

フローサイトメトリーを用いた尿路性器腫瘍の Bromodeoxyuridine (BrdU)/DNA 同時解析法

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

島袋 智之, 吉弘 悟, 松山 豪泰

山本 憲 男, 酒 徳 治三郎

FLOW CYTOMETRIC BROMODEOXYURIDINE (BrdU)/ DNA ANALYSIS

—STUDY WITH UROGENITAL TUMORS—

Tomoyuki SHIMABUKURO, Satoru YOSHIHIRO, Hideyasu MATSUYAMA,
Norio YAMAMOTO and Jisaburo SAKATOKU

From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine

We performed the simultaneous flow cytometric bromodeoxyuridine (BrdU)/DNA analysis in combination with in vitro BrdU labeling method using seven human urogenital tumors.

The DNA content and incorporated BrdU content of each tumor cell was analyzed quantitatively using this flow cytometric method. The cell kinetics of each cell line of heterogeneous tumor could be analyzed by this combined method.

In the near future, by establishing a procedure decreasing non-specific staining of cells, the development of this flow cytometric two-color analysis in clinical fields is expected.

(Acta Urol. Jpn. 35: 1653-1657, 1989)

Key words: Urogenital tumor, Flow cytometry, BrdU/DNA analysis

緒 言

癌を最も特徴付けているのは、抑制を欠いた旺盛な増殖能である。それゆえ個々の癌の増殖能を知ること、その生物学的悪性度を知ることであり、また適切な治療法を選択する際の欠かせぬ情報である。われわれはすでに、in vitro bromodeoxyuridine (BrdU) 標識法と抗 BrdU 抗体を用いた細胞動態解析法が、迅速かつ簡便に個々の癌の増殖能を評価しえるため、きわめて有用性に富んでいることを報告してきた^{1,2)}。しかしながら、本法は光学顕微鏡下に多数の癌細胞を数えなければならず、また DNA 量の評価ができないという短所があった。そこで個々の癌の標識率 (LI) と DNA 量を同時に測定することが可能であれば、えられる情報量は飛躍的に向上することが期待できる。

本稿では、手術的に摘出された尿路性器腫瘍を用い、その標識率と DNA 量を同時に測定し解析する flow cytometry (FCM) を用いた方法を紹介し、併せて行った免疫組織化学的方法にてえられた結果と比

較検討したので報告する。

対象および方法

対象は手術的に摘出された尿路性器腫瘍 7 例である。その内訳は、膀胱腫瘍 3 例、尿管腫瘍 3 例、悪性リンパ腫 1 例であり、年齢分布は 11~72 歳、男性 6 例、女性 1 例であった。膀胱腫瘍は 3 例とも移行上皮癌であり、いずれも組織学的分化度は grade 2 であった。尿管腫瘍は移行上皮癌 2 例、扁平上皮癌 1 例であり、移行上皮癌の分化度は grade 1 と 3 が 1 例ずつ、扁平上皮癌は grade 2 であった。悪性リンパ腫は diffuse large cell type であった。

方法の概略を Fig. 1 に示した。すなわち、摘出された腫瘍組織を冷却 PBS 中にいれ、速やかに研究室に運搬した。PBS にて軽く洗浄後間質組織や壊死組織を除去し、メスの刃を用いて 1 mm³ 角に細切したあと、すでに報告した in vitro BrdU 標識法¹⁾を行った。この一部を用いて免疫組織化学的方法 (ABC 法)³⁾を行ない、2000 個の腫瘍細胞を観察し標識細胞

の割合(標識率)を算出した。一方残りの組織は0.05%collagenase液を用いて細胞分散を行ない、冷70%ethanol液にて固定し、すでに報告⁹⁾したごとく免疫蛍光二重染色したあと、FCMを用いて測定した。

フローサイトメーターはEPICS 753(Coulter Electronics Inc. USA)を用いて行い、データ解析はFCMに内蔵するプログラムにしたがって二次元座標上で行った。

