

# Cell Kinetic Effects of a Single Treatment with PUVA on Cultured Human Epidermal Keratinocytes

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/8471">http://hdl.handle.net/2297/8471</a>               |

## 培養ヒト表皮ケラチノサイトに対する 8-メトキシソラレン十 長波長紫外線照射の細胞動態学的作用

金沢大学医学部皮膚科学講座 (主任: 広根孝衛教授)

坂 井 秀 彰

フローサイトメトリーにより測定されたS期細胞の分画 (S分画) および G2+M 期細胞の分画 (G2+M 分画), ソーティングして得られた G2+M 分画におけるM期細胞の比率, Sおよび G2+M 分画における Ki-67 陽性細胞の比率およびアクリジンオレンジを用いた DNA・RNA 同時測定結果を含む多重パラメーターを用いて, 培養ヒト表皮ケラチノサイトに対する 8-メトキシソラレン (8-methoxypsoralen, 8-MOP)+長波長紫外線 (long wavelength ultraviolet light, UVA) 照射 (PUVA) 1 回処置の細胞動態学的作用を検討した. PUVA 処置後の培養細胞では, S分画は 2 時間後に減少したのち増加し, 12 時間後にピークに達した. G2+M 分画は 6 時間後まで減少したのち 24 時間後から 120 時間後まで増加したが, 同期間中 G2+M 分画におけるM期細胞の比率の著しい減少が認められた. また, PUVA 処置後の培養細胞では, 48 時間後から 120 時間後まで G2+M 分画における Ki-67 陽性細胞の減少が観察され, 72 時間後から 120 時間後まで RNA 量が比較的少ない細胞が S および G2+M 分画において認められた. 得られた成績から, PUVA は最初細胞の G1 から S 期への進行阻害を起こし, それ解除されるとともに部分的に同調した細胞集団が S 期へ流入し, 通過することが強く示唆された. さらに, PUVA は G2 期における細胞蓄積を誘導すること, また G2 期に蓄積した細胞の多くは細胞周期から離脱して静止状態にある G2 細胞, すなわち G2Q 細胞であることが示唆された.

**Key words** flow cytometry, PUVA therapy, monoclonal antibody Ki-67, epidermal cell kinetics

8-メトキシソラレン (8-methoxypsoralen, 8-MOP)+長波長紫外線 (long wavelength ultraviolet light, UVA) 照射 (PUVA) は表皮の増殖活性の亢進を特徴とする尋常性乾癬に対する有効な治療法として広く臨床応用されてきた<sup>1)2)</sup>. それとともに PUVA の表皮細胞動態に及ぼす影響も実験的に研究されてきた. 従来<sup>3)</sup>の報告では, 試験管内 (in vitro) の実験<sup>3)4)</sup>でも生体内 (in vivo) の実験<sup>5)6)</sup>でも PUVA は正常表皮ケラチノサイトの DNA 合成と核分裂を抑制することが示されているが, しかし, PUVA の増殖抑制作用の機序は充分理解されていない.

著者は, フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) により測定される S および G2+M 期細胞分画の値, ソーティングして得られる G2+M 期細胞分画におけるM期細胞の比率, S および G2+M 期細胞分画における Ki-67 陽性細胞の比率をパラメーターとし, またアクリジンオレンジを用いた DNA・RNA の同時測定を併用して, PUVA 処置後の培養ヒト表皮ケラチノサイトにおける細胞動態学的変化を検討した.

### 材料および方法

#### 1. 細胞培養法

培養ヒト表皮ケラチノサイト (クラボウ, 東京) を 1 フラスコ当たり  $6.0 \times 10^4$  個の密度で  $25\text{cm}^2$  Falcon 組織培養フラスコ (Becton Dickinson, Lincoln Park, U.S.A.) 内で分散培養した.

培養液には, ウシ下垂体エキス (56mg/l), ハイドロコルチゾン (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 表皮成長因子 (0.1ng/ml), インスリン (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ゲンタマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) およびアンホテリシン B (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加した MCDB 153 培養液 (クラボウ) を用いた. 培養液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は 0.15mM に調整した. 培養細胞は 5% 炭酸ガス通気の培養装置内において 37°C で培養した.

#### II. PUVA 処置

対数増殖期にある 3 代目のヒト表皮ケラチノサイトを暗所において 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  8-MOP (Sigma Chemical, St. Louis, U.S.A.) 添加培養液に 37°C で 20 分間浸漬したのち, UVA 0.4J/cm<sup>2</sup> を 1 回照射した. 光源にはブラックランプ 東芝 FL20S-BLB (波長域 300~430nm, ピーク波長 352 $\pm$ 5nm, 東芝, 東京) が 2 本並列した装置を使用した. 照射時には波長 320nm 以下の中波長紫外線を完全に遮断するため紫外線透過フィルター UV-35 (東芝ガラス, 東京) を使用し, フラスコ下面より UVA を照射した. なお, 照射前に毎回紫外線強度計 UVR-305/365 D 型 (東芝光学, 東京) で照射強度を検定した. UVA 照射直後およびその後 24 時間ごとに培養液を交換した. PUVA 処置の直前および 2~120 時間後の種々の時点にトリプシン処理により細胞浮遊液を調整し, FCM に供した. なお, 暗所で 8-MOP 添加培養液に 37°C で 20 分間浸漬したが, UVA を照射しなかった細胞を対照とした.

