害し、phosphatebuffered saline (PBS) にて洗浄した。0.07 N 水酸化ナトリウムに 2 分間浸し DNA の denaturation を行った後、0.1 M ホウ酸ナトリウムに 2 分間浸し、PBS にて洗浄した。以降の過程では標本を湿潤箱の中に入れて乾燥を防いだ。ウマ血清を載せて 20 分間処理した後、血清を捨て、次に PBS で 5% に希釈した Tween 20 50 μ l の中に抗 BrdU 抗体 5 μ l を入れた液を載せて 30 分間反応させた。PBS で洗浄の

表 2 方 法

後、PBS にて 200 倍に希釈した POX-conjugated IgG を 30 分間作用させた。さらに PBS で洗浄し、0.01% 過酸化水素加 0.05% diaminobenzidine (DAB) にて 10 分間染色し、流水中で 5 分間水洗した。後染色としてギムザ染色を選び、通常の塗抹標本の染色よりもやや薄く染めるように染色時間 (10~15 分) を調節した。ギムザ染色の後、水洗、乾燥し鏡検した。LI の検討には、無作為に 500 個の白血病細胞を観察し、この中の BrdU 標識細胞の比率を算定した。同時に標本の染色性の検討も行った。

図 1 a, b 症例 5 (AMoL) の白血病細胞 (後染色なし)

BrdU 標識細胞の核は DAB 染色により褐色に染まる. BrdU の取り込みの程度に応じて点状 (a) から核全体が濃染する (b) のものまでさまざまである (a: $\times 1,000$, b: $\times 1,000$)

図 2 a, b 図 1 と同一症例 (後染色としてギムザ染色を施してある)

a, b ともに核が黒く染まっている細胞 (矢印) が BrdU を取り込んだ白血病細胞. 標識の有無の鑑別も容易で, 細胞の同定も可能である (a: $\times 400$, b: $\times 1,000$)

III. 成績

1. 標本の染色性

後染色を施さない場合には, BrdU 標識細胞の核は DAB 染色により褐色調に染まり, 非標識細胞との鑑別は容易であった. しかし, 細胞の存在は判別できるものの細胞の同定は不可能であった. DAB 染色の態度は, 取り込んだ BrdU 量を反映してわずかに顆粒状に染まるものから, 核全体が濃染するものまでさまざまであった (図 1 a, b).

ギムザ染色を施した標本では, 細胞全体の形態はよく観察できたが, 細胞質内の顆粒などの詳細な観察は不可能であった (図 2 a, b). ギムザ染色を行っても, BrdU 標識細胞の有無は容易に鑑別できたが, 染色が濃すぎるとわずかに標識された細胞を見落す危険性があった.

塗抹標本作製時の乾燥が不十分な場合には, 細胞形態の保持はほぼ良好であったが, 細胞の変形, ひび割れ現象がみられた.

2. 骨髓中の白血病細胞の BrdU の標識率

今回検討した 6 例の BrdU 標識率は, 3.0~7.5% であり, 末梢血白血球数および骨髓有核細胞数の多寡との関係はみられなかった (表 3).

IV. 考察

BrdU を用いる最大の利点は簡便に迅速にしかも *in vivo* での LI の算定が可能なことである. 今回の実験では, 急性白血病における骨髓中の白血病細胞の LI が *in vivo* で測定可能か否かを検討した. BrdU 量は Raza ら⁹⁾ の報告を参考にし, 200 mg/m² を静脈内注射した. この量は, これまで放射線増感剤として使用されている量⁶⁾

表 3 BrdU 投与時の末梢白血球数, 骨髄の cellularity および白血病細胞の占める割合
ならびに BrdU 標識率

症例	病型	BrdU 標識時の 末梢白血球数($\times 10^9/l$)	BrdU 標識時の 骨髄の cellularity	骨髄中の 白血病細胞(%)	BrdU 標識率(%)
1	AML	17.8	normocellular	92.0	3.0
2	AML	1.8	hypocellular	39.6	7.5
3	AML	6.9	hypercellular	42.8	6.4
4	AMMoL	3.6	hypocellular	18.4	4.2
5	AMoL	140.0	hypercellular	86.0	5.6
6	ALL	156.0	hypercellular	90.0	4.4

に比べて約 1/5 であり, 副作用もなく安全に投与できる量であると考えられる. 今回投与した 6 例でも BrdU によると思われる副作用は全く認められなかった. しかし, BrdU は血中からは早期に消失する⁵⁾ものの, 細胞内 DNA に取り込まれて長期に残存するために, 使用には慎重を期さなければならないと考える.

