Studies on the Cell Cycle Kinetics of Cells in Acute Leukemias : Flow Cytometric Analysis by Bromodeoxyuridine Labeling in Vitro

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9262

急性白血病細胞の細胞周期に関する研究

金沢大学医学部医学科内科学第三講座（主任：松田　保）
望　月　康　弘

急性白血病細胞の細胞周期を解析するために，ピリミジンの同族体であるブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) とそのモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) を用いて，フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) 法により検討を行った．細胞増殖動態の指標として，白血病細胞の S 期比率を表す BrdU 標識率 (BrdU-labeling index, BrdU-LI)，DNA 合成時間 (duration of synthetic phase, Ts) および理論的倍加時間 (potential doubling time, Tpot) を選んだ．対象は，本研究の趣旨に同意の得られた急性白血病患者25例である．患者の末梢血および骨髄液より直ちに白血病細胞を分離し，10 μmol/l の BrdU を含む培養液内で30分間および180分間培養し BrdU を取り込ませ，それぞれを BrdU-LI・1 と BrdU-LI・2 とした．その後，蛍光イソチオシアネート標識マウス抗 BrdU IgG 抗体とプロピディウムアイオダイドにて染色し，フローサイトメーターを用いて BrdU 標識細胞と，その DNA 量の分布を同時に測定した．さらに，BrdU-LI・1 と BrdU-LI・2 をプロットし，回帰直線を求め，Ts および Tpot を算出した．末梢血と骨髄液の両者で同時に BrdU-LI を測定できた15例について，各細胞周期パラメーターを比較すると，BrdU-LI・1，BrdU-LI・2 および Tpot に統計学的に有意な差を認め，骨髄中の細胞の方が末梢血中の細胞に比べて増殖能が高いことが明らかになった．末梢血と骨髄液での各細胞周期パラメーターの相関を検討したところ，BrdU-LI・1 については両者に相関を認めたが，BrdU-LI・2，Ts および Tpot については相関はみられなかった．未治療急性非リンパ性白血病 (acute non-lymphocytic leukemia, ANLL) フランスーアメリカーイギリス分類 M2 の患者で Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) による成人急性骨髄性白血病治療プロトコール (JALSG AML-92 プロトコール) に従って初回寛解導入療法を受けた9例について，治療効果と各種細胞周期パラメーターについて検討した．完全寛解 (complete remission, CR) を得た症例は，Ts および Tpot がマイナス値を示す例と，Ts および Tpot が中央値より小さな値を示す例であった．CR 群と非寛解群の間には，Ts および Tpot に有意な差を認めた．しかし BrdU-LI・1，BrdU-LI・2 には有意な差を認めなかった．未治療 ANLL で JALSG AML-92 プロトコールに従って寛解導入療法と地固め療法を受けた12例を Tpot の中央値で2群に分けて，カプランーマイヤー (Kaplan-Meier) 法で無病生存率 (disease free survival, DFS) および全生存率 (overall survival, OAS) の解析を行うと，Tpot の中央値より短い群で DFS，OAS ともに長い傾向を認めた．今回の研究により，急性白血病における細胞増殖動態の解析には，骨髄液から得られた検体を使用すべきと考えられた．また白血病細胞の増殖動態は S 期細胞の割合のみでは判断できず，Ts および Tpot を算出することが必要であることが明らかとなった．さらにこれらのパラメーターを用いることにより，疾患の予後をより正確に予想し得る可能性が示唆された．

Key words bromodeoxyuridine, cell cycle, flow cytometry, S phase, potential doubling time

近年血液悪性疾患の治療成績は新しい抗腫瘍剤を組み込んだ多剤併用化学療法の発展により飛躍的に向上し，長期生存ひいては治癒も期待できるようになった．抗腫瘍剤の多くは増殖相にある細胞に作用して効果を発揮するため[1]，腫瘍細胞の増殖動態を知ることは治療計画を立てる上で極めて重要である．オートラジオグラフィーの普及により，トリチウムチミジン (tritiated thymidine, ^{3}H-TdR) を利用して，白血病細胞における細胞動態の解析が行われるようになった[2]．しかしこの方法では解析に長時間を要する上に放射性同位元素を用いるため，様々な制約があり，臨床に応用することは困難であった．

ブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) はピリミヂンの同族体で，チミジンのメチル基を臭素に置換した物質である．BrdU を含む溶液で細胞を培養すると DNA 合成のためにチミジンに替わり BrdU が核内に取り込まれる．1981年，Gratzner ら[3][4]により BrdU に対するモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) が開発されたため，S 期に存在する細胞を容易に同定できるようになった．

近年細胞周期および増殖に関する研究が進み，新しく増殖細胞膜抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)[5]-[7]や，Ki-67 抗原[8]~[12]などの内因性細胞増殖マーカーに対する MoAb が開

平成8年11月28日受付，平成9年1月9日受理

Abbreviations：ACR, aclarubicin; ALL, acute lymphocytic leukemia; ANLL, acute non-lymphocytic leukemia; Ara-C, cytosine arabinoside; ATL, adult T-cell leukemia; ATRA, all-trans retinoic acid; BHAC, behenoyl cytosine arabinoside; BM, bone marrow; BrdU, bromodeoxyuridine; BrdU-LI, BrdU-labeling index; CR, complete remission; CV, coefficient of variation; DFS, disease free survival; DNR, daunorubicin; FAB, French-American-British; FBS, fetal bovine serum;

発され，臨床応用が行われている．しかし，これらの内因性増殖マーカーと DNA 合成との間には，関連性はあるものの，基本的には両者は異る現象であり，前者は増殖能とは無関係な条件下でも発現が左右される可能性がある．一方，BrdU を取り込んだ細胞は DNA 合成を行っている細胞そのものであると考えてさしつかえなく，したがってこれを観察することにより，より詳細な解析が可能となると考えられる．

BrdU とその MoAb を用いて行う細胞増殖動態の解析方法としては，免疫組織学的方法[13]と蛍光抗体法によるフローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) 法[14]とがある．後者は一度に大量の細胞について迅速に処理，解析が可能であり，白血病細胞のように血液中に遊離した状態で充分な細胞数が得られる場合には極めて有用な方法と考えられる．さらに，検体として末梢血中の白血病細胞を用いることにより解析が可能であれば，より容易に，患者の負担も少なく検討できる．そこで本研究では，末梢血中および骨髄液中の白血病細胞の増殖動態の違いを比較検討する目的で，急性白血病患者の末梢血および骨髄から採取した細胞を，生体外で BrdU を用いて標識した後，DNA に入り込んだ BrdU をこれと特異的に結合する蛍光イソチオシアネート標識マウス抗 BrdU IgG 抗体〔fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-BrdU mouse IgG〕を用いて染色し，FCM を利用して細胞動態を解析した．また適当な BrdU 標識時間を 2 点選択することにより，DNA 合成時間 (duration of synthetic phase, Ts) および理論的倍加時間 (potential doubling time, Tpot) を算定した．さらに得られた結果と治療効果との関連性についても検討を加えた．

対象および方法

I．対　象

1．BrdU による標識率を測定した症例

急性白血病患者25例を対象として，BrdU の標識率を求めた．年齢は16歳から79歳で，男性12例，女性13例である．病型は急性リンパ性白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) フランスーアメリカーイギリス (French-American-British, FAB) 分類 L2 1 例，成人 T 細胞性白血病 (adult T-cell leukemia, ATL) 1 例，急性非リンパ性白血病 (acute non-lymphocytic leukemia, ANLL) のうち FAB 分類 M0 2 例，M1 3 例，M2 10例，M3 5 例，M4 1 例，ANLL M2 再発 1 例，多発性骨髄腫治療後の二

Table 1. Patient characteristics

Patient No.	Sex	Age (Year)	Diagnosis	Material	No. of leukemic cells in PB	% of leukemic cells in BM	LDH (IU/L)
1	F	63	ALL L2	BM PB	3200	97.0	1786
2	M	25	ATL	BM PB	29700	93.6	−
3	M	18	ANLL M0	BM PB	20600	85.2	16550
4	F	76	ANLL M0	BM	110400	98.5	994
5	M	60	ANLL M1	BM PB	154000	88.0	1436
6	M	16	ANLL M1	BM PB	21200	90.0	1180
7	M	29	ANLL M1	BM PB	148500	85.6	1903
8	M	52	ANLL M2	BM	2400	83.6	1275
9	M	58	ANLL M2	BM PB	360	72.0	383
10	F	61	ANLL M2	BM	4900	26.0	1802
11	F	37	ANLL M2	BM PB	19100	54.0	1095
12	F	52	ANLL M2	BM	700	34.8	335
13	M	40	ANLL M2	BM	3100	87.6	4120
14	F	79	ANLL M2	BM PB	5200	60.0	715
15	F	34	ANLL M2	BM PB	6000	49.2	822
16	M	63	ANLL M2	BM PB	40400	84.8	1006
17	F	57	ANLL M2	BM	2500	52.0	339
18	F	59	ANLL M3	BM	360	48.4	362
19	M	58	ANLL M3	BM PB	50900	97.6	1249
20	F	30	ANLL M3	BM	150	95.0	464
21	F	68	ANLL M3	BM	280	87.2	370
22	F	51	ANLL M3	BM PB	900	89.0	834
23	M	58	ANLL M4	BM	9400	52.8	−
24	F	62	ANLL M2, relapse	BM PB	51200	−	−
25	M	63	Secondary leukemia	BM PB	17900	70.0	2572

L2, M0, M1, M2, M3 and M4 are French-American-British classification of acute leukemia. ALL, acute lymphocytic leukemia ; ANLL, acute non-lymphocytic leukemia ; ATL, adult T-cell leukemia ; BM, bone marrow ; F, female ; LDH, lactate dehydrogenase ; M, male ; PB, peripheral blood ; −, unkown.