平成 5 年 8 月 17 日受付, 平成 5 年 9 月 22 日受理

Abbreviations: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCM, flow cytometry; FITC, fluorescein isothiocyanate; 8-MOP, 8-methoxypsoralen; PBS, phosphate buffered saline; PI, propidium iodide; PUVA, 8-methoxypsoralen+long wavelength ultraviolet light; UVA, long wavelength ultraviolet light

### III. 細胞数の算定

コールターカウンター Model D (Coulter Electronics Co., Hialeah, U.S.A.) を用いて 1 フラスコ当りの細胞数を算定した。生細胞数はトリパンブルーで染色されない細胞を生細胞として算定した。また、交換した培養液中の浮遊細胞をトリパンブルーで染色し、死細胞数を算定した。

### IV. Ki-67 抗原と DNA の同時測定

細胞を  $-20^{\circ}\text{C}$  冷アセトンで 30 分間固定し、冷  $0.01\text{M}$  リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で洗浄後、 $4\%$  正常ウサギ免疫グロブリンに 5 分間浸漬し、引き続きモノクローナル抗体 Ki-67 (希釈度  $1:20$ ) (Dakopatts, Glostrup, Denmark) に室温で 1 時間浸漬した。PBS で洗浄後、2 次抗体としてイソチオシアン酸フルオレセイン (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗マウス IgG 抗体 (希釈度  $1:20$ ) (Dakopatts) に室温で 30 分間浸漬、次いで  $0.1\%$  RNA 分解酵素 (Type II-A, Sigma Chemical) 含有 PBS に  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間浸漬、沃化プロピジウム (propidium iodide, PI) (Sigma Chemical)  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  含有 トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で 1 時間染色した。凝集した細胞を除去するため、FCM 測定の直前に浮遊細胞を  $40\mu\text{m}$  ナイロンメッシュで濾過した。Ki-67 および DNA の同時測定にはフローサイトメーター FCS-1 型 (日本分光, 東京) を使用した。488nm アルゴンレーザーで励起された FITC の緑色蛍光 (Ki-67 抗原) は  $530\text{nm}$  バンドパスフィルターを用いて、PI の赤色蛍光 (DNA) は  $600\text{nm}$  ロングパスフィルターを用いて同時測定を行った。毎回約 30,000 個の細胞を測定した。

G1 期細胞分画 (G1 分画), S 期細胞分画 (S 分画), G2+M 期細胞分画 (G2+M 分画) の値は、フローサイトメーターに直結したコンピューターを用いて DNA ヒストグラムから算定し、いずれも全細胞数に対する百分率で表した。解析試料のすべてにおいて、G1 ピークの変動係数 (coefficient of variation, CV) の値は  $5\%$  以下であった。

Ki-67 陽性細胞数の算定に関しては、まず 2 次抗体 (FITC 標識抗マウス IgG 抗体) のみで処理された対照細胞の蛍光の強さを測定し、次にこのレベルの蛍光を示す細胞を Ki-67 陰性細胞、このレベル以上の蛍光を示す細胞を Ki-67 陽性細胞と判定し、その細胞数を算定した。S および G2+M 分画における Ki-67 陽性細胞の比率は、いずれも各分画の細胞数に対する百分率で表した。

### V. RNA と DNA の同時測定

FCM で細胞の RNA と DNA を同時に測定するため、Traganos ら<sup>9)</sup>の方法に従い細胞をアクリジンオレンジで染色した。すなわち、 $10\%$  ウシ胎児血清添加培養液で細胞数が  $2 \times 10^6/\text{ml}$  の細胞浮遊液を調整し、この細胞浮遊液  $0.2\text{ml}$  を  $0.1\%$  トライトン X-100 (Sigma Chemical),  $0.08\text{M}$  塩酸,  $0.15\text{M}$  塩化ナトリウムおよび  $0.1\text{mM}$  エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (和光純薬, 大阪) を含む溶液  $0.4\text{ml}$  に加え  $0^{\circ}\text{C}$  で 30 秒間浸漬した。引き続き  $6\mu\text{g}/\text{ml}$  アクリジンオレンジ (Sigma Chemical),  $1\text{mM}$  EDTA および  $0.15\text{M}$  塩化ナトリウムを含むクエン酸 ( $0.1\text{M}$ ) リン酸塩 ( $0.2\text{M}$ ) 緩衝液 (pH 6.0) を用いて室温で 5 分間染色し、フローサイトメーターで測定した。488nm アルゴンレーザーで励起された緑色蛍光 (DNA) は  $530\text{nm}$  バンドパスフィルターを用いて、赤色蛍光 (RNA) は  $630\text{nm}$  ロングパスフィルターを用いて同時測定を行った。

### VI. G2+M 分画における M 期細胞の解析

フローサイトメーターを用いて G2+M 期細胞のソーティングを行い、採取した細胞をスライドグラス上に塗抹し、ヘマトキシリン染色を行った。光学顕微鏡で約 500 個検索し、分裂前期から分裂後期までの核分裂像を示す細胞数を求め、M 期細胞の比率を全 G2+M 期細胞数に対する百分率で表した。

### VII. 統計学的処理

同一条件の実験はすべて 4 回行い、得られた値はすべて平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SEM) で表した。2 群の平均値の差は Wilcoxon 順位和検定を用いて検定した。  $p < 0.05$  を有意とした。

## 成 績

### I. PUVA 処置後の細胞増殖の変化

図 1 に示したように、PUVA 処置を行った培養ヒト表皮ケラチノサイトの細胞数は 24 時間後から 120 時間後まで対応する対照の細胞数より有意に少なく、120 時間後には PUVA 処置細胞の数は対照細胞の  $20\%$  であり、PUVA 処置による細胞増殖の抑制が認められた。なお、144 時間後に対照細胞は単層を形成したが PUVA 処置細胞は単層を形成するに到らなかった。

