

# Studies on the Cell Cycle of Acute Leukemic Cells: Flow Cytometric Analysis by in vivo Administration of Bromodexyuridine

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8379">http://hdl.handle.net/2297/8379</a>

## 急性白血病細胞の細胞回転に関する研究

—フローサイトメトリーを用いた生体内での解析—

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

神 野 正 敏

(平成4年6月26日受付)

生体内における急性白血病細胞の細胞回転を解析する目的で、チ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) 法による検討を行った。細胞増殖動態の指標として骨髄中の急性白血病細胞の、DNA 合成期 (synthetic phase, S 期) 比率を表す BrdU 標識率 (BrdU-labeling index, BrdU-LI), DNA 合成期時間 (the duration of synthetic phase, Ts) および理論的倍化時間 (the potential doubling time, Tpot) を選び解析した。対象は、本研究の主旨に同意の得られた、急性白血病患者22例である。BrdU-LI を測定するため、化学療法施行前に 200mg/m<sup>2</sup> の BrdU を一度に静脈内投与した後、30分後に骨髄細胞を採取した。細胞を -20℃ の 70% 冷エタノールで固定し、2N 塩酸で DNA 変性処理を行った後、抗 BrdU MoAb を用いて免疫蛍光抗体法間接法により染色した。さらに、プロピディウム・アイオダイド (propidium iodide, PI) にて染色し、FCM (EPICS-CS) を用いて BrdU の標識細胞およびその DNA 量の分布を同時に測定した。対象とした22例の BrdU-LI は2.4%から18.2%、平均値10.4%であり DNA ヒストグラムから計算されたS期細胞比率より有意に低値であった。この差はS期に相当する DNA 量を有しながら DNA 合成を行っていない、いわゆる quiescent (S<sub>0</sub>) 細胞の存在に起因していると考えられた。BrdU 投与30分後の標識率 (BrdU-LI・1) に加えて、1回目の骨髄穿刺後に再び 200mg/m<sup>2</sup> の BrdU を150分かけて持続点滴し、2回目の骨髄穿刺を行い、1回目の BrdU 投与から持続点滴終了までの間に増加した標識率 (BrdU-LI・2) を測定した。Ts と Tpot はこの2回の BrdU-LI 値、すなわち BrdU-LI・1 と BrdU-LI・2 をプロットすることによって得られた回帰直線をもとに算出された。これらの結果は、他の方法により算定された値とほぼ一致していた。BrdU-LI と化学療法効果および再発との相関について検討したところ、完全寛解 (complete remission, CR) 到達群の標識率は非寛解 (failure) 群の標識率より有意に低かった。また、再発 (relapse) 群の初回治療前の標識率は、寛解維持群の標識率に比べ高い傾向にあったが、有意な差はなかった。FCM による BrdU 標識と DNA 量の同時測定は、生体内における細胞回転の指標を、従来の方法よりも正確に簡便かつ迅速に解析できる有用な方法である。

**Key words** acute leukemia, bromodeoxyuridine, cell cycle, flow cytometry, S phase

腫瘍を特徴づける最大の性質は細胞の異常増殖であり、その発育速度や増殖動態の解析は、腫瘍の基礎的研究のみならず臨床でも治療法の決定、予後の推定などに極めて有用である。1960年代よりオートラジオグラフィが普及し、トリチウムチミジン (tritiated thymidine, <sup>3</sup>H-TdR) を用いた細胞増殖動態の研究が盛んになり、種々の腫瘍について細胞増殖動態の解析が試みられた<sup>1)~3)</sup>。しかし、この方法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にさまざまな制約があり、個々の腫瘍についての検討結果を臨床に利用することは不可能であった。また、白血病においては、各々の腫瘍細胞が血液中に遊離した状態にあり、検体の採取が容易で、しかも大量の細胞を解析できるため比較的検討が進んでいる。しかし、生体内 (in vivo) における白血病細胞の増殖動態を解析するためには、<sup>3</sup>H-TdR などの放射性同位元素で標識した核酸前駆物質を直接

体内に注入することが必要であり、生体への影響を考慮し、一部の報告を除いて生体外 (in vitro) で検討されていたにすぎなかった<sup>3)~7)</sup>。

1981年、Gratzner ら<sup>8)9)</sup>によりチミジンの同族体であるブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) に対するモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) が開発され、DNA 合成期 (synthetic phase, S 期) に存在する細胞を容易に同定できるようになった。BrdU は取り込まれた細胞の放射線に対する感受性が高まることから、臨床上放射線増感剤として脳腫瘍、頭頸部腫瘍の治療に用いられている薬剤である<sup>10)</sup>。本剤は直接生体内への投与が可能であることから、これを用いて白血病をはじめとする各種腫瘍の生体内での増殖動態の解析が可能になった<sup>11)~13)</sup>。

BrdU とそれに対する MoAb を用いて行う細胞増殖動態の解

Abbreviations: ALL, acute lymphocytic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; AMMoL, acute myelomonocytic leukemia; AMoL, acute monocytic leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; AUL, acute unclassified leukemia; BrdU, bromodeoxyuridine; BrdU-LI, BrdU-labeling index; CR, complete remission; CV, coefficient of variation; FAB, French-American-British classification; FCM, flow cytometry;

