

フローサイトメトリーを用いた BrdU/DNA 二重染色法による細胞動態の解析

—制癌剤感受性試験への応用の可能性について—

厚生連村上病院泌尿器科（指導：新潟大学泌尿器科 佐藤昭太郎教授）

渡 部 忠 男

Flow Cytometric Analysis of Cell Kinetics by Means
of BrdU/DNA Double Staining Method

—Study to Apply as a Chemosensitivity test—

Tadao WATANABE

Department of Urology, Koseiren Murakami Hospital

(Director: Prof. Shotaro SATO)

In the present study, availability of double staining of BrdU/DNA for chemosensitivity test was examined using human urinary bladder cancer cell line (NBT-2) and several types of anti-cancer drugs; adriamycin (ADM), carboquone (CQ), mitomycin C (MMC), fluorouracil (5-FU), and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP). When tumor cells were treated with 5-FU and MMC but not the other anti-cancer drugs, the change of S, G₂M, S₀ were correlated with the results of the regrowth assay method which was previously described as chemosensitivity test. These results suggest that BrdU/DNA double staining method might be applied to anti-cancer drug sensitivity test on 5-FU and MMC.

Key words: flow cytometry, BrdU/DNA double staining method, chemosensitivity test

フローサイトメトリー, BrdU/DNA 二重染色法, 感受性試験

緒 言

癌化学療法の治療効果を高めるために種々の制癌剤感受性試験が行われてきたが、いずれも一長一短があり、現在のところ一般的に用いられ得る、確立された方法はない。最近フローサイトメトリー（FCM）を応用し、瞬時に大量の細胞を分析し、細胞動態の解明、さらには

制癌剤感受性試験に応用しようとの試みがなされているが¹⁾²⁾、細胞周期の分析には数学的処理が行なわれてきたため、制癌剤処理等によって DNA 分布の偏りが生じた場合の補正は困難であった³⁾。しかし DNA 合成期に Thymidine のアナログとして取り込まれる Bromodeoxyuridine（以下 BrdU）に対するモノクローナル抗体が開発されてからは、より正確に S 期の細胞の同

Reprint request to: Tadao WATANABE,
Department of Urology, Koseiren Murakami
Hospital, Murakami 958, JAPAN.

別刷請求先: 〒958 村上市田端町2-17
厚生連村上病院泌尿器科

渡 部 忠 男

定が可能となり詳細に細胞動態の解明が可能となった⁴⁾
5)6)。一方これまでの制癌剤感受性試験としては再増殖
測定法があり⁷⁾⁸⁾⁹⁾、新潟大学泌尿器科学教室でも膀胱
癌より樹立した腫瘍細胞株 NBT-2¹⁰⁾を用いて検討を
行ってきた¹¹⁾。またその結果に基づいた膀胱腫瘍に対
するプロトコールを作製し、実際の臨床における化学療
法に応用してきた¹²⁾。今回の検討では FCM を用いた
制癌剤感受性試験の可能性につき検討するため、NBT-
2 に対する各種制癌剤の細胞回転に対する影響について
BrdU/DNA 二重染色を行い、細胞周期比率分布の変化
と増殖曲線を求め、その結果と再増殖測定法との結果に
付き比較検討した。

材料及び方法

使用した腫瘍細胞株は膀胱移行上皮癌由来の NBT-2
で新潟大学医学部泌尿器科にて樹立し、継代培養してい
るものである¹⁰⁾。制癌剤として Adriamycin (以下 ADM),
Carboquone (以下 CQ), Mitomycin-C (以下 MMC),
Fluoro-uracil (以下 5-FU), Cis-diammine-dichloropla-
tinum (以下 CDDP) の 5 剤を用いた。腫瘍細胞の培
養は 10% 子牛胎児血清加 RPMI-1640 に硫酸ストレプ
トマイシンを 100 r/ml, 結晶ペニシリン G カリウムを
100 u/ml 添加した培養液を用い、5% 炭酸ガスを加え
37℃で培養した。

まず予備実験で対数増殖期にある細胞に各制癌剤を種々
の濃度で作用させ増殖が軽度抑制される濃度を求めた。
その濃度を中心に各制癌剤濃度を表 1 のように設定し
た。次いで対数増殖期にある細胞にそれぞれの濃度の制
癌剤を 24 時間、48 時間、72 時間持続接触させた後、細胞
を集め、細胞数を数えた。細胞はプラスチックボトルに
1×10⁵/ml の濃度で培養した。BrdU/DNA 二重解析は
Dolbear らの方法¹³⁾に従った。すなわち BrdU を 5
μg/ml の濃度で pulse label し、細胞を集め、PBS で
2 回洗浄後、冷 70% エタノールを 5-10 ml 滴下し、4
℃に 30 分以上放置して固定した。PBS にて洗浄した後