FCM, flow cytometry; FITC, fluorescein isothiocyanate; ^{3}H-TdR, tritiated thymidine; IL-1β, interleukin-1β; JALSG, Japan Adult Leukemia Study Group; LDH, lactate dehydrogenase; MIT, mitoxantrone; MoAb, monoclonal antibody; 6MP, 6-mercaptopurine; NCR, non complete remission; OAS, overall survival; PB, peripheral blood; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; Tpot, potential doubling time; Ts, duration of synthetic phase; VP-16, etoposide

次性急性骨髄性白血病 (secondary leukemia) 1例 (表1) である.

2. BrdU による標識率を末梢血および骨髄液の両者で測定した症例

BrdU による標識率を測定した25例中，末梢血中および骨髄液中の両者の細胞で BrdU の標識率を同時に測定できた症例は15例であった．内訳は，ALL L2 1例，ATL 1例，ANLL M0 1例，M1 3例，M2 5例，M3 2例，M2再発1例であった (表1).

3. 細胞動態のパラメーターを解析した症例

未治療の ANLL 20例について Ts および Tpot の算定を行った．内訳は，ANLL M0 2例，ANLL M1 3例，ANLL M2 10例および ANLL M3 5例であった (表2).

Ⅱ. 方　法

1. 白血病細胞への BrdU の取り込み

患者およびその家族に本研究の趣旨および目的を十分説明し了解を得た上で検体の採取を行った．末梢血中からの検体は，ヘパリン 1ml を加えた注射器に，末梢血を 19ml を採取して得た．骨髄からの検体は，200単位/ml のヘパリン加生理食塩水を 5ml 加えた注射器に，骨髄液 2ml を採取して得た.

2. BrdU/DNA 二重染色

FCM による白血病細胞の細胞周期の解析が可能かを検討するため，細胞処理法を Dolbeare ら[15][16]および神野[17]の方法をもとに ANLL M3 の培養株である HL60 を用いて予備実験を行い，この結果をもとに以下の手順で採取した細胞を処理した.

1) 細胞の分離

採取した検体から，リンホプレップ (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway) を用いて直ちに単核球分画を分離し，得られた単核球をリン酸緩衝生理食塩水 (phasphate-buffered saline, PBS) (pH 7.30～7.65) にて3回洗浄した．洗浄後トリパンブルー (trypan blue, 和光純薬工業，大阪) を用いて単核球の生存度 (viability) を確認した．また洗浄後の単核球のサイトスピン標本を作り，ギムザ染色を施し白血病細胞の割合を求めた.

2) 白血病細胞への BrdU の取り込み

洗浄した単核球を直ちに10％ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco BRL, New York, USA) 加 RPMI 培地 1640 (Gibco) に浮遊させた．細胞の濃度は 10^6 個/ml に調整し，1個の培養容器に細胞浮遊液を10ml 用意した．これに最終濃度が 10μmol/l となるように BrdU (和光純薬工業) を加えた[18)-20)]．BrdU を取り込んだ細胞は紫外線に対する感受性が高くなるため，培養中に紫外線により死細胞が増加するのを防ぐ目的で，培養容器をアルミホイルで被い，37℃，5％ CO_2 の条件下で BrdU を取り込ませた．各細胞周期にある細胞の割合を算定するためには BrdU の取り込み時間ができるだけ短いこと〔パルスラベリング (pulse labeling)〕が望ましい．これまで BrdU の取り込みは，細胞と BrdU との接触3分後から認められると報告されている[15]．今回は最も頻用されているパルスラベリング時間を選択し，BrdU を30分間取り込ませた．この時の標識率を標識率・1 (BrdU-labeling index・1, BrdU-LI・1) とした．これまでの報告によれば，白血病細胞の G2 期はほぼ180分とされている[21]．DNA 合成期時間を算定するためには，BrdU による標識率の増加が BrdU の取り込み時間の増加と正の相関をしている必要がある．したがって標識細胞が M 期に

Table 2. The cell cycle kinetic parameters of leukemic cells in bone marrow in de novo ANLL patients

Patient No.	Diagnosis	BrdU-LI・1 (%)	BrdU-LI・2 (%)	Ts (hr)	Tpot (hr)
1	ANLL M0	10.2	13.3	9.87	96.8
2	ANLL M0	0.6	5.3	0.38	64.1
3	ANLL M1	0.4	2.0	0.75	187.5
4	ANLL M1	4.8	7.1	6.26	130.4
5	ANLL M1	4.8	5.8	14.40	300.0
6	ANLL M2	0.3	2.6	0.39	130.4
7	ANLL M2	8.6	9.7	23.45	272.7
8	ANLL M2	0.2	6.4	0.009	48.5
9	ANLL M2	1.4	11.7	0.41	29.1
10	ANLL M2	2.5	−	−	−
11	ANLL M2	8.8	11.7	9.10	103.5
12	ANLL M2	2.2	3.6	4.71	214.3
13	ANLL M2	7.7	5.2	−9.24	−120.0
14	ANLL M2	0.6	6.5	0.29	50.4
15	ANLL M2	3.7	3.1	−18.50	−500.0
16	ANLL M3	17.9	−	−	−
17	ANLL M3	3.3	11.5	1.21	36.6
18	ANLL M3	0.3	3.2	0.29	103.1
19	ANLL M3	4.6	6.5	7.22	157.9
20	ANLL M3	4.4	5.0	22.00	500.0

M0, M1, M2, and M3 are French-American-British classification of acute leukemia. ANLL, acute non-lymphocytic leukemia ; BM, bone marrow ; BrdU, bromodeoxyuridine ; BrdU-LI, BrdU-labeling index ; PB, peripheral blood ; Tpot, potential doubling time ; Ts, duration of synthetic phase ; −, not tested.
BrdU-LI・1 was measured by flow cytometry using anti-BrdU monoclonal antibody and propidium iodide after incubation of leukemic cells for 30 minutes with RPMI 1640 medium, fetal bovine serum and BrdU. BrdU-LI・2 was measured after incubation for 180 minutes. Ts and Tpot was estimated by the regression line obtained by plotting each of both values ; BrdU-LI・1 and BrdU-LI・2.

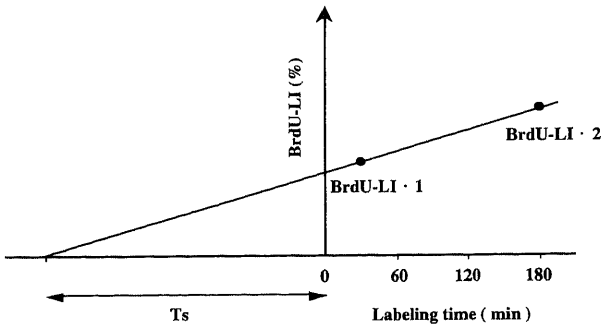


Fig. 1. The relationship between BrdU-LI and labeling time. The duration of Ts can be estimated from the regression line obtained by plotting BrdU-LI・1 and BrdU-LI・2 against labeling time. The slope of this regression line indicates the rate of cells entering into synthetic (S) phase per hour.