析法としては、免疫組織化学的方法<sup>12)</sup>と蛍光抗体法によるフローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) 法<sup>14)15)</sup>とがある。前者は各々の細胞を直接顕微鏡下で観察しながら計測するために、腫瘍細胞と正常細胞の区別が容易であり、細胞数の少ない検体や、腫瘍細胞の占める割合の低い検体にも利用できる。特に急性白血病では、正常骨髄細胞に混じって、少数の白血病細胞しか見られない例 (低比率白血病)、あるいは骨髄が低形成であるために一定量の細胞の採取ができない例 (低形成性白血病) での解析には免疫組織化学的方法は極めて有用である<sup>16)~18)</sup>。これに対し後者は、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、急性白血病で十分な細胞数が得られ、有核細胞の大部分が白血病細胞で占められている場合の解析には優れた方法である。

FCM に用いる機器は1968年に開発されたが、その測定速度は早く、また測定精度は高く、画期的な装置といえる<sup>19)</sup>。これまでのFCMに関する報告は、細胞動態の一時点のみをとらえたものが多かったが、BrdU およびこれの MoAb の出現により連続的に細胞動態をとらえることが可能となった。本研究では、白血病細胞の増殖動態を生体内で解析する方法を開発する目的で、未治療の急性白血病患者に BrdU を経静脈的に投与し、骨髄中の白血病細胞の本剤による標識率 (BrdU-labeling index, BrdU-LI) を FCM を用いて測定した。さらに、本剤を一

定時間持続点滴静脈することにより、DNA 合成期時間 (the duration of synthetic phase, Ts) および理論的倍化時間 (the potential doubling time, Tpot) の算定が可能であるか否かを検討した。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した。

## 対象および方法

### 1. 対 象

#### 1. BrdU による標識率を測定した症例

未治療の急性白血病患者22例を対象として、BrdU による標識率を求めた。年齢は16才から79才で、男性12例、女性10例である。病型は急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) 6例 (French-American-British classification (FAB 分類), 全例 M2; うち refractory anemia with excess of blasts, RAEB からの移行例 1例), 急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) (FAB 分類 M3) 3例, 急性骨髄単球性白血病 (acute myelomonocytic leukemia, AMMoL) (FAB 分類 M4) 4例, 急性単球性白血病 (acute monocytic leukemia, AMoL) (FAB 分類 M5a) 2例, 急性リンパ性白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) 6例 (FAB 分類 L1 2例, L2 4例), 分類不能の急性白血病 (acute unclassified leukemia, AUL) 1例であった。診断時の末梢血中

Table 1. Patient characteristics, cell kinetics and clinical outcome

Patient	Age	Sex	Diagnosis (FAB) <sup>(1)</sup>	% of leukemic cells in BM <sup>(9)</sup>	% of S-phase <sup>(10)</sup> cells		Clinical outcome
					BrdU-LI	DNA histogram	
1	38	F	AML <sup>(2)</sup> (M2)	70.0	10.0	ND <sup>(11)</sup>	CR <sup>(12)</sup>
2	51	M	AML (M2)	68.0	14.2	ND	CR
3	66	M	AML (M2)	92.0	11.4	11.7	F <sup>(13)</sup>
4	25	M	AML (M2)	88.0	5.5	13.7	CR→relapse
5	61	F	AML (M2)	90.0	14.6	13.2	F
6	37	F	RAEB <sup>(4)</sup> →AML(M2)	57.0	7.9	8.8	CR
7	43	M	APL <sup>(5)</sup> (M3)	94.4	2.4	5.9	CR
8	21	F	APL (M3)	96.4	9.7	8.3	CR
9	34	F	APL (M3)	99.0	8.4	10.1	CR
10	79	M	AMMoL <sup>(6)</sup> (M4)	100.0	12.3	32.7	F
11	67	M	AMMoL (M4)	63.2	18.2	16.2	F
12	74	M	AMMoL (M4)	83.4	6.3	8.8	F
13	46	F	AMMoL (M4)	66.4	7.9	10.9	CR
14	17	M	AMoL <sup>(6)</sup> (M5a)	86.0	4.3	15.1	CR
15	21	F	AMoL (M5a)	99.5	8.3	10.3	F
16	20	F	ALL <sup>(7)</sup> (L1)	98.0	16.1	15.2	CR→relapse
17	20	M	ALL (L1)	96.8	7.5	26.7	CR→relapse
18	16	M	ALL (L2)	96.8	15.8	21.2	F
19	60	M	ALL (L2)	83.6	8.2	22.2	CR→relapse
20	70	M	ALL (L2)	98.0	12.3	15.7	F
21	29	F	ALL (L2)	99.0	16.7	13.9	F
22	71	F	AUL <sup>(8)</sup>	74.0	9.8	16.0	F

(1), French-American-British classification; (2), acute myelogenous leukemia; (3), refractory anemia with excess of blasts; (4), Acute promyelocytic leukemia; (5), acute myelomonocytic leukemia; (6), acute monocytic leukemia; (7), acute lymphocytic leukemia; (8), acute unclassified leukemia; (9), bone marrow; (10), synthetic phase; (11), not done; (12), complete remission; (13), failure.