細胞に 4N-HCl を滴下して DNA の変性を行ない、0.1
M-sodium tetra-borate を加えて中和した。次に細胞
を 0.5% tween 20 含有 PBS に懸濁させ、FITC 標
識抗 BrdU 抗体 (Becton Dickinson) を加え暗所室温
で 20 分反応させた。遠心洗浄後 5 μg/ml の PI 溶液を
加え 10-15 分間 4℃暗所に放置した (図 1)。FCM 解
析は日本分光社製の FCS-1 セルソーターを用い、蛍光
量の測定は 488 nm のアルゴンイオンレーザーで励起
し、FITC の緑色蛍光を 520 nm band pass filter で、
PI の赤色蛍光を 600 nm band pass filter で同時に測
定した。データは MP-1622 マイクロコンピュータ
(三菱電機製) に記録し分析した。

細胞周期の各期の割合は BrdU/DNA スキャッター
グラム上に G₀ G₁ 期, G₂M 期, S 期, S₀ 期 (S 期の

- 1 BrdU による pulse label 5 μg/ml 37℃で 30 分
- ↓
- 2 冷却遠沈後 PBS で 2 回洗浄
- ↓
- 3 冷 70% ethanol で固定
- ↓
- 4 PBS で洗浄後 4N-HCl で DNA の変性
- ↓
- 5 0.1 M-sodium tetraborate で中和
- ↓
- 6 0.5% tween 20 含有 PBS に懸濁後 FITC 標識抗 BrdU 抗体を加え暗所室温 20 分
- ↓
- 7 PBS で洗浄後 50 μ のナイロンメッシュを通す
- ↓
- 8 5 μg/ml の PI 溶液を加え冷暗所 15 分
- ↓
- 9 FCM による解析

図 1 BrdU/DNA 二重染色法

表 1 制 癌 剤 濃 度 (γ/ml)

ADM	0.01	0.025	0.05	0.075	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0
CQ	0.001	0.0025	0.005	0.0075	0.01	0.025	0.05	0.075	0.1
MMC	0.01	0.025	0.05	0.075	0.1	0.15	0.2	0.25	
5-Fu	1	5	10	20	25	50	75	100	200
CDDP	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0	10.0	

*それぞれに薬剤を付加しない対照もとった

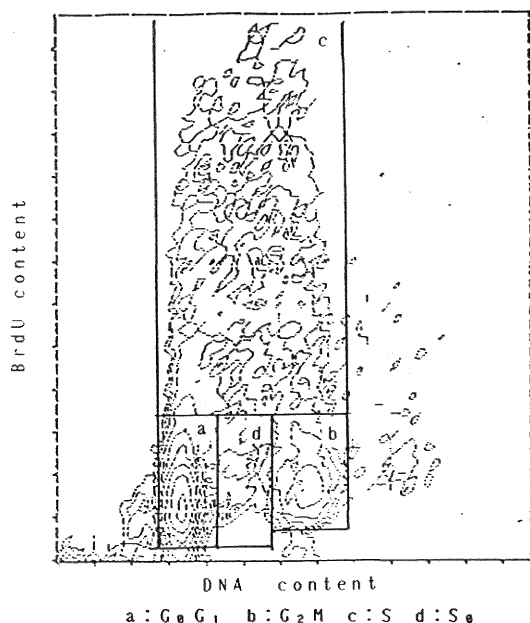


図 2 無処置の BrdU/DNA スキャッターグラム

DNA 量を持つが BrdU に標識されない細胞) のゲートを設けてその中に含まれる細胞数の全細胞に対する割合として求めた。(図 2) 20,000 個の細胞を数えた。細胞増殖曲線は、トリパンブルー染色法を用いて生細胞数を求めて作成した。

結 果

ADM, CQ, MMC, 5-FU, CDDP の順に結果を述べる。

ADM: 図 3-5 にそれぞれ24時間後、48時間後、72時間後の増殖曲線及び細胞周期の変化を示す。24時間での 0.01-0.5 γ , 48時間での 0.05-0.1 γ , 72時間での 0.025-0.05 γ , 0.1-0.25 γ , 0.75-1.0 γ で S 期比率が増加し、24時間での 0.025-0.05 γ , 48時間での 0.05-0.1 γ , 72時間での 0.075 γ 以上で G₂M 比率が増加していた。