図 2 に示したように、PUVA 処置を行った培養細胞では、48 時間後まで培養液中に浮遊細胞はほとんど認められなかったが、72 時間後以降 24 時間毎に 1 フラスコ当り  $1 \sim 2 \times 10^4$  個の浮遊細胞がみられた。それらの浮遊細胞はすべてトリパンブルーにより染色される死細胞であった。なお、対照では 120 時間後まで培養液中に浮遊細胞はほとんど認められなかった。

### II. PUVA 処置後の細胞周期分布の変動

PUVA 処置後の培養細胞における S および G2+M 分画の値はいずれも対応する対照細胞の値に対する百分率で表した。なお、対照細胞の S および G2+M 分画はそれぞれ  $32.0 \pm 0.3\%$ ,  $11.3 \pm 0.3\%$  で、実験期間中はほぼ一定の値を示し、有意の変動は認められなかった。

図 3 に示したように、PUVA 処置後の培養細胞における S 分画の値は、対応する対照値と比べて、2 時間後に軽度のしかし有意の低下を示したのち増加し、12 時間後には有意に高くなり、約  $200\%$  のピークを示した。その後 S 分画値は急速に減少し、48 時間後には対照レベルに戻った。PUVA 処置後の培養細胞における G2+M 分画の値は、対応する対照値と比べて、2 時間後および 6 時間後に軽度のしかし有意の低下を示した。その後増加し、24 時間後から 120 時間後まで有意に高く、48 時間後に約  $270\%$  のピークを示した。実験期間中のどの時点においても多倍体 (polyploid) 細胞は認められなかった。

### III. G2+M 分画における M 期細胞数の変動

PUVA 処置後の培養細胞の G2+M 分画における M 期細胞の比率は対照の値に対する百分率で表した。なお、対照の G2+M 分画における M 期細胞の比率は  $36.0 \pm 0.3\%$  で、実験期間中はほぼ一定の値を示した。

図 4 に示したように、PUVA 処置後の培養細胞の G2+M 分画における M 期細胞の比率は、対照値と比べて、2 時間後および 6 時間後には軽度のしかし有意の低下を示し、12 時間後から 120 時間後まで著しい減少を示し、120 時間後には対照値の  $25.7\%$  に減少した。

### IV. Ki-67 抗原と DNA の同時測定

PUVA 処置後の培養細胞の S および G2+M 分画における

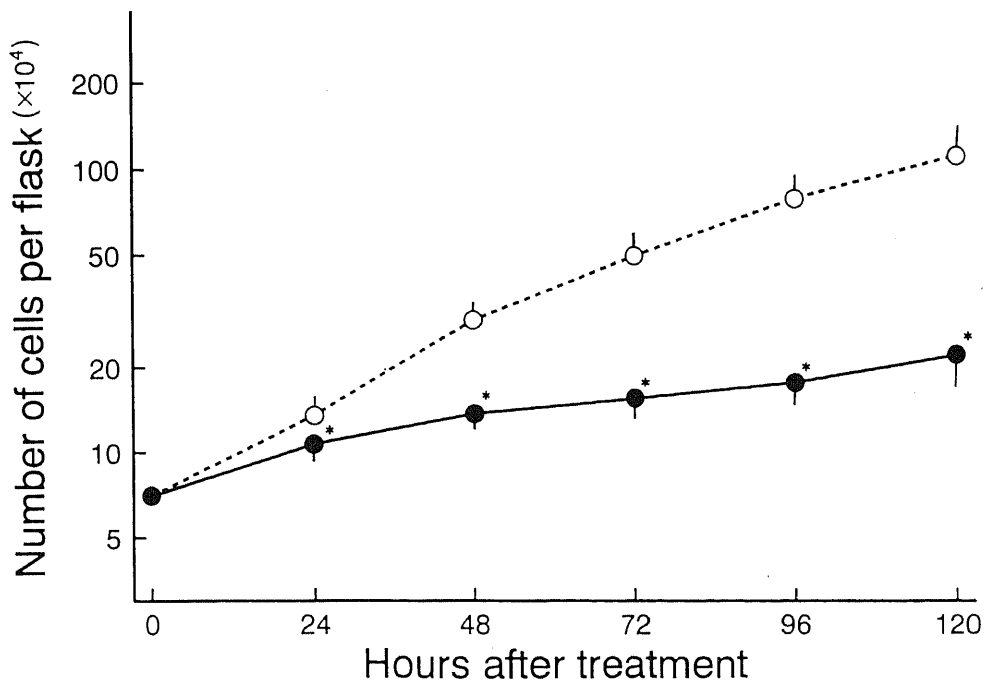


Fig. 1. Growth of control (○-----○) and PUVA-treated (●-----●) cultures. Each value represents mean  $\pm$  SEM (n=4). \*p<0.05 compared to control by Wilcoxon rank sum test.