結 果

代表的症例の免疫組織化学的染色像とFCM三次元像をFig. 2と3に示した。すなわち、BrdUを取り込んだDNA合成期細胞の核は、褐色に明瞭に染

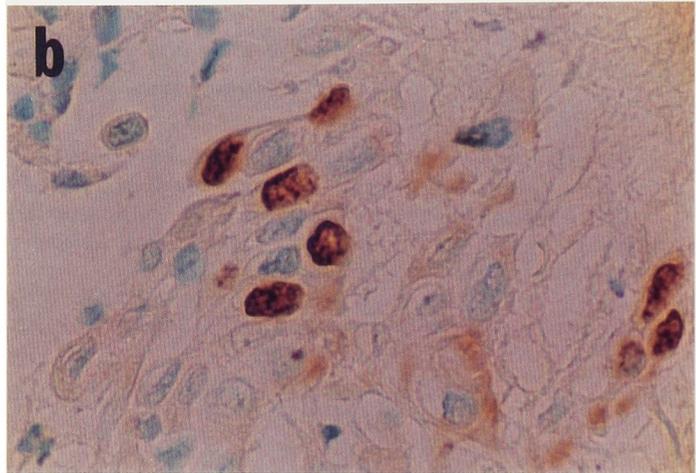
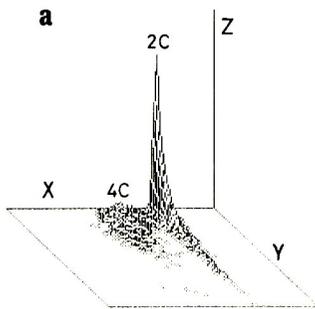
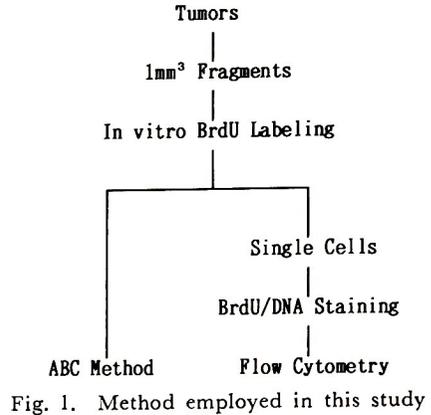


Fig. 2. A three-dimensional cytogram (a) and photomicrograph of immunohistochemically stained section of squamous cell carcinoma of the right ureter (b, $\times 400$). The BrdU/DNA cytogram is shown with DNA content on the X axis, BrdU content (log) on the Y axis, and frequency on the Z axis. Note the DNA diploid pattern (a) and the DNA synthesizing cells with dark nuclei (b).

まっており、光学顕微鏡下に容易に同定できた(Fig. 2b, 3b)。FCM像では G_0/G_1 期の細胞と G_2/M 期の細胞がよく区別されており、その間にY軸方向に延びるS期の細胞を認めえる(Fig. 2a, 3a)。Fig. 4には膀胱移行上皮癌、G2症例のFCM三次元像とDNAヒストグラムを示した。Fig. 2, a 3aで示した症例のFCM像とは異なり、この症例は図上に示した2Cと3C部にそれぞれの G_0/G_1 期を有する、2つの細胞集団から成り立ったheterogeneous tumorであることが分かる。すなわち、ふたつの細胞集団が組み合わさった形をとっているため、S期細胞の分布は不明瞭になり、細胞周期各期の解析には困難さが伴った。Table 1は、免疫組織化学的方法(ABC法)とFCM法にて求めた標識率を示したものである。ABC法で

求めたLIは $8.98 \pm 3.75\%$ (mean \pm S.D.)であるのに対し、FCM法では $6.70 \pm 2.61\%$ と低い値となった。各測定値ともFCM法に比べABC法による肉眼的計測値が高くなる傾向があり、平均で $2.28 \pm 1.57\%$ 高くなっていた(Table 1)。

考 察

以前より癌細胞のDNA量を測定し、その正常細胞DNA量との比較からDNA indexをもとめ、悪性度の指標とする試みがなされてきた^{4,5)}。とくにホルマリン固定検体からのDNA量測定方法が報告^{6,7)}されてからは、retrospectiveな評価が可能となったせいもあり、盛んに研究されるようになってきた。その結果、DNA indexは個々の癌の悪性度を