移行しないように持続標識時間は180分とし，これを標識率・2 (BrdU-LI・2) とした．

3）細胞の固定・保存

培養時間終了後，細胞を直ちに PBS で3回洗浄し，その後あらかじめ−20℃に冷しておいた70%エタノールを攪拌しながら加え，−20℃で少なくとも2時間以上固定し，BrdU/DNA 染色まで−20℃のままで保存した．

4）DNA 変性 (denaturation)

固定した細胞を PBS で2回洗浄した後，2N HCl を攪拌しながら添加し，20℃で20分間作用させた[18)20)22)]．この処理により，二重鎖 DNA の一部が単鎖 DNA に変性し，DNA の中に取り込まれている BrdU が露出し，抗 BrdU MoAb が結合しやすくなる．次の段階の抗原抗体反応は核内の pH が中性に近いことが望ましいため，塩酸を中和する目的で，0.1M 無水ホウ酸ナト

Remission induction chemotherapy protocol

Regimen A		Days	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BHAC	200 mg/m²	3 hr iv	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	(↓)	(↓)
DNR	40 mg/m²	30 min iv	↓	↓	↓	↓				↓	↓		(↓)	(↓)
6MP	70 mg/m²	po	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	(○)	(○)

Regimen B		Days	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BHAC	200 mg/m²	3 hr iv	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	(↓)	(↓)	(↓)
VP-16	100 mg/m²	1 hr iv	↓	↓	↓	↓	↓					
DNR	40 mg/m²	30 min iv	↓	↓	↓	↓				(↓)	(↓)	
6MP	70 mg/m²	po	○	○	○	○	○	○	○	(○)	(○)	(○)

Consolidation chemotherapy protocol

1 course		Days	1	2	3	4	5
MIT	7 mg/m²	30 min iv	↓	↓	↓		
Ara-C	200 mg/m²	24 hr iv	↓	↓	↓	↓	↓

2 course		Days	1	2	3	4	5	6	7
BHAC	200 mg/m²	3 hr iv	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
VP-16	100 mg/m²	1 hr iv	↓	↓	↓	↓	↓		
DNR	40 mg/m²	30 min iv	↓	↓	↓				
6MP	70 mg/m²	po	○	○	○	○	○	○	○

3 course		Days	1	2	3	4	5	6	7
BHAC	200 mg/m²	3 hr iv	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ACR	14 mg/m²	30 min iv	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Fig. 2. Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML-92 protocol. For inducing remission, the patients who had ANLL except for ANLL M3 were randomized to treat with remission induction chemotherapy regimen A or B of the JALSG AML-92 protocol. If the BM did not become hypoplastic and had leukemic cells more than 15% on day 10 in regimen A or on day 7 in regimen B, patients were scheduled to undergo additional chemotherapy for 2 or 3 days according to each of regimens. The patients who had ANLL M3 were treated as follow; ATRA 45 mg/m²/day given orally until disappearance of leukemic cells in BM, when their leukocyte counts were under 3000/μl at the start of therapy, and ATRA with same dosage combined with DNR 40 mg/m²/day for three days (30 minutes infusion) and BHAC 200 mg/m²/day for 5 days (3 hour infusion) was given, when their leukocyte counts were over 3000/μl. A total count of leukemic cells reached more than 1000/μl in peripheral blood during the treatment with ATRA, they were scheduled for receiving DNR 40 mg/m²/day for three days plus BHAC 200 mg/m²/day for five days in addition to ATRA. After CR was obtained, three courses of consolidation chemotherapy were given according to the protocol. CR was defined as the reduction of leukemic cells to less than 5% and recovery of normal hematopoiesis. ACR, aclarubicin; AraC, cytosine arabinoside; ATRA; all-trans retinoic acid; BHAC, behenoyl cytosine arabinoside; DNR, daunorubicin; iv, intravenous injection; 6MP, 6-mercaptopurine; MIT, mitoxantrone; po, per oral; VP-16, etoposide.

リウム (0.1M $Na_2B_4O_7$) (pH 8.5) を10分間作用させた[20].

5) 抗 BrdU モノクローナル抗体による染色

0.5%ツィーン (Tween) 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 加 PBS にウシ血清アルブミン (DAKO, Glostrup, Denmark) 濃度が0.5%になるように調整した溶液を用意し, PBS で2回洗浄した細胞をこの溶液内に 1×10^6 個/50 μl の濃度となるように懸濁させた. この処置により非特異的抗体の結合を防止した. この細胞浮遊液に蛍光イソチオシアネート標識マウス抗 BrdU IgG 抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA)を細胞 1×10^6 個 あたり 20 μl 加え撹拌した後, 室温暗室で30分間作用させた[23]. 陰性コントロールとしては BrdU を180分間取り込ませた細胞を同様に処理し, 抗 BrdU 抗体に代わり蛍光イソチオシアネート標識マウス IgG1 抗体 (FITC-conjugated mouse IgG1) (DAKO) を細胞 1×10^6 個あたり 10 μl 加え撹拌した後, 室温暗室で30分間作用させたものを用意した.

6) プロピディウムアイオダイド (propidium iodide, PI) によるDNA 染色

PBS で3回洗浄した後, 1500U/ml の RNA 分解酵素 (Sigma Chemical Co.) を加え, 37℃暗所で30分間反応させ, RNA の消化を行った. PBS で3回洗浄し, 5 μg/ml の PI (Sigma Chemical Co.) を室温暗所で30分間反応させて, 二重鎖部分の DNA 染色を行った[23][24]. 染色後 PBS で2回洗浄した後 40 μm のナイロンメッシュで細胞を濾過し, 細胞浮遊液とした.

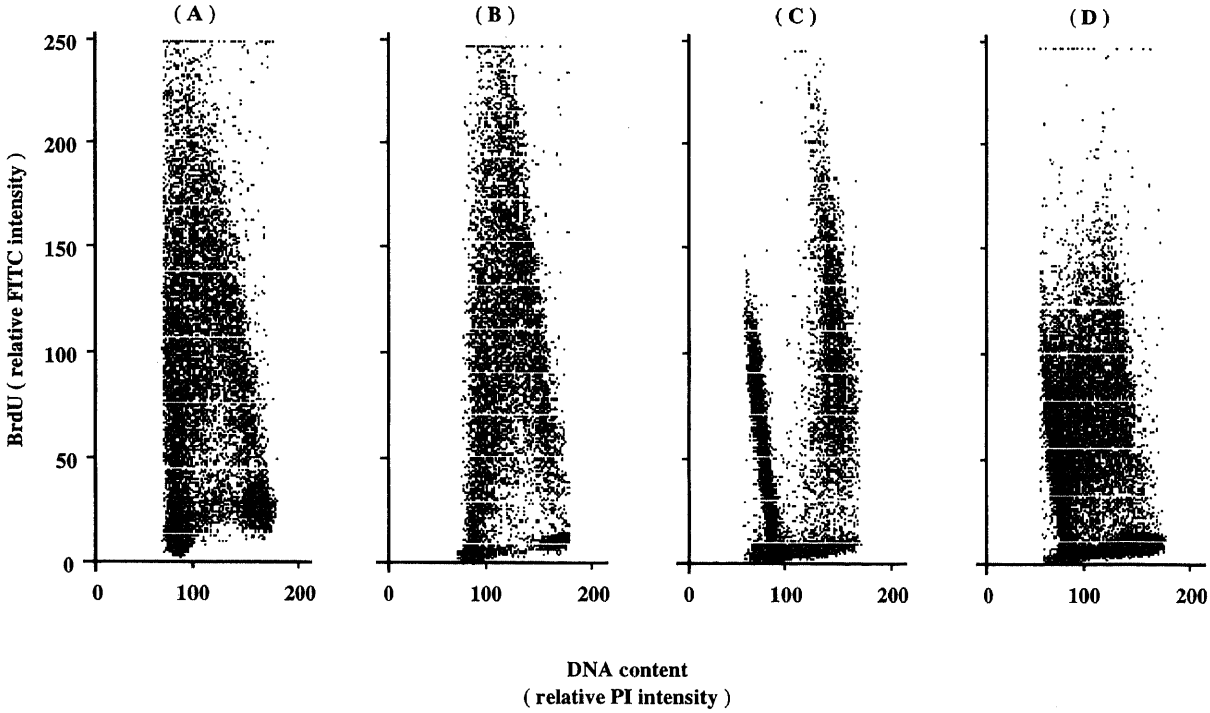


Fig. 3. BrdU/DNA bivariate distributions of HL60 cells. (A) HL60 cells pulse-labeled with BrdU for 30 minutes. (B) HL60 cells labeled with BrdU for 180 minutes. (C) HL60 cells incubated for 9 hours after pulse-labeled with BrdU for 30 minutes. (D) HL60 cells incubated for 24 hours after pulse-labeled with BrdU for 30 minutes. In (A) HL60 cells were incubated for 30 minutes in RPMI medium 1640 containing BrdU with 10% FBS. In (B) incubated for 180 minutes. In (C) and (D) HL60 cells were incubated for 30 minutes, washed, incubated in BrdU-free medium, and harvested after intervals each of 9 and 24 hours. The instrumental gain for green fluorescence (BrdU relative intensity) measurement is the same in all panels in this figure. In (A) all S phase BrdU labeled cells are in the middle of the interval between G0/G1 and G2/M. In (B) all labeled cells are in the middle, although mean green fluorescence of (B) is about 2 times higher than (A). In (C), with respect to the cytogram of (A), BrdU labeled cells have moved through the S phase (their mean distribution is shifted toward G2/M). In (D) BrdU labeled cells are in the middle again, and distribution shape of BrdU labeled cells resembles that of (A), although mean green fluorescence of (D) is half of (B).