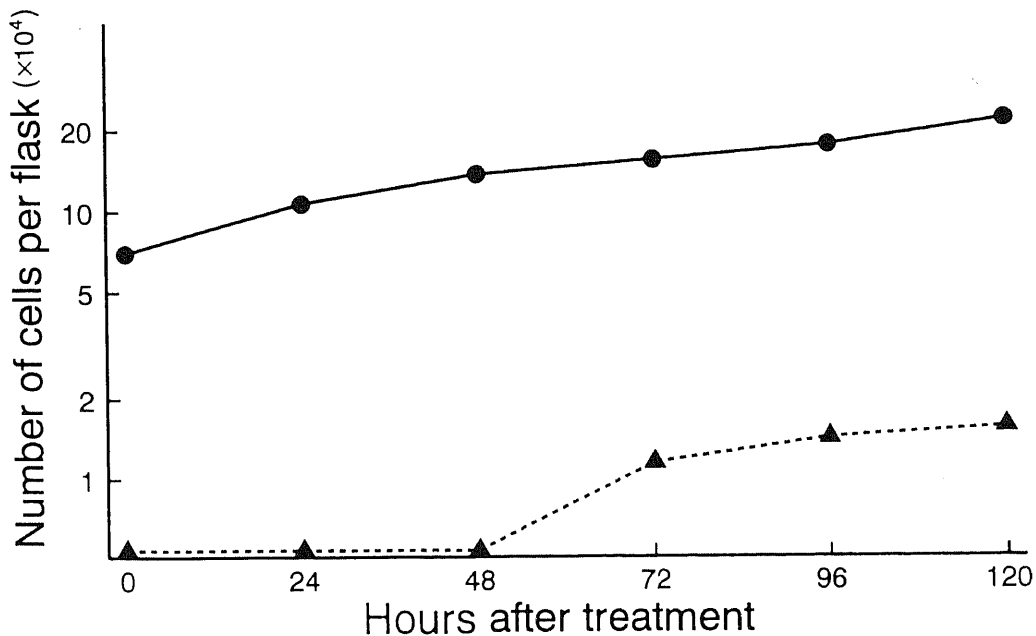


Fig. 2. Changes in the number of viable cells (●-----●) and floating non-viable cells (▲-----▲) after a single treatment with PUVA 0.4J/cm<sup>2</sup>. Each value represents mean (n=4).

Ki-67 陽性細胞の比率はいずれも対応する対照の値に対する百分率で表した。なお、対照のSおよびG2+M分画におけるKi-67抗原の陽性率はそれぞれ93.5~97.5%, 92.5~96.5%であった。

図5に示したように、PUVA処置後の培養細胞のS分画におけるKi-67陽性細胞の比率は24時間後まで対照とほぼ同じレベルを示したが、48時間後から96時間後まで軽度には有意に低下し、120時間後には対照レベルに戻った。G2+M分画におけるKi-67陽性細胞の比率は24時間後までは対照とほぼ同じ

レベルを示したが、48時間後から120時間後まで有意に減少し、72時間後から120時間後まで対照値の37~48%に減少した。

#### V. RNA と DNA の同時測定

図6に示すように、対照細胞ではDNA量の増加とともにRNA量もほぼ直線的に増加し、4倍体(4C)細胞は2倍体(2C)細胞のほぼ2倍のRNA量を示した。これに対して、PUVA処置後の培養細胞では、48時間後まで対照におけると同様のパターンを示す細胞群のみ見られたが、72時間後から120時間後まで典型的パターンを示す細胞群とは別にS(2C<

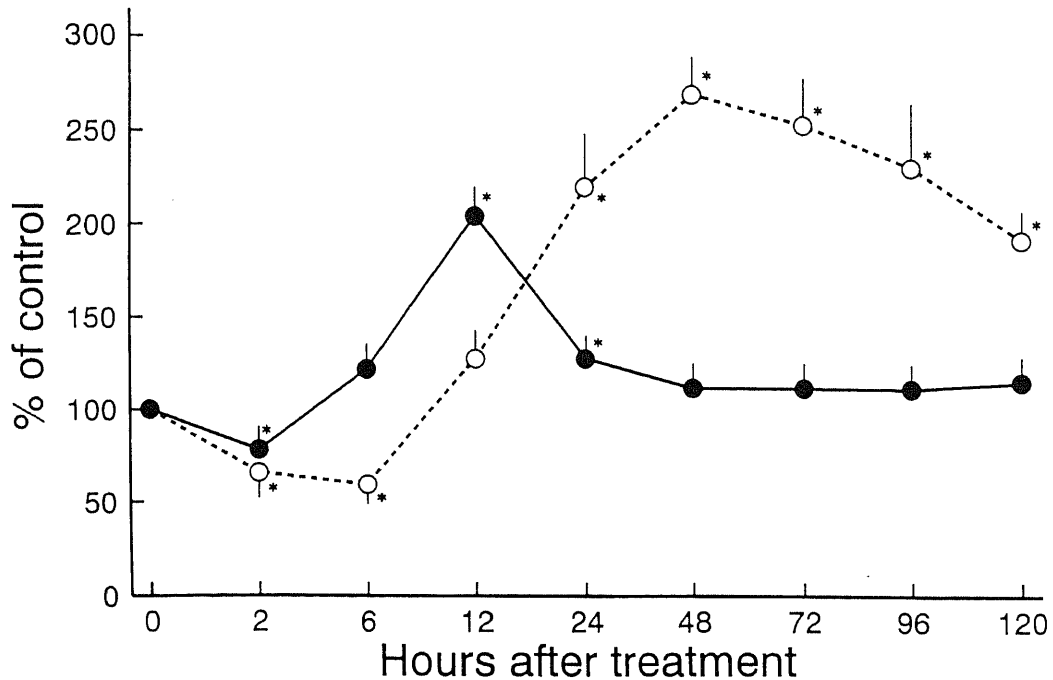


Fig. 3. Changes in the proportion of S phase cells (●—●) and G2+M phase cells (○-----○) after a single treatment with PUVA 0.4J/cm<sup>2</sup>. Each value represents mean±SEM (n=4). \*p<0.05 compared to control by Wilcoxon rank sum test.