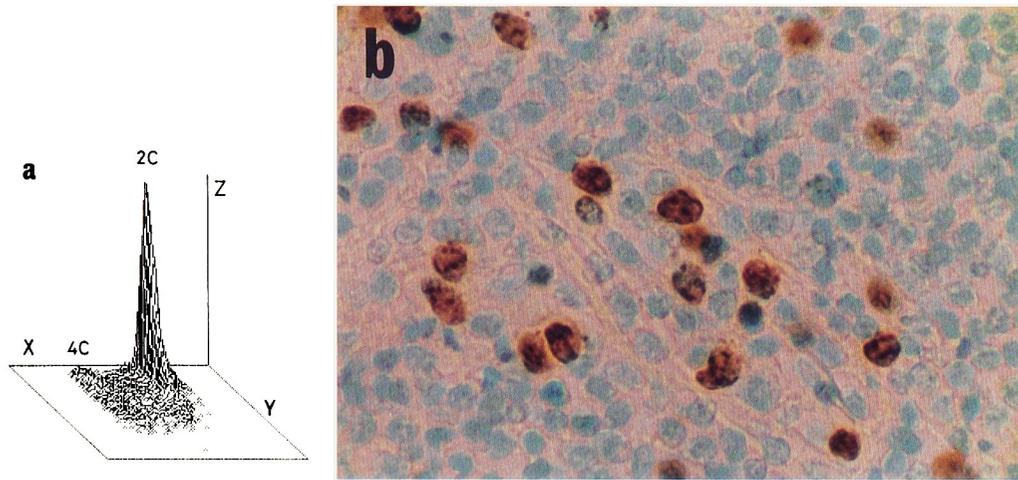


Fig. 3. A three-dementional cytogram (a) and photomicrograph of immunohistochemically stained section of malignant lymphoma of the left testis (b, $\times 400$).

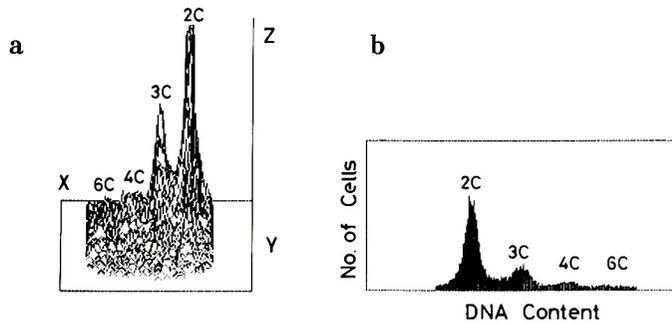


Fig. 4. A three-dimensional cytogram (a) and DNA distribution histogram (b) of transitional cell carcinoma of the bladder (grade 2). Note the DNA aneuploid pattern (b).

Table 1. Pathological findings, age/sex and cell kinetic data obtained from ABC method and flow cytometric method

Pathological type	Age/Sex	LI (%)		
		ABC Method	FCM	Δ LI
Bladder tumor	TCC, G2 72/F	8.3	5.3	3.0
	TCC, G2 71/M	10.2	8.1	2.1
	TCC, G2 65/M	12.2	9.5	2.7
Ureteral tumor	TCC, G1 62/M	3.1	2.2	0.9
	TCC, G3 63/M	9.6	8.0	1.6
	SCC, G2 69/M	14.0	8.8	5.2
Malignant Lymphoma	Large cell 11/M	5.5	5.0	0.5
		8.98 \pm 3.75	6.70 \pm 2.61	2.28 \pm 1.57

客観的に推測しえる指標となりえることが示唆された^{8,9)}。

最近抗 BrdU 抗体や Ki-67 抗体などを用い、新たな面から癌の増殖能を捉えようとする研究報告が増加してきた^{1,2,10,11)}。われわれもすでに尿路性器腫瘍20例を対象にして、免疫組織化学的にその細胞動態を解析し、悪性度が増すにつれ増殖期にあるS期細胞の比率を示すLIは有意に増加するという報告を行ってきた²⁾。

したがって、癌細胞のDNA量と増殖能を示すLIを同時に評価できれば、さらに詳しい情報になりえることが期待される。このような見地からわれわれは、FCMを用いたBrdU/DNA同時測定法の培養細胞を用いた検討結果はすでに報告²⁾してきたが、この方法を手術的に摘出した臨床検体に応用するのにはいくつかの問題点を克服しなければならなかった。すなわち、a) BrdUは変異誘発剤であり人体内に直接投与するには倫理的に問題が残るので、いかにして安全で再現性の高い標識法を確立するか。b) 非特異的染色をできるだけ減らし、二次元座標上での解析をいかにして容易にするか。というふたつの問題点である。a) に関しては *in vitro* BrdU 標識法を用いることにより、体外で安全かつ正確に測定できることを報告してきた¹⁾。b) に関してもペプシンを用いた裸核化法を組合せることにより、非特異的染色を減少させえることを報告した¹²⁾。

あえて培養細胞でのBrdU/DNA測定法をそのまま臨床検体に応用した今回の結果から、このFCMを用いる同時解析法を用いれば、個々の癌の標識率とDNA量を同時に解析できることを示している(Fig. 2, 3, 4)。しかしながらTable 1に示すごとく、免疫組織化学的にもとめたLIとFCM法にてもとめたLIは完全には一致していない。この理由として、(1) 免疫組織化学的にLIをもとめる際には比較的標識細胞の多い領域をカウントしたこと、(2) 培養細胞を用いた時とは異なり、二次元座標上でのS期とG₁期ならびにG₂M期との境界が非特異的細胞染色のため不明確になり、解析が困難になったこと、(3) カウントとする細胞数の差などが考えられるが、主たる理由は(2)によるものである。この欠点を克服するためひとつの方策として、蛋白分解酵素を用いた裸核化法を組合せたBrdU/DNA同時解析法が挙げられる¹²⁾。