<sup>3</sup>H-TdR, tritiated thymidine; G<sub>0</sub>, the zero growth phase; G<sup>1</sup>, the first growth phase; G<sup>2</sup>, the second growth phase; M, mitotic phase; MoAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; RAEB, refractory anemia with excess of blasts; S, synthetic phase; Tpot, the potential doubling time; Ts, the duration of synthetic phase

の白血病細胞数は、全く認められなかった例から  $1 \times 10^5/\mu\text{l}$  個以上出現していた例までさまざまであった。骨髄の有核細胞数は1例(症例13)のみ低形成であったが全例  $1 \times 10^7$  個以上の単核球を採取できた。骨髄中の白血病細胞の比率は、57.0%から100%の間にあり、白血病細胞の占める比率が高く(80%以上)最も測定に適した症例は16例であった(表1)。

### 2. BrdU による標識率を生体内と生体外で測定した症例

BrdU による標識率を測定した22例中、生体内に加えて生体外における標識率も測定した症例は、急性リンパ性白血病(FAB分類L1)の1例(症例17例)で、骨髄中の白血病細胞比率は96.8%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

BrdU の標識率を測定した22例中、Ts および Tpot の算定を試みたのは症例9(AML), 症例15(M5a), 症例21(L2)の3例であった。3例の骨髄中の白血病細胞比率は99.0~99.5%で、ほぼ均一に白血病細胞で占められていた(表1および表2)。

## II. 方法

### 1. BrdU の投与方法および骨髄採取

患者およびその家族に本研究の主旨および目的を十分に説明し了解を得た上で、BrdU(ラジバッド<sup>®</sup>、注射用、武田薬品工業、東京)を生理食塩水に溶解し、Razaら<sup>12)</sup>の報告に従い、 $200\text{mg}/\text{m}^2$ を一度に静脈内投与した(パルスラベリング(pulse labeling))。本剤投与30分後に骨髄穿刺を行い、標識率(BrdU-LI)を測定した。細胞動態のパラメーターを算定した3症例については、これを標識率の1(BrdU-LI-1)とした。1回目の骨髄穿刺後、生理食塩水500mlに溶解した同量のBrdUを150分かけて持続点滴静注した。点滴終了後に2回目の骨髄穿刺を行って、標識率の2(BrdU-LI-2)の測定の試料とした。これまでの報告によると<sup>20)</sup>、白血病細胞の第二間期(the second growth phase, G<sub>2</sub>期)はほぼ3時間とされている。DNA合成期時間を算定するためには、本剤による標識率の増加が投与開始後の時間経過と正相関している必要がある。したがって標識細胞が分裂期(mitotic phase, M期)に移行しないように、1回目のBrdU投与から2回目の持続点滴投与終了までの時間は180分とし、この時間内での標識率の増加を観察した。骨髄液は単核球が  $1 \times 10^7$  個以上含まれるように採取量を調節した。生体外での解析を行った1症例(症例17)については、あらかじめ採取した骨髄細胞に  $10\mu\text{M}$  の BrdU を  $37^\circ\text{C}$  で30分間取り込ませ、以下の操作を生体内投与群と同様に行った。

### 3. BrdU/DNA 二重染色

FCMで白血病細胞の解析が可能か検討するために、細胞処理法をDolbearら<sup>14)</sup>の方法をもとに急性前骨髄球性白血病の培養株であるHL-60を用いて予備実験を行い、この結果以下の手順で採取した骨髄液を処理した(図1)。

#### 1) 細胞の分離・保存

採取した骨髄液より直ちにFicol-Hypaque(リンホプレッブ<sup>®</sup>(Nyegaard, Oslo, Norway)にて単核球を分離し、分離した単核球をリン酸緩衝生理食塩液(phosphate-buffered saline, PBS)にて3回洗浄した。洗浄した細胞に  $-20^\circ\text{C}$  冷70%エタノールを加え、30分以上固定し、測定まで冷蔵庫に  $4^\circ\text{C}$  で保存した。

#### 2) DNA の変性(denaturation)

固定した細胞をPBSで2回洗浄し、2N HClを攪拌しながら添加し、20分間室温で作用させた。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を露出させ、MoAbと結合しやすくした。次の段階での抗原抗体反応には核内のpHが中性に近いことが望ましいために、塩酸を中和する目的で0.1M無水ホウ酸ナトリウム( $0.1\text{M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) (pH8.5)を10分間作用させた<sup>21)</sup>。

#### 3) 第一抗体による処理

PBSで2回洗浄した後、0.5% Tween 20 (Sigma, St. Louis, U.S.A) 加 PBS にウシ血清アルブミン(DAKO, Glostrup, Denmark)を0.5%となるように混合した液に、 $1 \times 10^6$  個の細胞を懸濁させ、非特異的抗体の結合を防止した。この懸濁液  $450\mu\text{l}$  に10倍に希釈したマウス抗 BrdU-MoAb (Becton Dickinson, California, U.S.A) を  $50\mu\text{l}$  混合し、100倍希釈として室温で1時間作用させた。