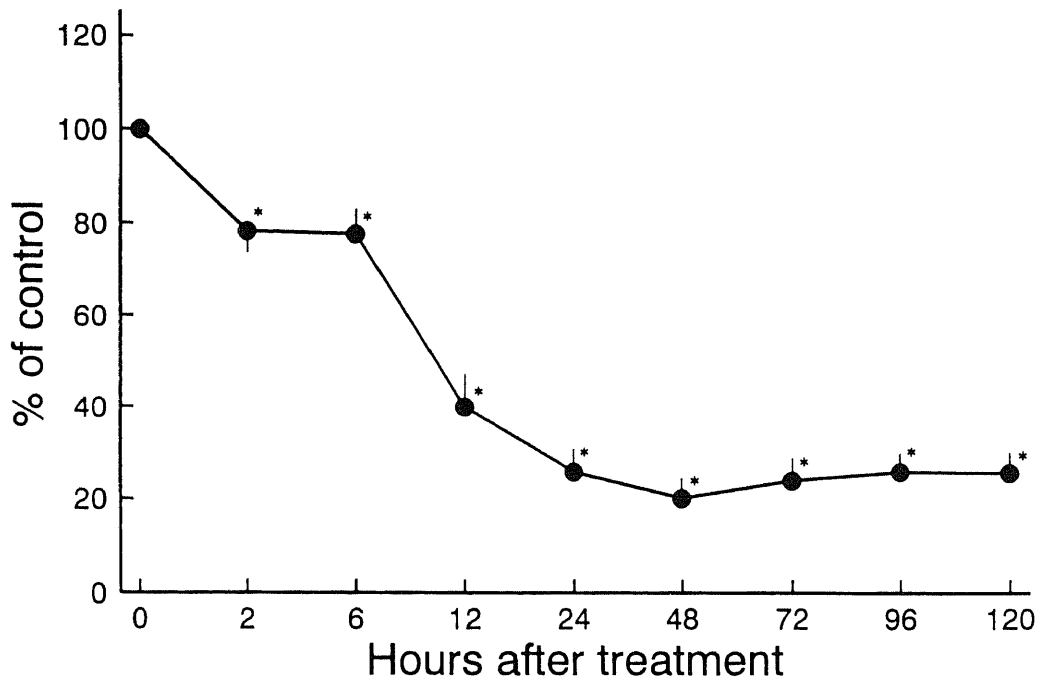


Fig. 4. Changes in the proportion of M phase cells in G2+M compartment after a single treatment with PUVA 0.4J/cm<sup>2</sup>. Each value represents mean±SEM (n=4). \*p<0.05 compared to control by Wilcoxon rank sum test.

<4C) および G2+M 期 (4C) の DNA 量を有するが縦軸の方向に偏向した細胞群, すなわち S および G2+M 期の細胞で RNA 量が比較的少ない細胞群が検出された。120時間後の時点では, RNA 量が比較的少ない細胞の大多数は G2+M 期に存在した。

#### 考 察

PUVA の表皮に対する細胞動態学的作用は近年に到るまで明確ではなかった。約20年前, Walter ら<sup>3)</sup>は器官培養されたマウス表皮において PUVA 処置後早期に DNA 合成の減少が起

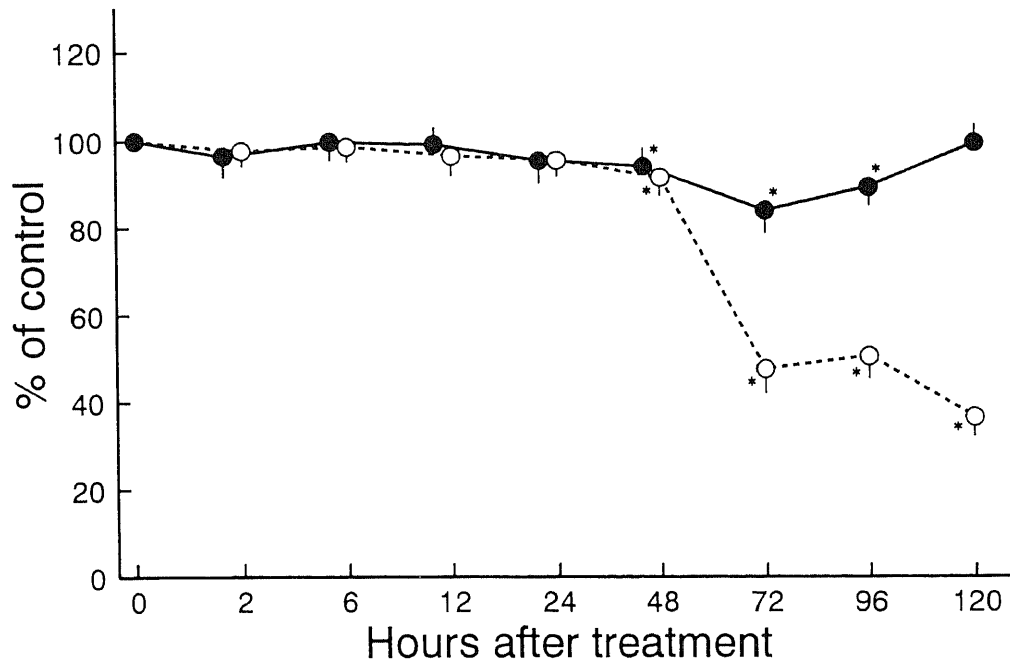


Fig. 5. Changes in the proportion of Ki-67 positive cells in the S compartment (●—●) and G2+M compartment (○-----○) after a single treatment with PUVA 0.4J/cm<sup>2</sup>. Each value represents mean±SEM (n=4). \*p<0.05 compared to control by Wilcoxon rank sum test.