CQ: 図 6-8 に結果を示す。24時間での 0.0025-0.025 γ , 48時間での 0.005-0.075 γ , 72時間では 0.0075 γ 以上で S 期比率が増加していた。

MMC: 結果を図 9-11 に示す。24時間での 0.001-0.025 γ , 48時間での 0.01-0.25 γ , 72時間での 0.01-0.1 γ , 0.2-0.25 γ で S 期比率が増加していた。

5-FU: 結果を図 12-14 に示す。24時間、48時間、72時間の 75 γ 以上で S 期比率が減少し、どの時間濃度

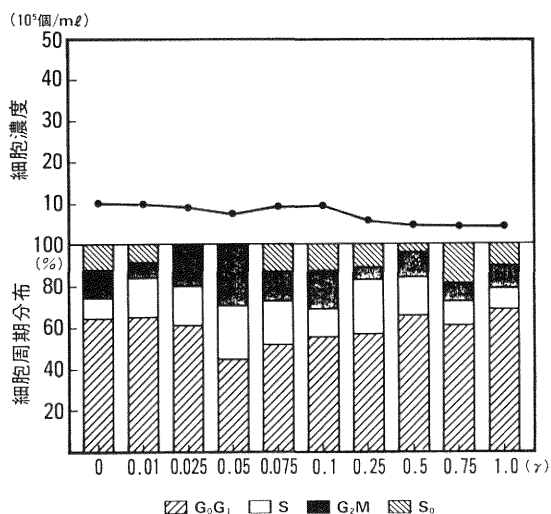


図 3 増殖曲線と細胞周期分布 (ADM 24時間後)

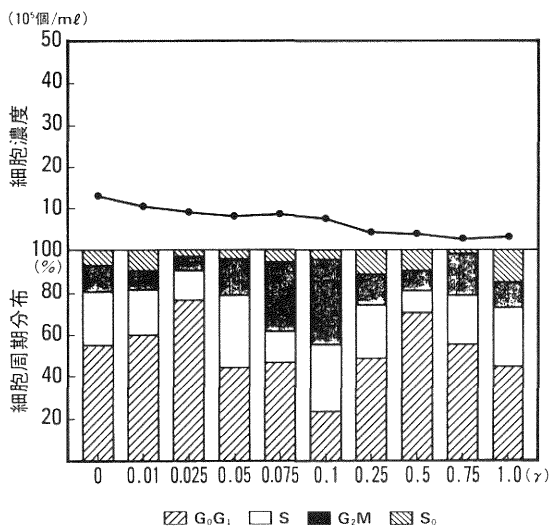


図 4 増殖曲線と細胞周期分布 (ADM 48時間後)

でも G₂M の比率が減少している。

CDDP: 結果を図 15-17 に示す。24時間の 0.1-5.0 γ と48時間の 0.1-2.0 γ で S 期比率が増加した。72時間では S 期比率の乱れがみられ24時間の 1.0 γ 以上で G₂M が減少している。

これらの結果についてそれぞれの抗癌剤のコントロールと各濃度群間に S 期, G₂M 期, S₀ 期比率の変化(乱れ)を伴うのか否かを Friedman 検定により検討し

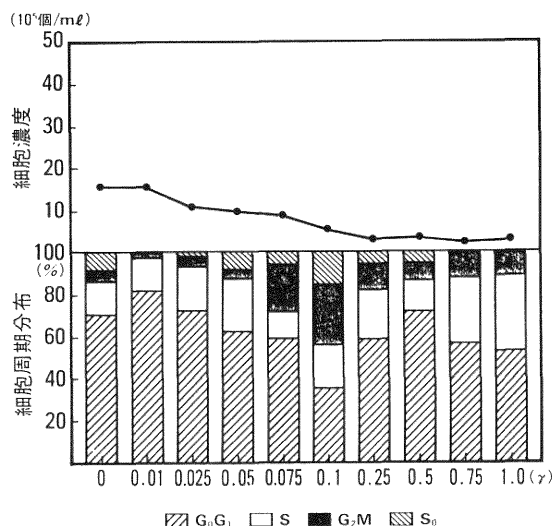


図5 増殖曲線と細胞周期分布 (ADM 72時間後)