Table 3. Comparison of the cell cycle kinetic parameters of leukemic cells between PB and BM

Leukemic cell	BrdU-LI・1 (%)	BrdU-LI・2 (%)	Ts (hr)	Tpot (hr)
PB	2.33±2.63	3.66±5.73	53.1±124	3110±7840
BM	4.41±3.03*	8.29±5.69†	6.00±8.65	147±150*

ANLL, acute non-lymphocytic leukemia ; BM, bone marrow ; BrdU, bromodeoxyuridine ; BrdU-LI, BrdU-labeling index ; PB, peripheral blood ; Tpot, potential doubling time ; Ts, duration of synthetic phase. Each value represents $\bar{x}$ ± SD.
The leukemic cells were obtained from PB and BM simultaneously in fifteen ANLL patients.
* $p<0.05$ versus PB by Wilcoxon signed-rank test. † $p<0.01$ versus PB by Wilcoxon signed-rank test.

3．FCMによるBrdU標識率の測定および細胞周期解析

測定装置はEPICS-XLシステム (Coulter Electronics Inc., Hialeah, USA) を用いた．FITCとPIはともにアルゴンイオンレーザー488nmで励起される．520nmバンドパスフィルターにてFITCの蛍光量を測定しBrdU量として求め，同時に620nmロングパスフィルターにてPIの蛍光量を測定しDNA量として求めた (two color analysis)．一検体につき2×10^4個以上の細胞を解析した．なお，あらかじめ標準粒子にて，変動係数 (coefficient of variation, CV) 値が3.0以下になるように調整した．解析から破砕細胞 (cell debris) や二重，三重連結細胞 (doublets, triplets) を除去するために，最も適切な範囲でゲート設定を行った．

4．TsおよびTpotの計算

BrdUによる標識の間，白血病細胞の数が一定であること，増殖相にある細胞は同期していないこと，および，増殖相にある各々の白血病細胞の細胞周期の長さに差がないこと，の三点を仮定することにより，DNA合成時間を次の式で求めた[25)26)]．Ts (hr)＝LI/R ここでLIはBrdU標識直後 (0時間) の標識率を表し，Rは単位時間当たりにDNA合成期に移入する細胞の割合 (%) を示している．しかし，実際上は0時間のBrdU-LIを測定することは不可能であるため，BrdU-LI・1およびBrdU-LI・2をプロットすることにより，回帰直線 (regression line) を求め，Tsを算定した．Tpotは以下の式により求めた (図1)[27)28)]．

$$Tpot\ (hr) = (Ts/BrdU\text{-}LI \cdot 1)\times 100$$

5．末梢血中および骨髄液中の白血病細胞の細胞周期パラメーターの比較

末梢血中の白血病細胞と骨髄液中の白血病細胞の細胞周期の各パラメーターとTsおよびTpotについて，ウィルコクソン符号付順位和検定 (Wilcoxon signed-ranks test) にて比較した．

6．細胞周期パラメーターと化学療法の効果との関係

Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) による成人急性骨髄性白血病治療プロトコール (JALSG AML-92プロトコール) (図2) に従って治療を受けた未治療ANLL M2の患者9人について初回寛解導入療法の効果と各細胞周期パラメーターとの関係についてマンーホイットニ検定 (Mann-Whitney U test) で比較した．JALSG AML-92プロトコールに従って治療を受けた未治療ANLLの患者12人について初回寛解導入療法の効果を，TsおよびTpotの中央値で2群に別けて無病生存率 (disease free survival, DFS) および全生存率 (overall survival, OAS) をカプランーマイヤー (Kaplan-Meier) 法で求めログーランク検定 (log-rank test) で比較した．

成　績

Ⅰ．BrdU/DNA二重染色の染色パターン

白血病細胞の増殖動態の解析に先立ち，ANLL M3の培養株であるHL60を用いてBrdU/DNA二重染色の染色性について検討した．X軸に相対的DNA量を，Y軸にBrdUの相対的蛍光量をとり，ヒストグラムを作成した．BrdU陽性細胞は「逆U字型」[14)]あるいは「馬蹄形」[19)]と表現されるような分布を示し，BrdU蛍光量はDNA合成中期で最大であった．また標識細胞と，G0期＋G1期にある細胞およびG2期＋M期にある細胞とを明確に区別することが可能であった．またDNA量はS期と同等ながらBrdUにより標識されない細胞 (quiescent, S0 cells)[29)]の区別も容易であった．

BrdUを30分間取り込ませて標識したHL60細胞のBrdU-LI・1は9.3%，3時間取り込ませて標識したHL60細胞のBrdU LI・2は22.7%であった．両者の値から得られたTsは2.1時間，Tpotは22.4時間であった．HL60細胞をBrdUで30分間パルスラベリングし，PBSで3回洗浄した後，再びBrdUを含まない10% FBS加RPMI培地1640内に再浮遊させ，37℃，5% CO_2で24時間培養した後，BrdU/DNA二重染色を施すと，各細胞周期の分布が30分パルスラベリングしたときと類似していた．このことから増殖相に入っているHL60細胞の1細胞周期は24時間程度と推測され，この値はBrdU-LI・1とBrdU-LI・2とから求めたTpotとよく相関した (図3)．なお，臨床検体である白血病細胞においても，BrdU/DNA二重染色の染色性はHL60細胞同様に良好であった．

Ⅱ．患者背景と臨床検体の特徴

検査時の骨髄における白血病細胞の比率は26.0%から98.5%の間に分布していた．末梢血中の白血病細胞数は150/μlから

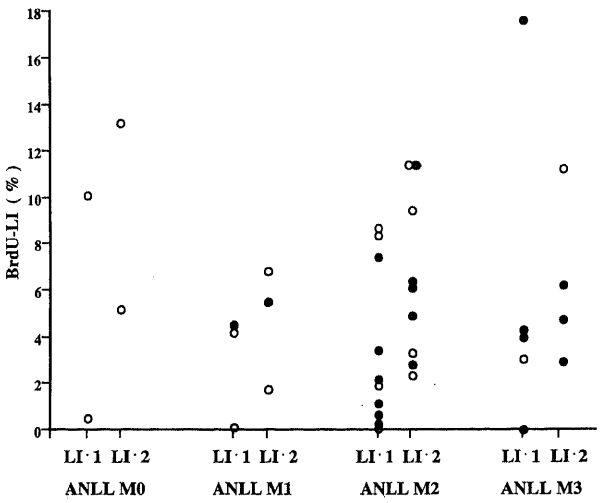


Fig. 4. Relationship between FAB classification and BrdU-LIs of BM leukemic cells (divided into two groups: ●, complete remission; ○, non complete remission).

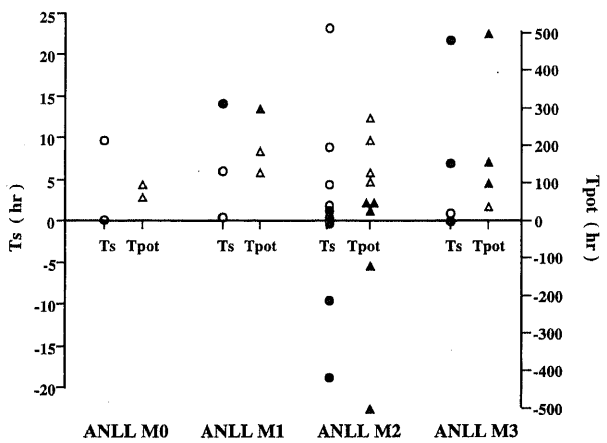


Fig. 5. Relationship between FAB classification, Ts and Tpot of BM leukemic cells. ● and ▲, complete remission; ○ and △, non complete remission.