BrdU の投与時間と投与後骨髄穿刺までの時間は, 当然ながら LI 算定の目的により異なってくる. Raza ら⁹⁾は 2 時間の点滴静注後に骨髄穿刺を行っているが, この時の LI は 3~11% と報告している. 今回は, one shot で静脈内注射し, 30 分後に骨髄穿刺を行って LI 値を算定したが, 差はみられていない. また, Raza ら⁹⁾は末梢血中の白血病細胞の LI を経時的に観察し, BrdU 点滴開始 5 分後の LI と点滴終了時 (120 分後) の LI にほとんど差は認められなかったと述べている. このようなことから, BrdU は S 期細胞に迅速に取り込まれると考えられ, 細胞回転の解析にはきわめて有用な薬剤であると思われる. 今後 BrdU の代謝も考慮しつつ目的に合った投与方法の検討が必要であろう.

BrdU を使用した際の LI の算定には, flow cytometry 法がよく用いられている. この方法は, 一度に多くの細胞について迅速に算定できる長所を有する半面, 細胞数の少ない検体あるいは目的とする細胞の占める割合の少ない検体では, 不正確な結果しか得られず, また, 細胞個々の形態と LI の対比ができないという欠点もある. このような欠点を補う手段の一つとして, 免疫組織化学的方法を用いて組織学的に観察する方法も検討されている. 今回は, これまで著者ら⁸⁾が開発してきた塗抹乾燥標本を用いての細胞表面抗原検索法を基礎にして, 細胞形態と LI とを同時に観察する方法を検討した. 血液細胞は小型であるために, 細胞がよく伸展した状態で観察する必要があり, 塗抹乾燥標本を用いた. 塗抹乾燥標本下で免疫組織化学的染色を行う場合, 乾燥がきわめて重要である. 本実験では, 骨髄液を塗抹後ただちにドライヤーの冷風を当てて 2 時間以上にわたり乾燥したが, 乾

燥が不十分な場合には染色過程で細胞形態の変形, ひび割れがみられ, 観察に障害となることがあった.

Denaturation を必要としない抗 BrdU 抗体の開発もなされている⁴⁾が, 現在市販の抗体では DNA 内に取り込まれた BrdU と反応させるためには DNA の denaturation が必要である. denaturation には, flow cytometry 法および組織切片では HCl が用いられる. 著者らは当初塗抹乾燥標本染色時に HCl を用いて denaturation を行っていたが全く染まらず, NaOH を用いてはじめて染色可能であった. このような HCl と NaOH による denaturation の差については明らかではない.

抗 BrdU 抗体は約 10 倍に希釈して使用しているが, 反応性は十分と考えられる. 今回は, 抗 BrdU 抗体と BrdU の反応の後, 酸素抗体法間接法を用いて検出した. より感度の高い ABC 法あるいは PAP 法を使用しなかった理由は, 反応が強すぎると核全体が濃く染まりすぎ, このために核の形態および反応の程度つまり BrdU の取り込み量が十分に観察できなくなる危険性があるためである. なお, BrdU の取り込みの有無を判定するのならば, より鋭敏な ABC 法が最も適していると考える.

細胞形態をも同時に観察することを目的として塗抹乾燥標本を用いるのであるから, 後染色はきわめて重要である. 今回は血球の観察によく用いられ, しかも細胞質の染色性の良好なギムザ染色を施した. 後染色で核が濃染すると DAB 染色の褐色調が見分けにくくなり, わずかに BrdU を取り込んだ細胞を陰性と判定する危険性がある. このため本実験では, 一般の血液塗抹標本の染色よりも薄く染色した. 細胞の同定および BrdU 標識細胞の判定は十分に可能であるが, 細胞質内の顆粒などの詳細な観察にはまだ十分とはいえず, 今後さらに鮮明な後染色法の開発を目指して検討を進める予定である.