#### 4) 第二抗体による染色

PBSで3回洗浄した後、100倍に希釈した蛍光イソチオシアネート標識ヤギ抗マウスIgG抗体(FITC-conjugated anti-mouse goat immunoglobulin G) (Coulter, Florida, U.S.A) を添加し、室温暗所で30分間反応させ、免疫蛍光抗体間接法により染色した。なお、抗 BrdU 抗体を作用させないで同様の処理を施した細胞を対照とした。

#### 5) DNA 染色

PBSで3回洗浄した後、 $1500\text{U}/\text{ml}$  の RNA 分解酵素(Sigma)を加え、 $37^\circ\text{C}$  で30分間反応させ RNA の消化を行った。PBSで3回洗浄し、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$  のプロピディウム・アイオダ

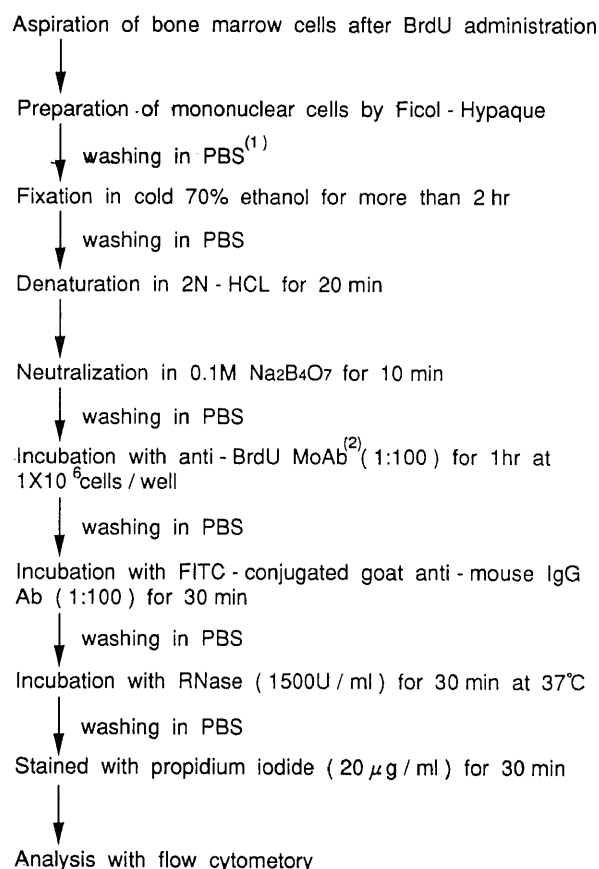


Fig. 1. Bivariate BrdU/DNA content staining procedure using anti-BrdU monoclonal antibody by flow cytometry. (1), phosphate-buffered saline; (2), monoclonal antibody.

イド (propidium iodide, PI) (Sigma) を室温暗所で30分反応させて二重鎖部分の DNA 染色を行った。染色後、40 $\mu$ m のナイロンメッシュで細胞を濾過し、細胞浮遊液とした。

### 3. FCM による BrdU の標識率の測定および DNA ヒストグラムによる細胞回転解析

測定装置は EPICS-CS システム (Coulter Electronics Inc., Florida, U.S.A) 用いた。FITC と PI はアルゴンレーザー 488nm で励起され、それぞれ 560nm のショートパスフィルターと 590nm のロングパスフィルターで、BrdU 蛍光量と DNA 量を同時に測定した (two parameter analysis)。なお、あらかじめ標識粒子にて、変動係数 (coefficient of variation, CV) 値が2.0以下となるように調整した。解析から破碎細胞 (cell debris) や二重、三重連結細胞 (doublets, triplets) を除去するために、適当な範囲でのゲート設定がなされた。DNA ヒストグラムによる細胞回転解析 (one parameter analysis) は EPICS-CS システムのコンピューターに内蔵された、Bruce Bagwell の方法<sup>23)</sup>を用いて行い、各期にある細胞の比率を解析し

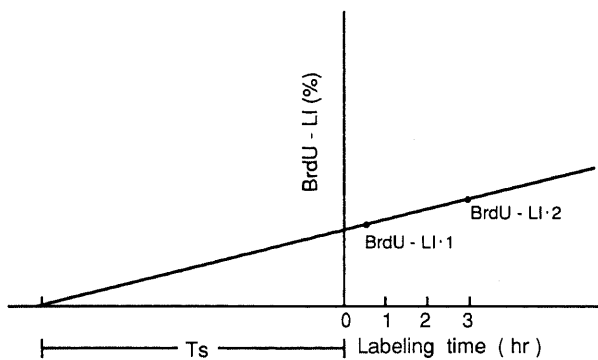


Fig. 2. The relationship between BrdU-labeling index (BrdU-LI) and labeling time. The duration of DNA synthesis time ( $T_s$ ) can be estimated from the regression line obtained by plotting BrdU-LI.1 and BrdU-LI.2 against labeling time. The slope of this regression line indicates the rate of cells entering into S phase per hr.