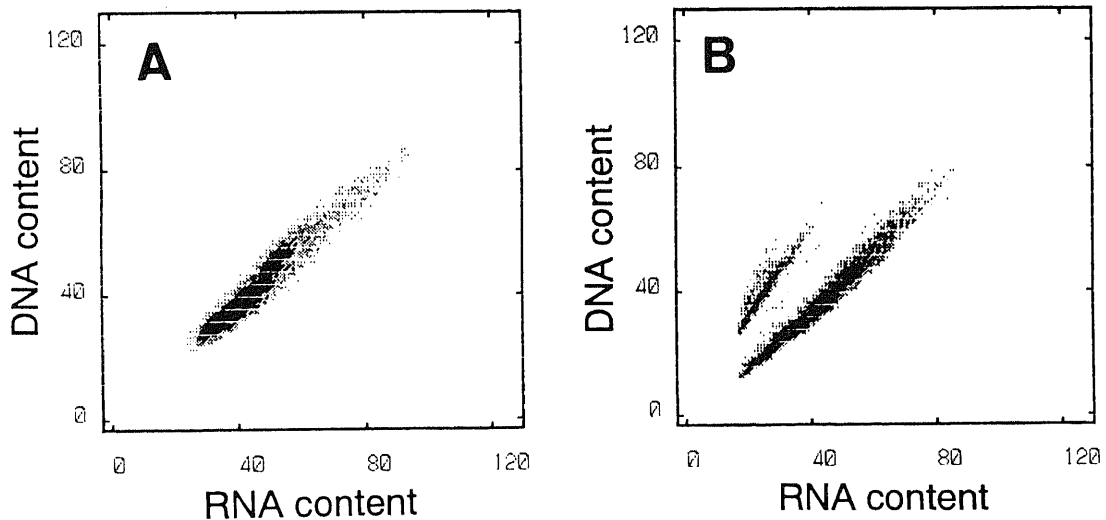


Fig. 6. The dot-plot distribution of fluorescence intensities relating to RNA and DNA content of individual cells in control cultures (A) and PUVA-treated cultures (B) at 72 hr after PUVA treatment. Channel 30 and 60 correspond to 2C and 4C DNA content, respectively.

こることを観察し、PUVA の細胞動態学的作用を初めて示唆した。その後、Epstein ら<sup>9</sup>は、マウス表皮において PUVA 処置後表皮の DNA 合成は最初の数時間抑制されるが、24時間後から数日間逆に亢進することを報告した。Pullmann ら<sup>9</sup>は、モルモット表皮において PUVA 処置後チミジン標識指数が短時間減少したのち増加することを観察し、そのような変化は PUVA 処置により起こる G1-S 境界ブロックによる S 期細胞の減少と同ブロック解除後の S 期細胞の増加によるものと推測した。しかし、彼らが利用した指標は標識指数だけであったため、G2 期および M 期の細胞の変動に関する情報は得られなかった。

PUVA の細胞動態学的作用の解明を目的とした試験管内実験も報告されている。Johnsen ら<sup>4</sup>は、培養ヒト表皮ケラチノサイトに PUVA1J/cm<sup>2</sup> 照射を行い、処置後細胞増殖の抑制と M 期細胞の減少が起こり、また多倍体細胞が認められたと報告している。Hyodo ら<sup>10</sup>は、マウス乳がん細胞の樹立株 (FM3A) に PUVA0.1~0.5J/cm<sup>2</sup> 照射を行い、12~30時間後に DNA ヒストグラムの G2+M ピークはより高くなるが同時期に核分裂指数はほとんど増加しないことを観察し、細胞は G2 期で停止するものと推測している。

この問題を解明するため、われわれの教室でも一連の実験成績を報告してきた。東<sup>7</sup>は、モルモット表皮に PUVA1J/cm<sup>2</sup> 1

回照射を行い、処置後表皮の標識指数は6時間後まで低下したのち増加するがS分画値は初期の減少を示すことなく12時間後より標識指数に平行して増加すること、また核分裂指数は24時間後まで低下し、3日後正常対照レベルに戻り、7日後正常対照の2倍になるが、G2+M分画値は24時間後まで低下後急激に増加して3~7日後に正常対照の20倍以上になることを観察した。またその結果から、PUVA処置後部分的に同調した細胞はS期を通過してG2期に流入するが、G2-M境界ブロックのため3~7日後の期間G2期に蓄積することを示唆した。筒井<sup>9)</sup>は、テープストリッピングにより増殖活性の亢進したモルモット表皮にPUVA0.5~1J/cm<sup>2</sup>1回処置を行い、正常表皮にPUVA処置を行った場合と比べて、同調細胞のS期への流入もG2期への流入もより早く起こること、またG2-M境界ブロックはより長く続き、G2蓄積はより顕著となることを示した。これらの実験成績では、しかし、PUVAによりG2蓄積が起こる理由は依然不明であった。

著者の実験成績は東<sup>7)</sup>および筒井<sup>9)</sup>の観察の確認とともに若干の新知見を提供した。FCMによるDNAヒストグラムの解析結果は、PUVA処置の直後にS期細胞の減少が起こることを示し、細胞がG1期で停止することを強く示唆している。引き続いて起こるS期細胞の増加は、G1ブロックが解除されるとともに部分的に同調した細胞集団がDNA合成を開始することを示唆している。