今回得られた骨髄中の白血病細胞の LI は, 3.0~7.5% と Raza ら^{9,10)}の報告とほぼ同様な値であり, また, ³H-thymidine を直接体内に静脈内注射して, autoradiography 法により算定した LI と類似した結果であっ

た。現在一部の症例では、BrdU を用いた flow cytometry 法との比較を進めているが、両者はよく相関し、十分に臨床に使用できるものとする。

塗抹乾燥標本法は、目的とする細胞の占める割合の少ない low percentage leukemia あるいは, myelodysplastic syndrome などの細胞回転を検討するうえで極めて有用と考えられる。また、今回の実験から BrdU を直接体内に投与し、*in vivo* での LI の算定を行うことも可能であることが確認された。今後両者を組み合わせ、これまで不可能であった疾患あるいは条件下での細胞動態の解析が進むものとする。

Summary

To determine the labeling index (LI) of bromodeoxyuridine (BrdU) on human leukemic cells *in vivo*, six patients with acute leukemia were administered 200 mg/m² of BrdU intravenously prior to chemotherapy. After 30 minutes, bone marrow was aspirated and air-dried smears were made. Each smear was stained immunohistochemically using a monoclonal antibody to BrdU and the LI of leukemic cells was estimated.

Results were as follows :

1. LIs of leukemic cells in bone marrow were 3.0% to 7.5%, almost identical to those calculated using tritiated thymidine or a drip infusion of BrdU *in vivo*. This seems to indicate rapid incorporation of BrdU into S-phase cells, which can be used to analyze cell-cycle kinetics in acute leukemia.

2. BrdU-labeled cells were easily differentiated from unlabeled ones using air-dried smears stained by the indirect immunoenzyme method.

3. In smears counterstained by Giemsa stain, it was possible to identify leukemic cells. However, Giemsa stain did not permit a closer examination of cells.

4. To obtain good specimens, it was essential to dry smears for at least 2 hours.

文 献

- 1) Clarkson, B., et al. : Studies of cellular proliferation in human leukemia. I. Estimation of growth rates of leukemic and normal hematopoietic cells in two adults with acute leukemia given single injections of tritiated thymidine, J. Clin. Invest., 46 : 506~529, 1967.
- 2) Dolbeare, F., et al. : Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80 : 5573~5577, 1983.
- 3) Gratzner, H.G. : Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine : a new reagent for detection of DNA replication, Science, 218 : 474~475, 1982.
- 4) Greipp, P.R., et al. : Immunofluorescent plasma cell labeling indices (LI) using a monoclonal antibody (BU-1), Am. J. Hematol., 20 : 289~292, 1985.
- 5) Kriss, J.P., et al. : The fate of 5-bromodeoxyuridine, 5-bromodeoxycytidine, and 5-iododeoxycytidine in man, Cancer Res., 23 : 260~273, 1962.
- 6) 松谷雅生・他 : 抗 Bromodeoxyuridine モノクローナル抗体による脳腫瘍成長解析法, 医学のあゆみ, 133 : 876~877, 1985.
- 7) 永井政勝・他 : 脳腫瘍における放射線との併用療法の進歩—BAR 療法の遠隔成績を中心に—, 癌の臨床, 22 : 1049~1053, 1976.
- 8) 中村 忍, 小林和美 : 塗抹標本でのリンパ球抗原の分析, 臨床免疫, 19 (Suppl. 12) : 28~35, 1987.
- 9) Raza, A., et al. : Double labeling and *in vitro* versus *in vivo* incorporation of bromodeoxyuridine in patients with acute nonlymphocytic leukemia, Cytometry, 6 : 633~640, 1985.
- 10) Raza, A., et al. : Differences in cell cycle characteristics among patients with acute nonlymphocytic leukemia, Blood, 69 : 1647~1653, 1987.
- 11) 佐々木功典・他 : モノクローナル抗 BrdUrd 抗体を利用した人癌組織の標識率測定法, 病理と臨床, 3 : 565~567, 1985.
- 12) 多田利彦・他 : BrdU (Bromodeoxyuridine) モノクローナル抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討とその臨床応用, 医学のあゆみ, 135 : 510~513, 1985.