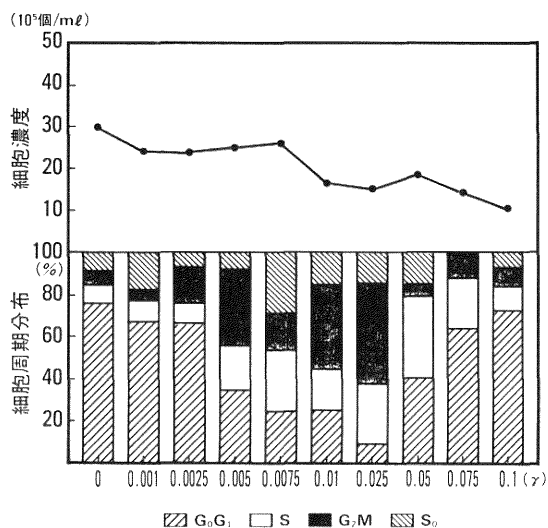


図7 増殖曲線と細胞周期分布 (CQ 48時間後)

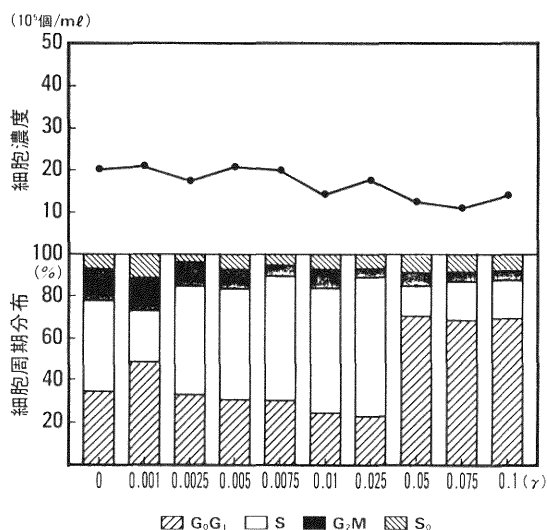


図6 増殖曲線と細胞周期分布 (CQ 24時間後)

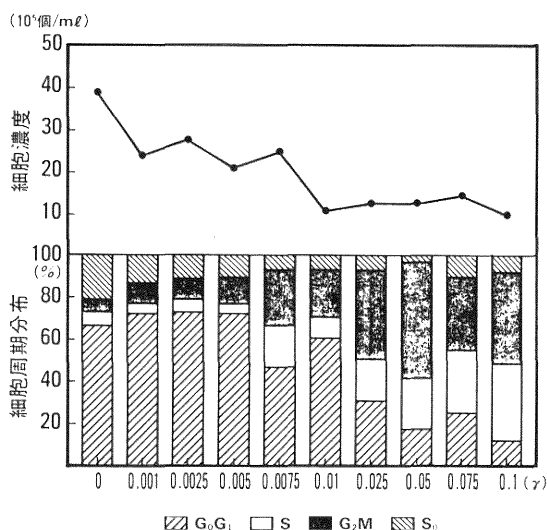


図8 増殖曲線と細胞周期分布 (CQ 72時間後)

てみたが、有意の差は検出されなかった。次に Page 検定により S, G₂M, S₀ 期比率の減少傾向に濃度依存性があるか否かを検討してみたところ 5-FU では濃度作用時間に依存して (S, G₂M, S₀ 期の細胞の) 減少傾向が認められ (48時間で $p=0.01$, 72時間で $p=0.03$), また MMC 48時間でも同様の傾向が認められた ($p=0.04$)。ADM, CQ, CDDP では有意の差は検出されなかった。

考 案

泌尿器科領域では尿路上皮腫瘍に対する化学療法の効果は高いとの報告が多い一方、患者の年齢が高いためその副作用が問題になっている。感染症に対しては、細菌の同定を行い、それに対する感受性試験の結果から使用する薬剤を決定するのは臨床上一般的である。癌化学療法においても同様の感受性試験を行なうことができれば、