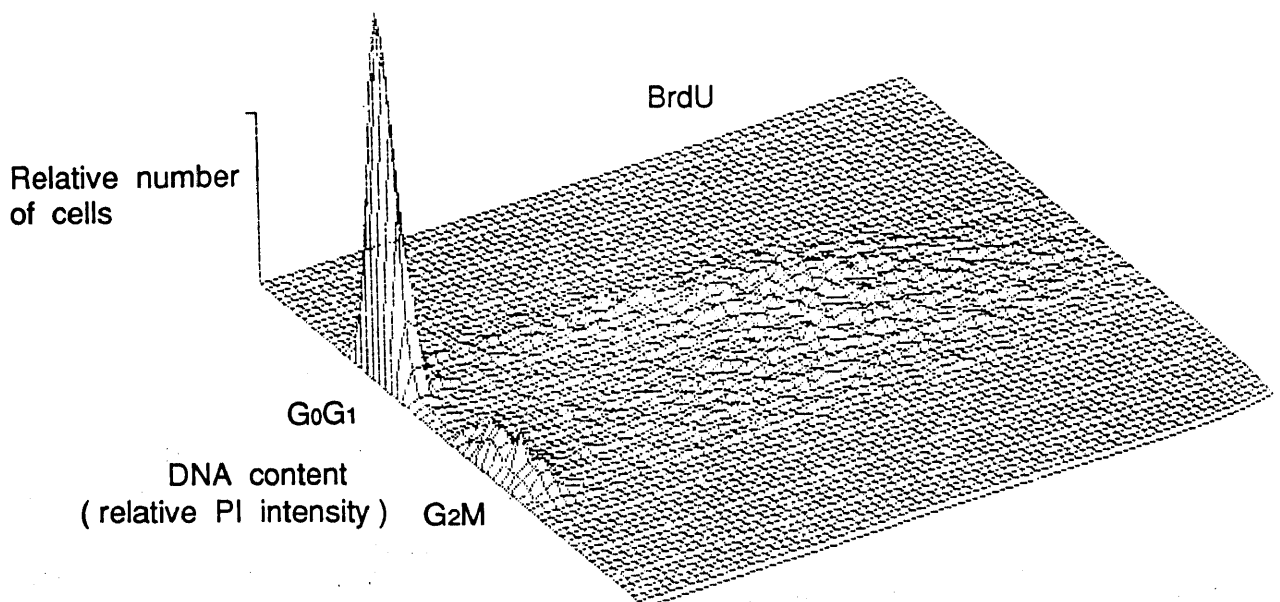


Fig. 3. Three dimension distributions of HL-60 cells incorporating BrdU and DNA content. BrdU-LI was about 60%.

た。BrdU-LI とは標識細胞の全解析細胞に対する割合 (%) であり、1 検体につき  $1 \sim 3 \times 10^4$  個の細胞について解析した。

### 4. $T_s$ および $T_{pot}$ の計算

増殖相にある各々の白血病細胞の各時期の長さに差がなく、これらの細胞は同期しておらず、かつ BrdU の投与と白血病細胞の数は一定と仮定することにより DNA 合成期時間を次の式によって求めた<sup>23)</sup>。

$$T_s \text{ (hr)} = LI^* / R$$

ここでは  $LI^*$  は BrdU 投与直後 (0時間) の標識率を示し、 $R$  は単位時間あたりに DNA 合成期に移入する細胞の割合 (%) を示している。しかし、実際には投与直後の BrdU-LI を測定することは不可能であるので、標識率の 1 および 2 をプロットすることにより、回帰直線 (regression line) を得、 $T_s$  を算定した (図 2)。 $T_{pot}$  は以下の式によって求めた<sup>24)25)</sup>。

$$T_{pot} \text{ (days)} = [(T_s / \text{BrdU-LI} \cdot 1) \times 100] / 24$$

### 5. BrdU-LI と化学療法効果および再発との相関

BrdU-LI と完全寛解 (complete remission, CR) 到達群および再発 (relapse) 群との相関関係を Wilcoxon の順位和検定で検討した。

## 成 績

### 1. BrdU/DNA 二重染色の染色パターン

生体内における白血病細胞の増殖動態の解析に先立ち、急性前骨髄球性白血病の培養株である HL-60 を用いて染色性を検討した。X 軸に相対的 DNA 量を、Y 軸に BrdU の蛍光量を取りヒストグラムを作製した。BrdU 陽性細胞は「逆 U 字型」<sup>19)</sup>あるいは「馬蹄型」<sup>20)</sup>と表現されるように分布し、BrdU の蛍光量は DNA 合成期中期で最大であった。また、標識細胞と非増殖期 (the zero growth phase,  $G_0$  期) + 第一間期 (the first growth phase,  $G_1$  期) ( $G_0 + G_1$  期) および第二間期 + 分裂期 ( $G_2 + M$  期) にある細胞とは明瞭に区別できた。HL-60 の BrdU-LI は約 60% であった (図 3)。

BrdU により生体内で標識された白血病細胞においても、染色性は同様に良好であった (図4).

## II. BrdU による標識率と DNA ヒストグラムによるS期比率の解析結果

22例の骨髄中白血病細胞の BrdU 生体内投与による標識率は、2.4~18.2% (平均±標準偏差 (mean±standard deviation),  $10.4 \pm 4.2\%$ ) であった (表1および図5). 生体内および生体外の両方で標識率を測定できた症例17の生体内での標識率は7.5%, 生体外でのそれは7.3%で差がなかった.

20例について PI の単染色による DNA ヒストグラムから求めた DNA 合成期にある細胞の比率 (S期比率) を算定した結果、5.9~32.7% ( $14.9 \pm 6.6\%$ ) であった (表1および図5).