また、PUVA処置直後のG2+M期細胞は短時間の減少を来し、同時にG2+M分画におけるM期細胞の比率は軽度の減少を示した。これはPUVA処置の直後にM期への細胞流入の不完全ブロックによってM期細胞が減少することを明確に示すものである。次いで、S期細胞が減少するとともにG2+M分画におけるM期細胞の比率の著しい減少を伴うG2+M期細胞の増加が起こり、その状態は24時間後から120時間後まで観察された。これらの所見から、24時間後以降に観察されたG2+M期細胞の増加は実は主にG2期における細胞蓄積によるものであること、またこのG2蓄積はS期からG2期への継続的過剰流入によるのではなくG2期からM期へ入る流入率の減少によることが明らかにされた。

本実験では、さらにFCMによりKi-67抗原とDNAの同時測定を行った結果、PUVA処置を行った培養細胞では48時間後から120時間後までG2+M分画におけるKi-67陽性細胞が著しく減少することが示された。従って48時間後以降にはG2+M分画中にKi-67陰性細胞が著しく増加したことは明らかであるが、既に述べたように48時間後以降の時期にはG2+M分画に含まれる細胞の多くはG2期細胞であるから、これらの所見を併せ考えると、Ki-67陰性G2期細胞が著しく増加したことになる。なお、S分画でもKi-67陽性細胞の軽度の減少が起こったが、これは一過性的変動であった。

近年、Darzynkiewiczら<sup>11)12)</sup>はフローサイトメーターによるRNA・DNA同時測定法を用いてマイトジェンにより刺激された培養ヒトリンパ球を検索し、大多数のリンパ球(G1期細胞)はマイトジェンに反応するが少数のリンパ球は反応しないこと、またマイトジェンに反応するG1期細胞と比べて反応しないG1期細胞はRNA量が少ないことを観察し、マイトジェンに反応しない低RNA量の細胞は細胞周期から離脱したG1期細胞、すなわち静止状態のG1期細胞と考え、これをG1Q細胞と称した。また対数増殖期にある白血病細胞株(FL cell)を

ジメチルスルホキシドの存在下で培養するとSおよびG2期のDNA量を有するがRNA量の低下した細胞が出現することを示し、それらはSQ、G2Q細胞であろうと述べている。なお、彼らはSQおよびG2Q細胞はいずれも通常細胞周期内に再び参入し得るものと考えている。次いでDrewinkoら<sup>13)</sup>は、培養ヒト大腸がん細胞の増殖曲線が平坦化したのちでもSおよびG2期のDNA量をもつ細胞が存在し、継代培養すると再び対数増殖期に入ることを報告し、SQおよびG2Q細胞の存在を示唆した。Gerdesら<sup>14)</sup>は、マイトジェンにより刺激された培養ヒトリンパ球を対象として細胞周期とKi-67抗原の関連を検討し、細胞周期を回転しているG1、S、G2およびM期細胞はすべてKi-67陽性であるがG0期細胞は陰性であることを示した。Baischら<sup>15)</sup>はフローサイトメーターによるKi-67抗原・DNA同時測定法を用いて増殖曲線が平坦化した時期の培養組織球を検索し、SおよびG2期のDNA量を有するがKi-67陰性の細胞を検出し、これらの細胞がSQおよびG2Q細胞である可能性を示唆した。Sasakiら<sup>16)</sup>もまたフローサイトメーターによるKi-67抗原・DNA同時測定法を用いてHeLa細胞の細胞増殖とKi-67抗原発現との関係を検討し、血清無添加培地では増殖活性の低下とともにG1期細胞だけでなくSおよびG2期細胞中にKi-67陰性細胞が出現し、増加することを報告した。そして、これらのKi-67陰性のSおよびG2期細胞をSQおよびG2Q細胞とみなしている。

本実験では、PUVA処置後の培養細胞において、SおよびG2期細胞でRNA量の比較的少ないものが検出された。またSおよびG2期細胞でKi-67陰性のものが存在することが明らかにされた。Ki-67陰性G2期細胞が低RNA含有G2期細胞と一致するという直接的証拠はないけれども、おそらく両者は同一の細胞であり、それらはG2Q細胞と思われる。このように、PUVA処置後一定時間を経てG2期に蓄積する細胞の多くはG2Q細胞であると推測された。なお、PUVA処置の72時間後以降に培養上清中に死細胞が多数浮遊してくることから、G2Q細胞のなかには細胞周期へ再参入せず死滅するものもありうるように思われた。

## 結 論

PUVA0.4J/cm<sup>2</sup>1回処置後の培養ヒト表皮ケラチノサイトにおける細胞動態学的変化をFCMにより得られた多重パラメーターを用いて検討した。得られた結果は次のようである。

1. PUVA処置後の培養細胞では細胞増殖の著しい抑制がみられた。
2. PUVA処置後の培養細胞では、S分画は処置の直後に短時間減少し、その後増加して12時間後にピークを示した。
3. PUVA処置細胞のG2+M分画は処置の直後に短時間減少し、次いで24時間後から120時間後まで増加したが、同期間中G2+M分画におけるM期細胞は著明に減少した。
4. PUVA処置細胞では48時間後から120時間後までG2+M分画におけるKi-67陽性細胞は著しく減少した。
5. PUVA処置細胞では72時間後から120時間後までSおよびG2+M分画の細胞中にRNA量の比較的少ないものが検出された。120時間後にRNA量が比較的少ない細胞の大多数はG2+M分画の細胞であった。

得られた結果から、PUVA処置の直後に細胞はG1期で停止するが、G1ブロック解除後部分的に同調した細胞集団がS期

に流入することが示唆された。さらに、PUVA は G2 期における細胞蓄積を誘導すること、また G2 期に蓄積した細胞の多くは G2Q 細胞であることが示唆された。