$1\times10^5/\mu l$ 以上まで症例ごとに様々であった．リンホプレップにて分離した後の検体の白血病細胞の比率は末梢血中および骨髄液中ともに90%以上であり，トリパンブルーを用いた生存度はいずれも95%以上であった．また血清中乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase, LDH) 値は正常域にあるもは2例だけであり，正常値上限の40倍以上を示す症例もみられた(表1)．

Ⅲ．末梢血中白血病細胞と骨髄液中白血病細胞の細胞周期パラメーターの比較

末梢血液中と骨髄液中の両者で同時に BrdU-LI を測定できた15例について各種の細胞増殖のパラメーターを比較した．末梢血中および骨髄液中での BrdU-LI・1 の平均値±標準偏差 ($\bar{x}\pm$SD) はそれぞれ2.33±2.63%と4.41±3.03%であり，両群間には危険率5%未満で統計学的有意差を認めた (ウィルコクソン符号付順位和検定)．また，BrdU-LI・2 はそれぞれ3.66±5.73%と8.29±5.69%であり，統計学的有意差を認めた．Tpot はそれぞれ3110±7840時間，147±150時間であり統計学的有意差を認めたが，Ts はそれぞれ53.1±124時間と6.00±8.65時間であり有意な差を認めなかった (表3)．

白血病細胞の各細胞周期のパラメーターについて，末梢血中および骨髄液中とで相関の有無を検討したところ，BrdU-LI・1 については危険率5%未満で相関関係を認めた (スピアマン順位相関係数の検定，Spearman's rank correlation) が，BrdU-LI・2，Ts および Tpot については末梢血中と骨髄液中との間に相関関係はみられなかった．

Ⅳ．ANLL の FAB 分類と各細胞周期パラメーターとの関係

未治療 ANLL 20例について FAB 分類の違いによる各種細胞周期パラメーターの分布の特徴について検討したが，FAB 分類と細胞周期パラメーターとの間に一定の関係は認めなかった (図4，5)．また末梢血中白血病細胞数，骨髄液中に占める白血病細胞の割合および LDH の三者と，各種細胞周期パラメーターとの相関を検討したが統計学的に有意なものは認めなかった．

Ⅴ．ANLL M2 における寛解導入療法の成績と各種細胞周期パラメーターとの関係

JALSG AML-92 プロトコールに従って初回寛解導入療法を受けた中で最も症例数が多かったのは ANLL M2 で9例であった．この9例について治療効果と各種細胞周期パラメーターについて検討した．寛解導入療法により完全寛解 (complete remission, CR) を得た症例は，Ts および Tpot がマイナス値を示す例と，Ts および Tpot が中央値 (median) より小さな値を示す例に認めた．初回寛解導入療法により CR となった症例と，非寛解例 (non complete remission, NCR) の Ts の $\bar{x}\pm$SD はそれぞれ−5.39±8.41時間と9.42±10.01時間であった．Tpot につ

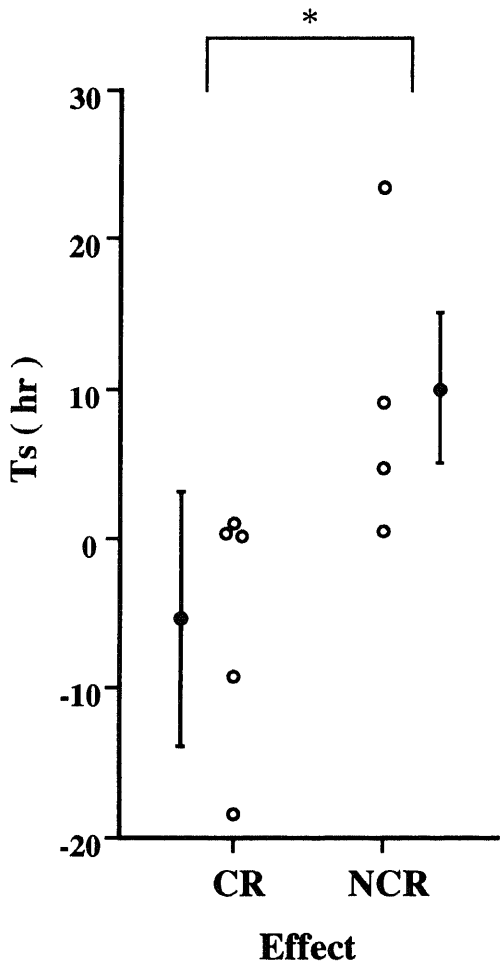


Fig. 6. Relationship between the effect of first induction chemotherapy and Ts of BM leukemic cells in patients with ANLL M2. ⊢●⊣, $\bar{x}\pm$SD. *p<0.05, by Mann-Whitney U test.

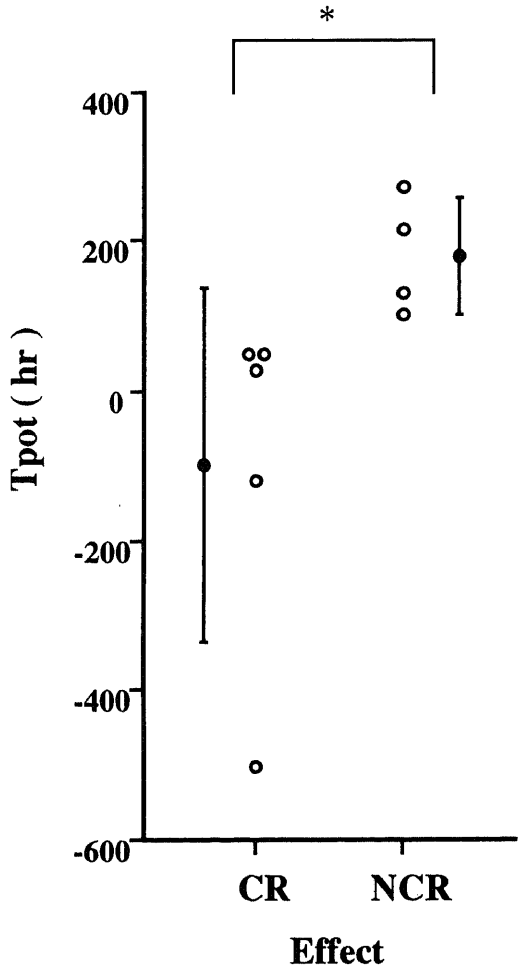


Fig. 7. Relationship between the effect of first induction chemotherapy and Tpot of BM leukemic cell in patients with ANLL M2. ⊢●⊣, $\bar{x}\pm$SD. *p<0.05, by Mann-Whitney U test.

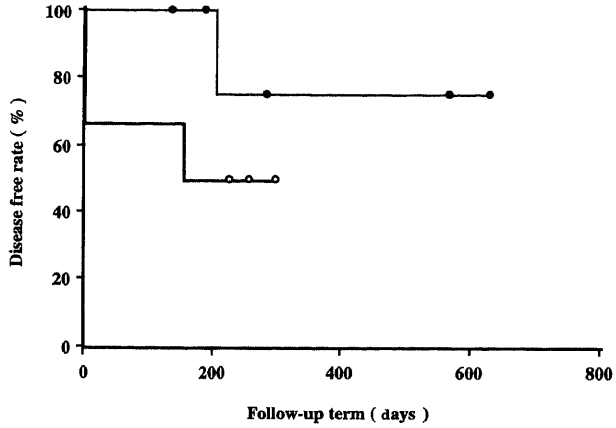


Fig. 8. Disease free survival curves of de novo ANLL patients treated by JALSG protocol according to Tpot. The curves were calculated according to the Kaplan-Meier actuarial method. —●—, Tpot≦Median; —○—, Tpot＞Median.

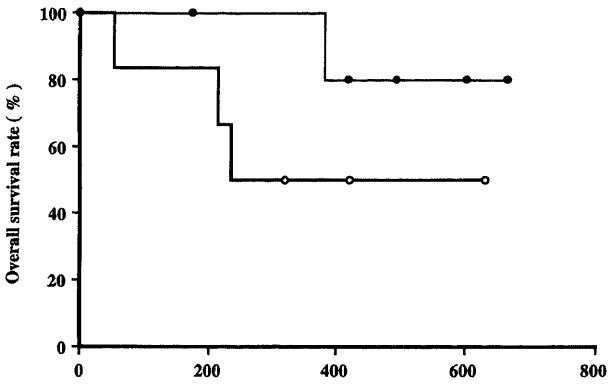


Fig. 9. Overall survival curves of de noveo ANLL patients treated by JALSG protocol according to Tpot. The curves were calculated according to the Kaplan-Meier actuarial method. —●—, Tpot≦Median; —○—, Tpot＞Median.