両群間を同一症例で比較すると DNA ヒストグラムから求め

たS期比率が BrdU-LI よりも高い例が多く、なかには20%以上の差を認めたものもあった。両群間には危険率5%以下で統計学上有意な差を認めた (図5).

症例ごとに PI による DNA ヒストグラムと BrdU/DNA 二重染色を比較する。症例11では、DNA 量がS期に相当するほとんどの細胞で BrdU の取り込みが認められており、標識率は18.2%, DNA ヒストグラムによるS期比率は16.2%で両者はほぼ一致した値であったが (図6), 症例18では、DNA 異数体 (DNA aneuploidy) を認めるとともに、DNA 量はS期に相当していながら、BrdU を取り込んでいない、すなわち DNA 合成を行っていない quiescent 細胞 ( $S_0$  cells) の存在が認められた。BrdU-LI は15.8%, DNA ヒストグラムによるS期比率は21.2%で後者の比率が高かった (図7).

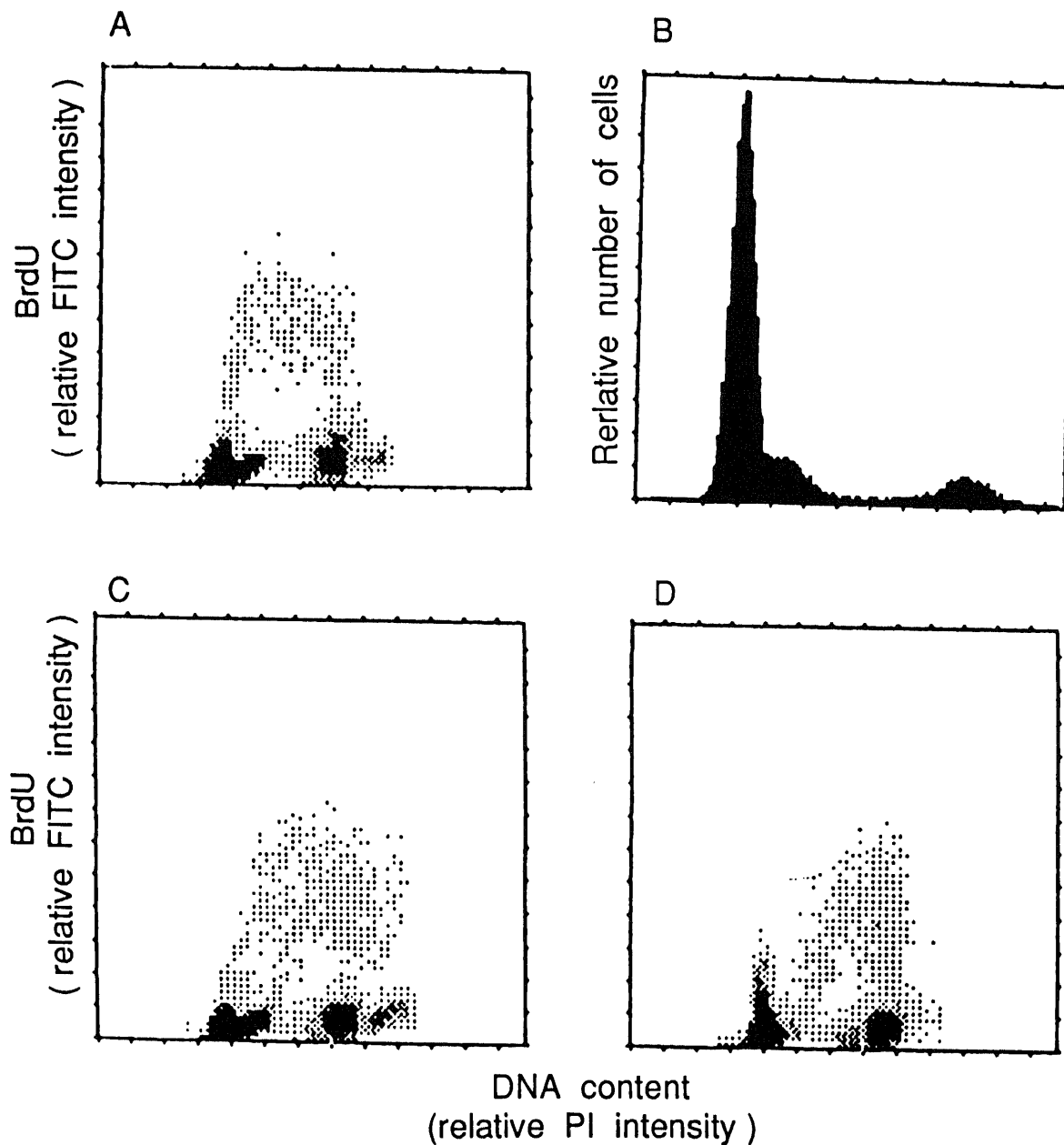


Fig. 4. Sequential analysis of cell kinetics after administration of BrdU. DNA content distributions showed aneuploid patterns 30min after administration of BrdU (A) (B). Two hour after administration of BrdU, BrdU-labeled cells entered into G<sub>2</sub>M phase (C). Four hours after administration of BrdU, a part of the labeled cells was recognized recycling into G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> phase (D).