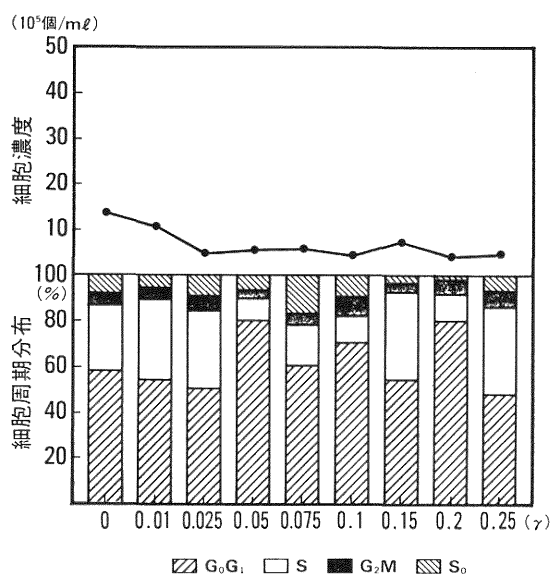


図 9 増殖曲線と細胞周期分布 (MMC 24時間後)

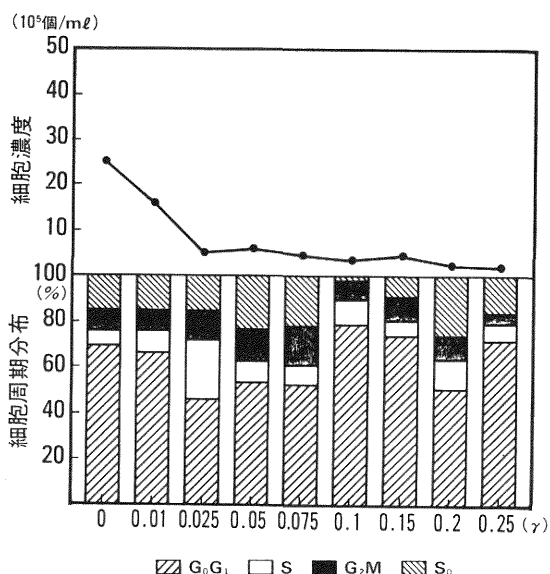


図11 増殖曲線と細胞周期分布 (MMC 72時間後)

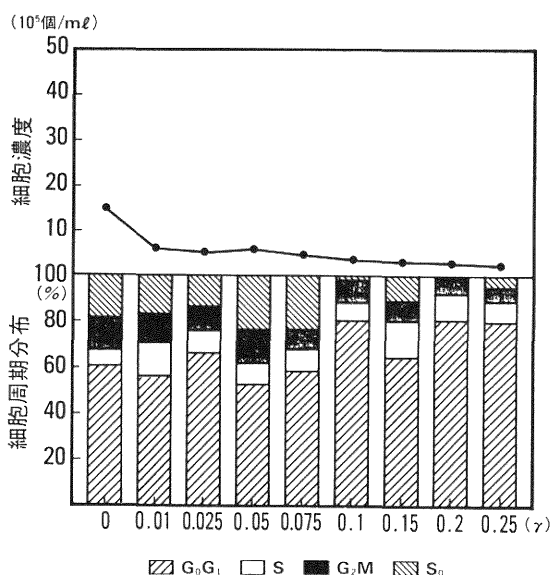


図10 増殖曲線と細胞周期分布 (MMC 48時間後)

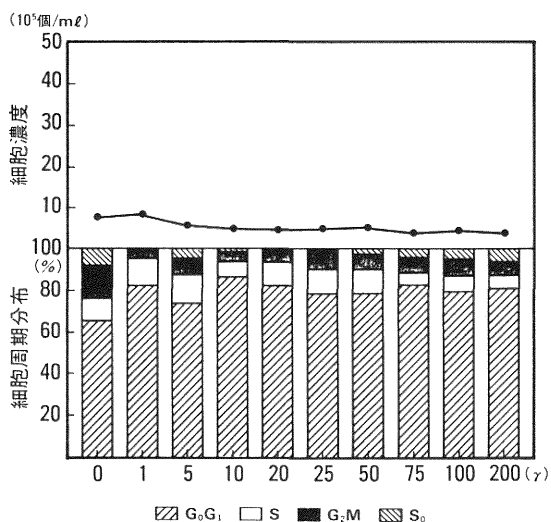


図12 増殖曲線と細胞周期分布 (5-FU 24時間後)

予め効果の期待できない薬剤をのぞくことによって副作用の軽減をはかることが可能となり、より効果的な治療ができると考えられる。これを目的として今までに様々な方法が試みられてきた。しかしこれまでの制癌剤感受性試験は、再現性に乏しい、時間と費用がかかるといった理由で一般臨床に応用するには必ずしも満足できるも