いては−98.40±235.44時間と180.22±77.65時間であり，両パラメーターとも両群間に危険率５％未満で統計学的有意差を認めた (マン−ホイットニ検定) (図６，７)．しかし BrdU-LI・1，BrdU-LI・2，末梢血中白血病細胞数，骨髄液中に占める白血病細胞の割合および LDH 値には，CR 群と NCR 群との間に有意な差を認めなかった．

Ⅵ．ANLL 患者の無病生存率および全生存率と Tpot の関係

未治療 ANLL で JALSG AML-92 プロトコールに従って寛解導入療法と地固め療法を受けた12例を，Tpot の中央値 (median) で２群に分けてカプラン−マイヤー法で DFS および OAS の解析を行った．DFS，OAS ともに Tpot の中央値より短い群で長い傾向を認めたが，観察期間が短いため統計学的有意差はみられなかった (図８，９)．

考　　察

腫瘍細胞の最大の特徴は異常増殖にあり，その増殖動態は組織学的悪性度，治療効果および予後と密接に関係するとされている．白血病においてもその増殖動態は，治療計画を決定する上で患者の年齢，全身状態，白血病の病型，白血病細胞の比率などとともに極めて重要な要素の一つとなっている．増殖動態の解析結果を臨床応用するためには，解析が迅速かつ正確に行われなければならない．これまで ^{3}H-TdR を利用して細胞の増殖動態の解析が行われてきたが[2]，この方法では解析に長時間を要する上に，放射性同位元素を用いるため様々な制約があり，臨床に応用することは困難であった．しかし，^{3}H-TdR に代り BrdU とその MoAb が用いられるようになり[3,4]，増殖動態の解析が迅速に行われるようになった．これまでの BrdU を用いた研究では，主に BrdU を生体内に直接投与して BrdU-LI を求めて増殖動態の解析を試みている[27,28,30~33]．しかし，この方法で Ts および Tpot を求めようとすると頻回の検体採取が必要となるために患者の負担が大きく，臨床上は不可能である．さらに，BrdU は正常細胞の DNA に取り込まれてこれに影響を与え，突然変異を誘発する作用があるとされており[34]，直接生体内に投与することには慎重であらねばならない．一方，生体外での標識であれば一度の採取で必要な検体が得られ，BrdU による副作用を考慮する必要もない．本研究では，患者の負担を少なくし，かつ多くの細胞増殖動態のパラメーターを得ることを目的に，BrdU とその MoAb を用いて生体外での解析を試みた．

ヒト白血病細胞の増殖動態の解析に先立ち，生体外での解析法の確立のための基礎的検討として，株化白血病細胞である HL60 細胞を用いて，BrdU の標識率とともに DNA 量の解析を行った．BrdU を用いた30分間のパルスラベリングで得た標識率と，BrdU とともに３時間培養して得た標識率から，これまでの報告[17]のように，細胞周期の解析が可能であることが確かめられた．したがって，臨床検体でも同様に標識することにより，細胞周期の解析を試みることとした．しかし，今回の培養条件は，HL60 細胞には至適しているが，すべてのヒト白血病細胞に適しているとは考えにくく，今回の実験でも BrdU-LI・1 に比べ BrdU-L・2 の方が小さい値を示し，Ts および Tpot がマイナス値を示した症例が認められた．血液系の腫瘍細胞の増殖には FBS や RPMI 培地1640の成分に加え，顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor) などの様々なサイトカインや細胞増殖因子が必要であると考えられ，今後より適した培養条件を検討する必要があろう．

末梢血中の白血病細胞の細胞周期を解析することにより増殖能が推定可能であれば，患者に骨髄穿刺の負担を強いることなく検討できる．そこで，本研究では，末梢血中の白血病細胞と，病変の主座である骨髄中の白血病細胞の間に差異があるか否かを知るために，両者を比較した．その結果，末梢血中に比べて骨髄中の白血病細胞では BrdU-LI・1，BrdU-LI・2 ともに有意に高く，Tpot も有意に低値を示し，骨髄液中の細胞の方が増殖が盛んであることを示す結果が得られた．Vidriales ら[35]は末梢血中と骨髄液中の白血病細胞とでは，骨髄液中の白血病細胞の方がＳ期にある細胞の割合は有意に高いが，両者のＳ期細胞の割合には強い相関があると報告している．しかし，彼らの報告では，末梢血中と骨髄液中の白血病細胞を同一例につき同時には測定していないために，正確に解析されたとはいえない．Guerci ら[36]は同一例につき末梢血中と骨髄液中の白血病細胞を同時に解析し，骨髄液中の白血病細胞の S+G2/M 期細胞の占める割合と末梢血中のそれとは強い相関関係があったと報告している．しかし彼らの報告では検体採取時のみの S+G2/M 期細胞の割合について検討しているだけで，Ts や Tpot などの細

胞周期のパラメーターについては検討されておらず，末梢血中と骨髄液中の細胞の増殖動態の相関を正確に検討しているとは言えない．本研究では，BrdU-LI・1については末梢血中と骨髄液中の間でこれまでの報告と同様に相関関係を認めたものの，BrdU-LI・2，TsおよびTpotについては相関関係はみられず，末梢血中から得られた検体の細胞増殖動態は病変の主座である骨髄での細胞増殖動態を反映しているとはいえなかった．以上のことより，白血病細胞の増殖能の評価にはBrdUのパルスラベリングによりS期細胞の割合を求めるだけでは不充分であり，TsやTpotを含めた評価が必要であると考えられた．また，末梢血中と骨髄液中とでは腫瘍細胞の増殖動態が異なるために，臨床検体を利用した薬物感受性など，細胞周期に関連した解析を行う際には，疾患の主座となる骨髄から採取した検体を用いる必要があると考えられた．

このように，骨髄液中の白血病細胞の増殖能が末梢血中のそれより高い理由としては，骨髄微小環境が末梢血中に比べて細胞増殖に適していること，末梢血中と骨髄中とでは細胞自体が持つ増殖能が異なっていることが考えられる．今回，末梢血と骨髄液とから得た検体は，ともに共通の条件下で培養を行っているので，微小環境による差は考えにくく，末梢血中と骨髄中とでは白血病細胞自体の持つ増殖能が異なっているものと推定される．白血病細胞自体の有する増殖機構の一つとして，顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) およびインターロイキン-1β (interleukin-1β，IL-1β) の自己分泌つまりオートクライン (autocrine) 機構が存在するとされている[37]．末梢血中の白血病細胞と骨髄中のそれとでは，細胞増殖に関わるサイトカインの自己分泌能およびこれのレセプター発現が異なるために，生体外の培養でも両者の増殖能に差がでるのではないかと推定される．これらの点については今後の検討が必要である．

急性白血病の病型による増殖能の差異を検討するために，未治療のANLLについてのみ，日常繁用されているFAB分類に従って各細胞周期のパラメーターを比較した．Razaら[38]は，ANLL M3は他のANLLに比べて細胞周期が長いと報告している．またVidrialesら[35]はANLL M4およびM5では増殖能の高い例が多いと報告しているが，本研究では各病型の症例数が少ないこともあるが，一定の傾向は認められなかった．

JALSG AML-92プロトコールに従って治療を受けた未治療のANLL M2について細胞周期の各パラメーターを比較したところ，初回寛解導入療法でCRが得られたのは，TsおよびTpotがマイナス値を取る症例，すなわち今回の培養条件下で増殖がみられなかった症例，もしくはTsおよびTpotが中央値より低値をとる症例，すなわち増殖が盛んであった症例であった．このうち増殖能がみられなかった全症例でCRが得られたのは予想外であった．この理由として骨髄支持細胞から分泌されるIL-1βをはじめとする種々のサイトカインの影響が考えられる〔パラクライン (paracrine) 機構〕．白血病細胞の増殖は，これらのサイトカインによりコントロールされていると考えられているが[37]，生体外培養ではこれらのサイトカインのコントロールがなくなるために，骨髄でより強く影響を受けて増殖していた白血病細胞ほど一層強く増殖が抑制され，TsおよびTpotがマイナス値を示したのではないかと推定される．したがって，生体外と生体内での増殖能に差があったものと考えられ，このことが治療成績に影響したものと思われる．一方，増殖能が高い症例でCRが得られたのは，細胞回転が早いためにサイトシン・アラビノシド (cytosine arabinoside) などの細胞周期に特異的に作用する抗腫瘍剤が効率よく白血病細胞に取り込まれたためと考えられる．

Lacombeら[39]は，生体外でBrdUによりANLL細胞を標識し，S期にある白血病細胞の割合で2つの群に分けて治療効果を検討している．第一群はS期細胞の割合が3％未満の増殖能が低いと考えられる群で，この群では治療抵抗性の症例が多かったと報告している．第二群はS期細胞の割合が3％以上の値を示すANLLで，この群の中では，増殖能の比較的低い方がCRを得やすかったと報告している．今回の症例でみると，TsおよびTpotの値から増殖能が低いと考えられる症例ではCRが得られなかった．Razaら[40]およびHunterら[41]は，増殖能の低い症例ほどCRを得やすいとしている．また，Löwenbergら[42]も，^{3}H-TdRを用いて白血病細胞の自然発育能 (spontaneous proliferation activity) を検討したところ，増殖能が高いものほどCRが得にくいとしている．一方，Riccardiら[28]およびGiordanoら[33]は増殖能が高い例でCRを得やすいと報告している．さらに，Vidrialesら[35]およびPreislerら[43]はS期細胞の割合は寛解導入療法に対する反応性を決定する因子として重要ではないと論じている．このようにこれまでの報告では，白血病細胞の増殖能と治療効果との関係については一定の見解が得られていない．これは，細胞の増殖能がこれまで主にS期にある細胞の割合のみで検討されてきたためであり，今回の実験でも明らかなように，S期にある細胞の割合が必ずしも細胞の増殖能を反映していないことに起因すると考えられる．今後，白血病細胞の増殖能と治療効果および予後を検討するに当たっては，S期細胞の割合のみならず，TsおよびTpotに加えてG0期およびDNA量はS期に相当しながらもDNA合成を行っていない細胞 (S0 cell)[29]の割合などについても考慮する必要があると考えられる．