### 謝 辞

本論文の要旨は第92回日本皮膚科学会学術大会(平成5年, 岐阜市)において発表した。

稿を終るにあたり, 御指導および御校閲いただきました広根孝衛教授, ならびに御助言いただきました川原 繁講師に深甚の謝意を表します。

### 文 献

- 1) Parrish, J. A., Fitzpatrick, T. B., Tanenbaum, L. & Pathak, M. A.: Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *New. Engl. J. Med.*, 291, 1207-1211 (1974).
- 2) 水野信行, 大野盛秀, 植松茂生: 尋常性乾癬の 8-Methoxypsoralen 光療法. *日皮会誌*, 85, 577-586 (1975).
- 3) Walter, J. F., Voorhees, J. J., Kelsey, W. H., Duell, E. A. & Mich, A. A.: Psoralen plus black light inhibits epidermal DNA synthesis. *Arch. Dermatol.*, 107, 861-865 (1973).
- 4) Johnsen, A. S., Digernes, V. & Rugstad, H. E.: Effect of PUVA on a human skin epithelial cell line. *Virchows Arch.*, 37, 61-69 (1981).
- 5) Epstein, J. H. & Fukuyama, K.: Effects of 8-methoxypsoralen-induced phototoxic effects on mammalian epidermal macromolecule synthesis in vivo. *Photochem. Photobiol.*, 21, 325-330 (1975).
- 6) Pullman, H., Galosi, A., Jakobeit, C. & Steigleder, G. K.: Effects of selective ultraviolet phototherapy (SUP) and local PUVA treatment on DNA synthesis in guinea pig skin. *Arch. Dermatol. Res.*, 267, 37-45 (1980).
- 7) 東 晃: 8-MOP+長波長紫外線照射後のモルモット皮膚における表皮細胞動態の変動. *十全医会誌*, 95, 748-757 (1986).
- 8) 筒井清広: Tape stripping により増殖活性の亢進したモルモット表皮に対する PUVA 1 回処置の細胞動態学的作用. *日皮会誌*, 100, 1415-1421 (1990).
- 9) Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Sharpless, T. K. & Melamed, M. R.: Erythroid differentiation of Friend leukemia cells as studied by acridine orange staining and flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 382-389 (1979).
- 10) Hyodo, M., Fujita, H., Suzuki, K., Yoshino, K., Matsuo, I. & Ohkido, M.: DNA replication and cell-cycle progression of cultured mouse FM3A cells after treatment with 8-methoxypsoralen plus near-UV radiation. *Mutat. Res.*, 94, 199-211 (1982).
- 11) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F. & Melamed, M. R.: New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry*, 1, 98-108 (1980).
- 12) Darzynkiewicz, Z. & Traganos, F.: RNA content and chromatin structure in cycling and noncycling cell populations studied by flow cytometry. *In* G. M. Padilla & K. S. McCarty (eds.), *Genetic Expression in the Cell Cycle*, 1st ed., p103-128, Academic Press, New York, 1982.
- 13) Drewinko, B., Yang, L. Y., Barlogie, B. & Trujillo, J. M.: Cultured human tumour cells may be arrested in all stages of the cycle during stationary phase: demonstration of quiescent cells in G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub> phase. *Cell Tissue Kinet.*, 17, 453-463 (1984).
- 14) Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., 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).
- 15) Baisch, H. & Gerdes, J.: Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet.*, 20, 387-391 (1987).
- 16) Sasaki, K., Matsumura, K., Murakami, T., Shinozaki, F. & Takahashi, M.: Effect of serum deprivation on Ki-67-reactive antigen expression in HeLa cells. *Acta Pathol. Jpn.*, 39, 638-642 (1989).



**Cell Kinetic Effects of a Single Treatment with PUVA on Cultured Human Epidermal Keratinocytes** Hideaki Sakai, Department of Dermatology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 627—634 (1993)

**Key words** flow cytometry, PUVA therapy, monoclonal antibody Ki-67, epidermal cell kinetics

#### **Abstract**

The present study investigated the effects of a single treatment with 8-methoxypsoralen (8-MOP)+long wavelength ultra-violet light (PUVA) on cultured human epidermal keratinocytes. Flow cytometry was used to determine the proportions of cells in S and G2+M phase. The simultaneous measurement of Ki-67 antigen and DNA content was used to estimate the proportions of Ki-67-positive cells in S and G2+M compartments following PUVA. The sorting analysis was used to estimate the proportion of M-phase cells in the G2+M compartment. For simultaneous measurement of RNA and DNA content of individual cells by flow cytometry, cells were stained with acridine orange. The growth curve from PUVA-treated cultures was significantly lower than that of the untreated control cultures until 120 hr after treatment. After PUVA treatment, a slight decrease at 2 hr, followed by a marked increase with a peak at 12 hr, was observed in the number of S-phase cells. PUVA caused a slight decrease from 2 to 6 hr in the number of cells in the G2+M phase, together with a decrease in the proportion of M-phase cells in the G2+M compartment. Thereafter, an increasing number of cells was observed in the G2+M phase from 24 to 120 hr, accompanied by a marked decrease in the proportion of M-phase cells in the G2+M compartment. A decrease in the number of Ki-67-positive cells in the G2+M compartment was observed in PUVA-treated cultures from 48 to 120 hr. A considerable number of cells with lower RNA content were observed in the S and G2+M compartment from 72 to 120 hr. The evidence strongly suggests that PUVA causes an initial blocking of cells in the G1 phase, and that when the partial G1 block is released, a large number of cells pass through the S phase in partial synchrony. It is also suggested that PUVA induces an accumulation of cells in the G2 phase, and that many of the cells accumulating in the G2 phase may be G2Q cells.