のではなかった。FCM は短時間に大量の細胞を分析することを可能であり、細胞回転についても1981年 Gratzner が BrdU に対するモノクローナル抗体を開発してからより詳細にS期の同定が可能となった¹⁴⁾¹⁵⁾。関口らの NBT-2 を用いた再増殖測定法による検討では、臨床係数では ADM, CQ, 5-FU, CDDP, MMC, Ni-

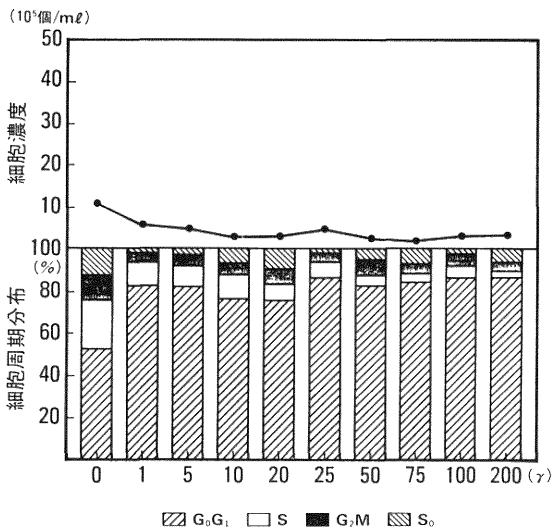


図13 増殖曲線と細胞周期分布 (5-FU 48時間後)

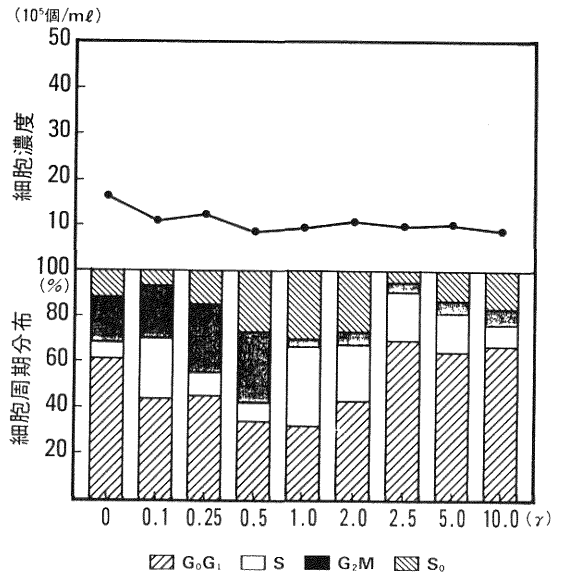


図15 増殖曲線と細胞周期分布 (CDDP 24時間後)

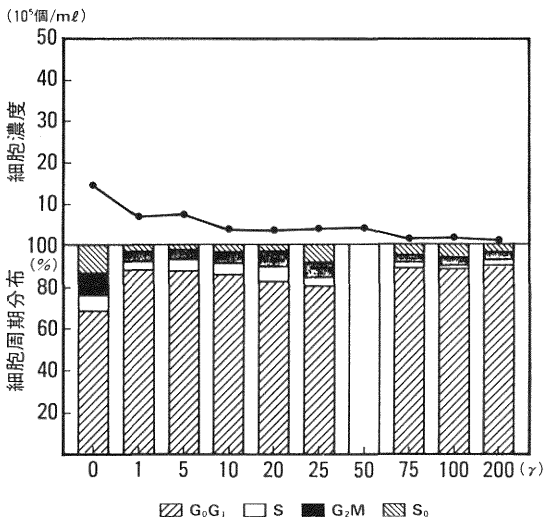


図14 増殖曲線と細胞周期分布 (5-FU 72時間後)

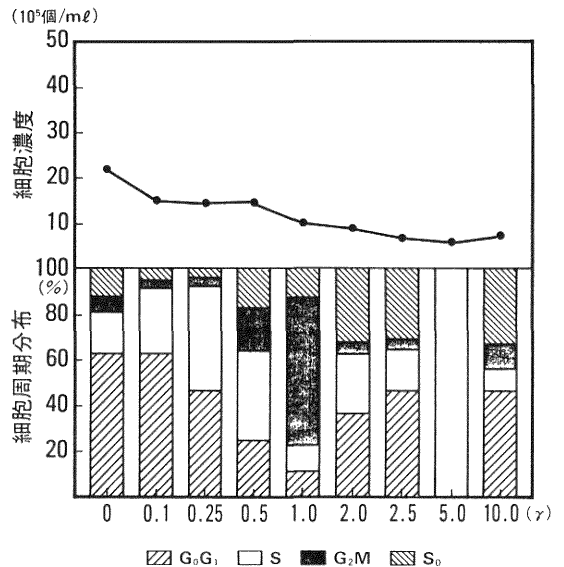


図16 増殖曲線と細胞周期分布 (CDDP 48時間後)