寛解持続期間および生存期間と細胞周期との関係についてもこれまでに様々な報告がなされてはいるが，一定の見解は得られていない[28][33][35][38][40][41][43][44]．CRの維持に関与する因子としては，治療後に残存している白血病細胞の量およびその増殖能，さらに増殖相にある細胞の割合などとともに，病型，染色体異常の有無および種類，地固め療法の効果などの様々な要素が関与していると考えられている．しかし，再発が残存白血病細胞の再増殖によるものであることから，CRの維持には細胞周期が深く関わっていると考えられる．今回治療前の白血病細胞の増殖能が予後に及ぼす影響を検討するため，Tpotの中央値で二群に分けて生存曲線をカプラン－マイヤー法で検討した．ログーランク検定では二群間に統計的な有意差を認めなかったが，Tpotが中央値より短い群でDFSおよびOASともに良好な傾向が窺われた．この結果はANLL M2におけるCRの得やすさの条件と一致している．つまり，白血病細胞の増殖能の高い例では，抗白血病剤が効率よく細胞内に取り込まれるために，より多くの白血病細胞が除去され，残存白血病細胞のより少ない良好なCRが得られ，したがって長期生存が得られると考えられる．

本研究の結果から，患者に負担とならない一回の骨髄穿刺で得られた検体を，生体外で処理することにより，より正確に白血病細胞の細胞回転状態が解析でき，増殖能の推定が可能であることが明らかとなった．今後急性白血病の新しい治療法の開

発に役立つものと考えられる.

結 論

白血病細胞の細胞増殖動態を解析するために，ピリミジンの同族体である BrdU を生体外で白血病細胞に取り込ませ，その MoAb と PI を用いて，FCM 法により検討した．細胞増殖動態の指標として，BrdU-LI，Ts および Tpot の３つを選び，これらの計測および算定により，以下の結果を得た．

１．BrdU-LI の測定のために，末梢血および骨髄より採取した白血病細胞を BrdU の最終濃度が 10mmol/l となるように調整した10% FBS 加 RPMI 培地1640中に浮遊させ，30分および３時間 BrdU の取り込みを行った．これを蛍光イソチオシアネート標識抗 BrdU 抗体と PI により二重染色し，FCM によってヒストグラムを作成した．この方法により，細胞周期各相を明瞭に区別できた．また DNA 量は S 期と同等ながら BrdU により標識されない細胞 (S0 cells) の区別も容易であった．

２．末梢血液と骨髄液の両者から同時に検体の得られた15例で各種の細胞増殖パラメーターを比較した．末梢血中および骨髄液中の BrdU-LI・1，BrdU-LI・2，Ts および Tpot の $\bar{x}\pm$SD はそれぞれ2.33±2.63%と4.41±3.03%，3.66±5.73%と8.29±5.69%，53.1±124時間と6.00±8.65時間，3110±7840時間，147±150時間であり，Ts を除く３つのパラメーターに有意な差を認め，骨髄液中の白血病細胞で増殖が盛んであることが確認された．また，末梢血液中と骨髄液中の細胞との間では BrdU-LI・1 には相関関係を認めるものの，BrdU-LI・2，Ts および Tpot には相関関係はみられず，白血病細胞の増殖動態を把握するには病変の主座である骨髄からの検体採取が不可欠であることが明らかとなった．

３．未治療 ANLL M2 の患者で JALSG AML-92 プロトコールを用いた初回寛解導入療法により CR となった症例と，NCR 例の Ts および Tpot の $\bar{x}\pm$SD は，それぞれ−5.39±8.41時間と9.42±10.01時間，−98.40±235.44時間と180.22±77.65時間であり，両パラメーターともに両群間に有意な差を認めた．つまり，生体外で増殖能を示さなかった例と，高い増殖能を示した例で CR が得られた．

４．未治療 ANLL で JALSG AML-92 プロトコールに従って寛解導入療法と地固め療法を受けた12例を Tpot の中央値で２群に分けてカプラン−マイヤー法で DFS および OAS の解析を行うと，DFS，OAS ともに Tpot が中央値より短い群で長い傾向を認めた．これは，この群で残存白血病細胞の少ない良質な CR が得られたためと考えられた．

以上のことより，急性白血病における細胞増殖動態の解析には，骨髄液から得られた検体を使用すべきと考えられた．また細胞の増殖動態は BrdU-LI で求められる S 期細胞の割合のみでは把握できず，Ts および Tpot を算出することが必要であり，さらにこれらのパラメーターを用いることにより，疾患の治療効果および予後をより正確に予想し得る可能性が示された．

謝 辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜りました恩師，金沢大学医学部内科学第三講座松田 保教授に深甚なる感謝の意を表します．また本研究の遂行に直接御指導頂きました金沢大学医学部内科学第三講座中村忍助教授に深く感謝し，本研究の遂行に際し多大な御指導・御協力を賜りました金沢大学医学部内科学第三講座第三研究室大竹茂樹先生，NTT金沢病院神野正敏先生ならびに諸先生方に感謝いたします．

なお，本論文の要旨は，第57回日本血液学会総会 (1995年６月，名古屋) および第37回日本臨床血液学会総会 (1995年10月，京都) において発表した．

文 献

1） 小川一誠. 細胞回転と癌化学療法. 癌と化学療法 3: 1093-1101, 1971

2） Clarkson B, Ohkita T , Ota K, Fried J. 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

3） Gratzner HG, Leif RC. An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. Cytometry 1: 385-393, 1981

4） Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science 218: 474-475, 1982

5） Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antige n in proliferating cells. J Immunol 121: 2228-2234, 1978

6） Celis JE, Bravo R, Larsen PM, Fey SJ. Cyclin: a nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. Leuk Res 8: 143-157, 1984

7） Landberg G, Roos G. Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. Cancer Res 51: 4570-4574, 1991

8） Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 133: 1710-1715, 1984

9） Schwarting R, Gerdes J, Niehus J, Jaeschke L, Stein H. Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol Methods 90: 65-70, 1986

10) Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, Slymen DJ, Rybski JA, Rangel CS, Richter LC, Miller TP. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki- 67. Blood 71: 1157-1160, 1988

11) Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d' Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. J Pathol 154: 223-235, 1988

12) Drach J, Gattringer C, Glassl H, Schwarting R, Stein H, Huber H. Simultaneous flow cytometric analysis of surface markers and nuclear Ki-67 antigen in leukemia and lymphoma. Cytometry 10: 743-749, 1989

13) Raza A, Ucar K, Preisler HD. Double labeling and in vitro versus in vivo incorporation of bromodeoxyuridine in patients with acute nonlymphocytic leukemia. Cytometry 6: 633-640, 1985