### Ⅲ. Ts および Tpot の算定結果

細胞動態のパラメーターを解析するために、2回目の BrdU の静脈内投与を行った3例の Ts はそれぞれ、21.6、13.5および33.9時間であった。同じく Tpot は10.7、6.8および8.5日であった(表2)。

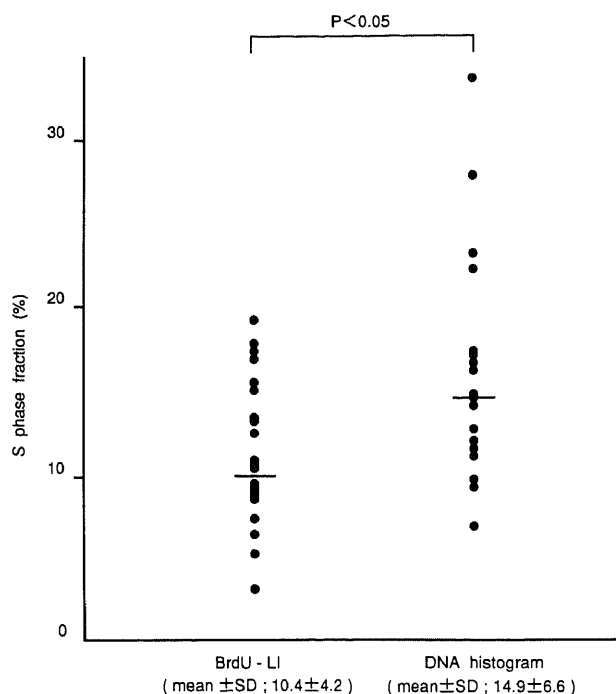


Fig. 5. Distributions of S phase fraction according to the BrdU-LI and the DNA histogram. S phase fractions calculated from DNA histogram were higher than those of BrdU (significantly different by Wilcoxon *t* test;  $p < 0.05$ ).

### Ⅳ. BrdU-LI と化学療法効果および再発との関係

22例中、CR 到達群は12例、54.5%で、化学療法死を含めた非寛解 (Failure) 群は10例、45.5%であった。BrdU-LIと化学療法効果との関係では、CR 到達群の標識率が危険率5%以下で有意に低値であった(図8)。

再発は4例、33.3%に認めたが、寛解を維持している群の標識率との間には統計上有意味な差はなかった(図9)。

### Ⅴ. BrdU の副作用

今回の22例25回の静脈内投与では、自覚的にも他覚的にも BrdU によると考えられる急性の副作用は全く認められなかった。また現在生存中の症例についても、本剤によるものと思われる異常所見の発現を認めていない。

### 考 察

腫瘍細胞の最大の特徴は異常増殖性にあり、その増殖動態は組織学的悪性度、治療方針および効果、予後と密接に関係するとされている。これまでに、脳腫瘍<sup>27)</sup>、胃癌<sup>11)</sup>、子宮内膜癌<sup>28)</sup>、肝細胞癌<sup>29)</sup>、泌尿器系悪性腫瘍<sup>30)</sup>など種々の悪性腫瘍について、増殖動態の検討がなされている。急性白血病においても、白血病細胞の増殖動態は、治療計画を決定する上で、患者年齢、全身状態、白血病の病型および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になっている。増殖動態の解析結果を臨床的に利用するためには、解析が迅速かつ正確に行わなければならない。Yoshida ら<sup>31)</sup>は、迅速オートラジオグラフィ (rapid autoradiography) 法を用いて早期に白血病細胞の <sup>3</sup>H-TdR の標識率 (labeling index) を知り、標識率の高さによって治療法を変え、良好な寛解率を得ている。Raza ら<sup>19)</sup>も、S期にある細胞が多く、Ts の短い例は増殖が盛んであると推定し、このような場合は直ちに強力な化学療法を行い、一方、S期に