mustine hydrochloride (以下 ACNU) の順に効果を示し、また副作用係数では ACNU が高値を示していた¹¹⁾。今回、FCM と BrdU モノクローナル抗体を用いた BrdU/DNA 二重解析法を行なった結果、検討した ADN, CQ, MMC, 5-FU, CDDP のうち 5-FU については再増殖測定法と今回の増殖曲線の結果が一致

し、本方法は応用可能と考えられた。また MMC に関しても同様の傾向が認められ本方法応用の可能性は充分考えられるもののなんらかの改良が必要であろう。5-FU には直接 DNA 複製を障害し S 期を阻害する経路と RNA 合成を阻害する経路が考えられている¹⁶⁾。MMC は NADPH 依存性の還元酵素あるいは非酵素的に還元

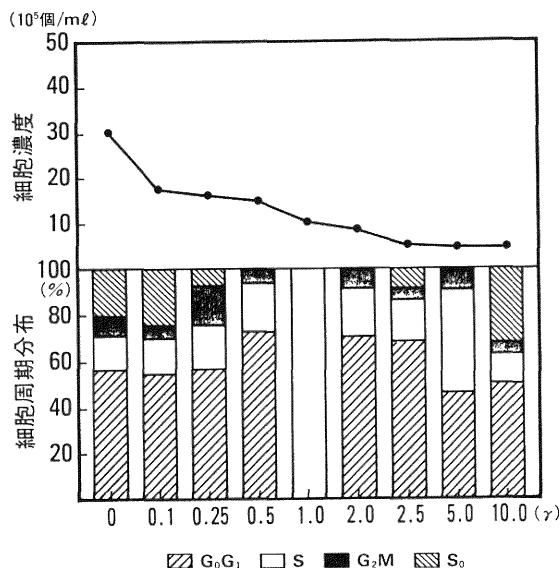


図17 増殖曲線と細胞周期分布 (CDDP 72時間後)

され DNA-DNA 架橋形成により2本鎖 DNA の開裂を妨げるとされ、同時に DNA 鎖の切断作用も認められる¹⁶⁾。こうした MMC の作用機序に関しては正常細胞の巻添えや分裂した細胞、G₀ G₁ に対する作用なども考えられ、結果として代謝を乱れさせているような感じを受ける。

一方、ADM, CQ, CDDP については再増殖測定法及び今回の増殖曲線と臨床効果とは必ずしも一致せず、この実験系では解析不能と考えられる。再増殖測定法で最も効果の高かった ADM, CQ では S, G₂M, S₀ 期阻害は今回認められなかった。泌尿器科領域における癌化学療法上最も高い効果を有する制癌剤の1つである CDDP でも同様であった。塚越¹⁷⁾によれば、ADM は DNA と結合するのが比較的速く、結果として DNA 依存性 DNA および RNA 合成の抑制をおこすといわれている。しかし今回の検討では明確な DNA 阻害としては検出されなかった。また CQ は全細胞周期にある細胞に対して作用するのが特徴であり、濃度依存性に効果が高まるといわれる¹⁷⁾が ADM と同じく今回 S, G₂M, S₀ 期阻害を認めなかった。CDDP の作用はアルキル化剤のそれと似ており、DNA の2本鎖の間に本剤による橋状結合が生じた場合最も細胞障害作用が強いという¹⁷⁾。血中や組織中では蛋白質や DNA 等と結合し、結合型として蓄積されると報告されている¹⁷⁾。今回の in vitro の実験では充分にこれらの作用を反映することは

できなかった。

今回我々は使用しなかったが、尿路上皮腫瘍に効果の期待できる制癌剤として、Methotrexate (以下 MTX) がある。増田ら (1991 年; 第79回日本泌尿器科学会総会予稿集演題番号 280) は膀胱癌細胞株である KU-1 に MTX を作用させフローサイトメトリー法による BrdU/DNA 二重解析法を行い、S 期インデックスと殺細胞効果が良好に相関したと報告し、本法が今後制癌剤感受性試験の有力な方法となりうることを示唆した。今回の検討からも 5-FU と MMC については本法ないしなんらかの改良法による制癌剤感受性試験が可能ではないかと考えられる。