このFCM法によるBrdU/DNA同時解析法の長所で特筆すべきことは、腫瘍組織を構成する複数の細胞集団を検出でき、さらにそれぞれの細胞集団の細胞

動態を別個に解析できる可能性を有していることである。腫瘍組織が不均一性(heterogeneity)を呈していることは良く知られていることであるが、それぞれの細胞集団によって生物学的悪性度も当然異なっていることが推測される。最近の報告では、腫瘍を構成する細胞集団の中で転移巣を形成し易いものとそうでないものもあることが示唆されている¹³⁾。したがって、腫瘍組織を構成する個々の細胞集団の細胞動態を迅速に解析できれば、旺盛な増殖能を有する細胞集団の割合やどの集団がより高い浸潤・転移能を有するかの推測に役立たせることができる。今後さらに症例を重ねて検討していきたい。

結 語

Flow cytometry (FCM)を用いた bromodeoxyuridine (BrdU)/DNA 同時解析法を尿路性器腫瘍7例に応用し、免疫組織化学的方法にて得られた解析結果と比較検討した。BrdU 標識法は、*in vitro* 法を用いた。

1) FCM法にて個々の腫瘍のDNA量と取り込まれたBrdU量を迅速に同時測定できた。

2) Heterogeneityを有する腫瘍組織の細胞動態を各細胞集団毎に解析可能なことが示唆された。

今後非特異的染色を減らす方法を確立することにより、このFCM法の臨床分野での発展が期待できる。

文 献

- 1) 島袋智之, 山本光孝, 三井 博, 清水功基, 山本憲男, 酒徳治三郎, 村上知之: *In vitro* BrdU 標識法と抗 BrdU 抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討. *Oncologia* **21**: 93-100, 1988
- 2) 島袋智之, 山本光孝, 三井 博, 山本憲男, 酒徳治三郎, 原田宏行, 佐長俊昭: *In vitro* BrdU 標識法と抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた尿路性器腫瘍の細胞動態学的研究. *泌尿紀要* **35**: 1285-1290, 1989
- 3) 島袋智之: Flow cytometryによる Bromodeoxyuridine (BrdU)/DNA 同時解析法の応用. 1. その基礎的・技術的検討. *泌尿紀要* **34**: 1339-1348, 1988
- 4) Tetu B, Katz RL, Kalter SP, Eschenbach AC and Barlogie B. Acridine-orange flow cytometry of urinary bladder washings for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* **60**: 1815-1822, 1987
- 5) 那須啓人, 篠原陽一, 林田重昭, 川井修一, 酒徳治三郎: 膀胱腫瘍の flow cytometry による分析—臨床応用の可能性—フローサイトメトリー **6**: 17-22, 1987
- 6) 山本光孝, 島袋智之, 三井 博, 山本憲男, 酒徳治三郎. ホルマリン固定パラフィンブロックを用

- いた FCM による DNA 解析の為の検体処理法の基礎的検討. フローサイトメトリー 6: 11-16, 1987
- 7) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA and Musgrove EA: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31:1333-1335, 1983
 - 8) Hedley DW, Friedlander ML and Taylor IW: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 6: 327-333, 1985
 - 9) Rainwater LM, Hosaka Y, Farrow GM and Lieber MM: Well differentiated clear cell renal carcinoma: significance of nuclear deoxyribonucleic acid patterns studied by flow cytometry. *J Urol* 137: 15-20, 1987
 - 10) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475, 1982
 - 11) Gerdes J, Schwac U, Lemke H and Stein, H: Production of mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20, 1983
 - 12) 鳥袋智之, 山本光孝, 吉弘 悟, 松山豪泰, 山本憲男, 酒徳治三郎: Flow cytometry による Bromodeoxyuridine (BrdU)/DNA 同時解析法—固形腫瘍を用いた基礎的検討—フローサイトメトリー 8: 102-109, 1988
 - 13) Kang Fan: Heterogeneous subpopulation of human prostatic adenocarcinoma cells: potential usefulness of P21 protein as a predictor for bone metastasis. *J Urol* 139: 318-322, 1988

(1989年2月6日受付)