14) 高橋 学, 佐々木功典, 村上知之. Bromodeoxyuridine 標識による細胞動態の解析. 最新医学 40: 80-84, 1985

15) Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated

bromodeoxyuridine. Proc Natl Acad Sci 80: 5573-5577, 1983
16) Dolbeare F, Beisker W, Pallavicini MG, Vanderlaan M, Gray JW. Cytochemistry for bromodeoxyuridine/DNA analysis: stoichiometry and sensitivity. Cytometry 6: 521-530, 1985
17) 神野正敏. 急性白血病の細胞回転に関する研究. 十全医会誌 101: 663-675, 1992
18) van EP, Brons PP, Boezeman JB, de JG, Bauer FW. A rapid flow cytometric method for bivariate bromodeoxyuridine/DNA analysis using simultaneous proteolytic enzyme digestion and acid denaturation. Cytometry 9: 627-630, 1988
19) Sasaki K, Murakami T, Ogino T, Takahashi M, Kawasaki S. Flow cytometric estimation of cell cycle parameters using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. Cytometry 7: 391-395, 1986
20) Sasaki K, Adachi S, Yamamoto T, Murakami T, Tanaka K, Takahashi M. Effects of denaturation with HCl on the immunological staining of bromodeoxyuridine incorporated into DNA. Cytometry 9: 93-96, 1988
21) 土屋 純, 前川 正. 白血病細胞の細胞回転. 医学の歩み 128: 967-972, 1984
22) Moran R, Darzynkiewicz Z, Staiano CL, Melamed MR. Detection of 5-bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation by monoclonal antibodies: role of the DNA denaturation step. J Histochem Cytochem 33: 821-827, 1985
23) 高橋 学. 抗 BrdU 抗体による DNA 合成細胞の染色理論と方法. フローサイトメトリー 太田和雄 (監修), 第 5 版, 511-520 頁, 癌と化学療法社, 東京, 1994
24) 長島 正. BrdU 標識. フローサイトメトリー 太田和雄 (監修), 第 5 版, 103-112 頁, 癌と化学療法社, 東京, 1994
25) Sasaki K, Murakami T, Takahashi M. A rapid and simple estimation of cell cycle parameters by continuous labeling with bromodeoxyuridine. Cytometry 8: 526-528, 1987
26) Nakamura S, Takeda Y, Kanno M, Yoshida T, Ohtake S, Kobayashi K, Okabe Y, Matsuda T. Application of bromodeoxyuridine (BrdU) and anti-BrdU monoclonal antibody for the in vivo analysis of proliferative characteristics of human leukemia cells in bone marrows. Oncology 48: 285-289, 1991
27) Riccardi A, Danova M, Wilson G, Ucci G, Dormer P, Mazzini G, Brugnatelli S, Girino M, McNally NJ, Ascari E. Cell kinetics in human malignancies studied with in vivo administration of bromodeoxyuridine and flow cytometry. Cancer Res 48: 6238-6245, 1988
28) Riccardi A, Danova M, Dionigi P, Gaetani P, Cebrelli T, Butti G, Mazzini G, Wilson G. Cell kinetics in leukaemia and solid tumours studied with in vivo bromodeoxyuridine and flow cytometry. Br J Cancer 59: 898-903, 1989
29) 大山繁和, 米村 豊, 松本 尚, 津川浩一郎, 岩佐和典, 瀬川正孝, 木村寛信, 鎌田 徹, 竹川 茂, 小坂健夫, 三輪晃一, 宮崎逸夫. One parameter analysis と two parameter analysis の細胞周期解析結果の対比. フローサイトメトリー 9: 52-56, 1989
30) Raza A, Maheshwari Y, Preisler HD. Differences in cell cycle characteristics among patients with acute nonlymphocytic leukemia. Blood 69: 1647-1653, 1987
31) Raza A, Preisler H, Lampkin B, Lykins J, Kukla C, Gartside P, Sheikh Y, Yousuf N, Barcos h MWM. Clinical and prognostic significance of in vivo differentiation in acute myeloid leukemia. Am J Hematol 42: 147-157, 1993
32) Raza A, Yousuf N, Bokhari SA, Abbas A, Raza A, Lampkin B, Pancoast J, Bismater J, Siegrist C, Browman G, Bennett J, Golgberg J, Grunwald H, Larson R, Tricot G, Vogler R, Gartside P, Preisler H. Cell cycle characteristics: alterable determinants of remission duration in a study of 179 standard risk newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia. Int J Oncol 2: 301-307, 1993
33) Giordano M, Danova M, Mazzini G, Gobbi P, Riccardi A. Cell kinetics with in vivo bromodeoxyuridine assay, proliferating cell nuclear antigen expression, and flow cytometric analysis. Prognostic significance in acute nonlymphoblastic leukemia. Cancer 71: 2739-2745, 1993
34) Goz, B. The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells. Pharmacol Rev 29: 249-272, 1978
35) Vidriales MB, Orfao A, Lopez BM, Gonzalez M, Lopez MA, Ciudad J, L opez A, Garcia MA, Hernandez J, Borrego D. Prognostic value of S-phase cells in AML patients. Br J Haematol 89: 342-348, 1995
36) Guerci A, Scheid P, Feugier P, Pierrez J, Frenkiel N, Guerci O. Time-variations of pretreatment peripheral blood S+G2/M-phase size determined by flow cytometry in adult acute myeloid leukaemia. Eur J Haematol 45: 5-10, 1990
37) Bradbury D, Rogers S, Reilly IA, Kozlowski R, Russell NH. Role of autocrine and paracrine production of granulocyte-macrophage colony- stimulating factor and interleukin-1 beta in the autonomous growth of acute myeloblastic leukaemia cells—studies using purified CD34-positive cells. Leukemia 6: 562-566, 1992
38) Raza A, Preisler HD, Day R, Yasin Z, White M, Lykins J, Kukla C, Barcos M, Bennett J, Browman G. Direct relationship between remission duration in acute myeloid leukemia and cell cycle kinetics: a leukemia intergroup study. Blood 76: 2191-2197, 1990
39) Lacombe F, Belloc F, Dumain P, Puntous M, Makhoul PC, Saux MC, Bernard P, Boisseau MR, Reiffers J. Detection of cytarabine resistance in patients with acute myelogenous leukemia using flow cytometry. Blood 84: 716-723, 1994
40) Raza A, Gezer S, Anderson J, Lykins J, Bennett J, Browman G, Goldberg J, Larson R, V ogler R, Preisler HD. Relationship of [3H] Ara-C incorporation and response to therapy with high-dose Ara-C in AML patients: a Leukemia Intergroup study. Exp Hematol 20: 1194-1200, 1992
41) Hunter AE, Rogers SY, Roberts IA, Barrett AJ, Russell N. Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia. Blood 82: 899-903, 1993
42) Löwenberg B, van PW, Touw IP, Delwel R, Santini V. Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. N Engl J Med 328: 614-619, 1993
43) Preisler HD, Raza A. Cell cycle studies in acute

myelogenous leukemia [editorial]. Leukemia 6: 751-753, 1992
44) Ffrench M, Bryon PA, Fiere D, Vu VH, Guyotat D, Extra JM, Viala JJ. Cell-cycle prognostic value in adult acute myeloid leukemia. The choice of the best variables. Leuk Res 10: 51-57, 1986

Studies on the Cell Cycle Kinetics of Cells in Acute Leukemias: Flow Cytometric Analysis by Bromodeoxyuridine Labeling in Vitro Yasuhiro Mochizuki, Department of Internal Medicine (Ⅲ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., **106,** 13－24 (1997)

Key words bromodeoxyuridine, cell cycle, flow cytometry, S phase, potential doubling time

Abstract

In order to clarify the possibility of analyzing in vitro cell cycle kinetics of acute leukemic cells in peripheral bloods (PB) and bone marrows (BM), using bromodeoxyuridine (BrdU) and its monoclonal antibody by flow cytometry, the BrdU-labeling index (BrdU-LI), the duration of DNA synthetic phase (Ts) and the potential doubling time (Tpot) were calculated. Leukemic cells obtained from PB and/or BM of each of twenty five patients were labeled in a conditioned medium consisting of 10 μmol/l BrdU. One sample was labeled for 30 minutes (BrdU labeling index · 1, BrdU-LI · 1) and the other sample for 180 minutes (BrdU-LI · 2). The cells were labeled by direct immunolabeling using fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-BrdU mouse IgG, and counterstained by propidium iodide. Bivariated distribution of BrdU and DNA content were simultaneously determined by flow cytometry. The length of Ts and Tpot was estimated by the regression line obtained by plotting each of both ; values of the BrdU-LI · 1 and BrdU-LI · 2. Both rates of BrdU-LI · 1 and BrdU-LI · 2 of leukemic cells in BM were higher and the duration of Tpot in BM was shorter than in PB in fifteen ANLL patients in whom leukemic cells were obtained simultaneously from PB and BM. BrdU-LI · 1 in BM was only correlated to each of the parameters in PB. In nine patients with acute non-lymphocytic leukemia (ANLL) with differentiation (M2) treated with Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML-92 protocol, the values of Ts and Tpot in patients who achieved complete remission (CR) were significantly lower than those in patients who did not achieve CR. Concerning the relationship between Tpot and the chemotherapy effect, twelve patients, who had ANLL treated with JALSG AML-92 protocol, in whom Tpot of leukemic cells was below median, had longer remission duration and overall survival time than patients above median, although the difference was not statistically significant. The present study demonstrated that the leukemic cells obtained from the BM of patients had significantly greater proliferative activity than those from the PB. From these results, it is suggested that calculating not only the proportion of S phase cells but also Ts and Tpot is essential for analyzing the cell proliferative activity precisely. BrdU-LI · 1 indicating the proportion of S phase cells was an inadequate measure to estimate the accurate proliferative activity of leukemic cells and Ts and Tpot should be calculated simultaneously. Chemotherapy effect and prognosis in ANLL are predictable by analyzing cell cycle parameters in vitro.