結 論

新潟大学医学部泌尿器科で樹立した膀胱癌細胞培養株である NBT-2 に制癌剤 (ADM, CQ, MMC, 5-FU, CDDP) を作用させ増殖曲線を求めると共に、BrdU/DNA 二重解析を行なった。ADM, CQ, CDDP については S, G₂M, S₀ 期阻害と増殖曲線の結果が一致せず本法のみにて感受性を推定するのは困難と思われた。5-FU, MMC については本法と増殖曲線の結果により本法が制癌剤感受性試験として応用し得ることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った佐藤昭太郎教授に深謝致します。また本研究に終始御協力御助言を戴いた新潟大学歯学部予防歯科講師小黒章博士ならびに同第一口腔外科陳瑞彬博士に感謝致します。

(本研究は文部省科学研究費補助金 (一般研究 C・課題番号 62570719) の援助を受けたことを付記する。)

参 考 文 献

- 1) 池田正典: 制癌剤感受性ならびに化学療法効果の予知に関する基礎的研究. 近畿大医誌, 10: 281~297, 1985.
- 2) Wustrow, T.P.U., Raffael, A. and Valet, G.: Multiparametric flow cytometry of human squamous cell carcinoma lines from the head and neck, Otolaryngol. Head. Neck. Surg., 98: 552~557, 1988.
- 3) 酒井文彦, 伊奈浩一, 円入克介: Cell Cycle Analysis における数学的方法と抗 BrdU 抗体法との

- 比較. 関西フローサイトメトリー研究会機関誌, **3**: 11~15, 1985.
- 4) 佐々木功典, 村上知之, 荻野哲朗, 高橋 学: 抗 BrdUrd 抗体を用いた Cell Cycle の解析. 関西フローサイトメトリー研究会機関誌, **3**: 29~32, 1985.
- 5) 野村和弘, 松岡浩司, 渋谷壮一郎, 渡辺 卓, 中村治, 高倉公朋: BrdU 単一抗体を用いた Flow cytometry による悪性脳腫瘍の化学療法への応用. 癌と化学療法, **14**: 668~673, 1987.
- 6) 辻 義明: フローサイトメトリーを用いた bromodeoxyuridine 標識による細胞動態の解析. 日癌治会誌, **26**: 569~578, 1991.
- 7) 山下正徳, 田中和彦, 木村喜代二: 人がん細胞培養株の薬剤感受性度—再増殖試験 (regrowth assay) による薬剤感受性度測定とその意義. 癌の臨床, **25**: 75~83, 1979.
- 8) 鈴木利光, 本山悌一: 人癌培養細胞株の in vitro 薬剤感受性検定法の吟味とその応用. 組織培養, **6**: 465~472, 1980.
- 9) 本山悌一, 鈴木利光: 人癌培養細胞の in vitro 薬剤感受性試験 第1報 再増殖測定法の適応と限界. Chemotherapy, **28**: 142~147, 1980.
- 10) 山本尊彦: ヒト膀胱癌細胞培養株 (NBT-2) の樹立とその性状. 日泌尿会誌, **70**: 351~357, 1979.
- 11) 関口 浩: 培養ヒト膀胱癌細胞株による制癌剤感受性試験. 日泌尿会誌, **74**: 25~31, 1983.
- 12) 中村 章, 大沢哲雄: 浸潤膀胱癌に対する根治的膀胱全摘術後の補助化学療法について—Doxorubicin hydrochloride と Carboquone の併用—. 臨床泌尿器科, **40**: 831~834, 1986.
- 13) Dolbeare, F.A., Gratzner, H.G., Pallavicini, M.G. and Gray, J.W.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxy-uridine, Proc. Natl. Acad. Sci., **80**: 5573~5577, 1983.
- 14) Gratzner, G.H. and Leif, R.C.: An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry, Cytometry, **1**: 385~389, 1981.
- 15) Gratzner, G.H.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science, **218**: 474~475, 1982.
- 16) 井上雄弘, 小川一誠: 抗癌剤の分類と作用機序. medicina, **26**: 214~219, 1989.
- 17) 塚越 茂: 化学療法—化学療法剤とその薬理学—. 日本臨床, **46**: 147~152, 1988.

(平成3年10月28日受付)