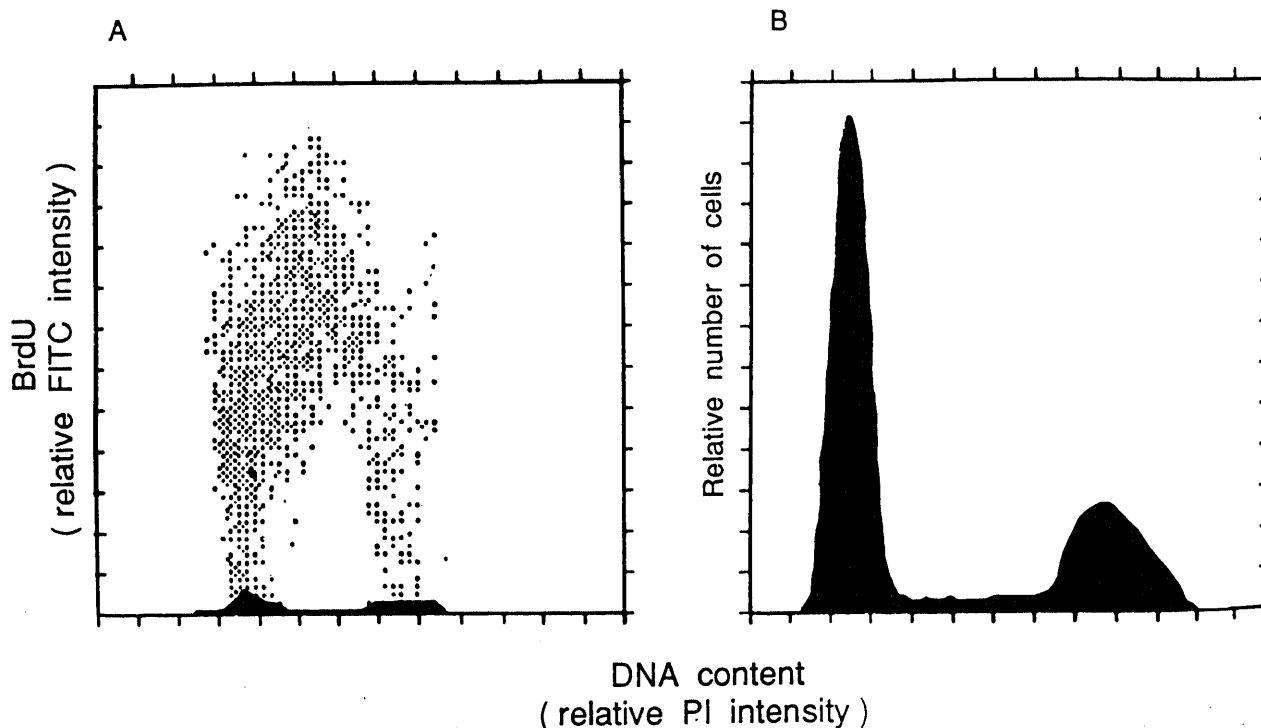


Fig. 6. Bivariate distributions of BrdU and DNA content (A), and DNA histogram (B) in patient 11. Most cells with S phase DNA content incorporated BrdU.

ある細胞が少なく、Ts の長い例では、治療の開始を延期するかあるいは少量の抗白血病剤の長期にわたる投与を推奨している。さらに現在使用されている抗腫瘍剤のほとんどが特定の増殖期にある細胞に効果を示す<sup>32)</sup>ことから、この効果を増幅するために、大竹ら<sup>33)</sup>は成人急性非リンパ性白血病に対し、S期細胞の比率を参考にしながら、S期への部分同調 (partial synchronization) を導入した化学療法を行い、良好な治療成績をあげている。このように、細胞回転の各相の細胞比率ならびに通過時間を正確に解析することは、化学療法剤の選択や感受性を予測する上で極めて有用である。

腫瘍細胞の増殖動態を解析する方法としては、これまで、専らラジオアイソトープで標識された核酸前駆物質である<sup>3</sup>H-TdR あるいはトリチウムウリジン (<sup>3</sup>H-uridine) を用いてのオートラジオグラフィ<sup>34-7)</sup>が行われてきた。しかし、これらの方法はラジオアイソトープを使用するため施設に制限があり、また安全性に問題があるために、対象も限られたものでしかなかった。さらに、方法によっては結果を得るまでに数週間もかかり、一般的に臨床で応用できるものではなかった。一方、FCM法は、大量の細胞を迅速に解析できるという利点を持ち、ラジオアイソトープ法に代わって細胞動態解析法の主流となっ

ている。FCMによる解析には、これまでは、細胞のDNA含有量からヒストグラムを作製し、コンピューター処理によって、仮のDNA分布を想定し、各DNA量の細胞の蛍光強度はガウス分布に従うとして、理論的に細胞集団全体の蛍光分布を計算する方法が行われてきた。計算方法にはさまざまなものがある<sup>34-37)</sup>が、いずれの方法にしても理論的問題が残されており、正確さという面で満足のゆくものではなかった。1981年、BrdUに対するMoAbが開発され<sup>8)</sup>、市販されるようになったために、BrdUを用いて免疫組織化学的方法<sup>38)</sup>あるいはFCM法<sup>14)39)</sup>により、簡便にまた迅速にDNA合成期にある細胞を測定できるようになった。また、BrdUは直接生体内に投与可能であることから、生体内での細胞増殖動態の解析が可能となった。

本研究では、BrdUを用いて、急性白血病における白血病細胞の生体内での増殖動態の解析が可能であるか否かを検討するために、本剤による標識率を測定した。また、BrdUの1回静脈内投与による白血病細胞の標識の後、再び本剤を一定時間持続点滴し、この間の標識率の増加よりTsならびにTpotを求める方法を考案し、その有用性につき検討した。さらに、BrdU-LIの高低とCR到達群および再発群との相関関係につい

Table 2. Cell kinetic parameters of leukemic cells in bone marrows

Patient	Diagnosis (FAB)	BrdU-LI (%)	Ts <sup>(1)</sup> (hr)	Tpot <sup>(2)</sup> (days)
9	APL (M3)	8.4	21.6	10.7
15	AMoL (M5a)	8.3	13.5	6.8
21	ALL (L2)	16.7	33.9	8.5

(1), DNA synthesis time; (2), potetial doubling time. To calculate Tpot from the experimentally determined LI and Ts, a steady state condition for cells proliferation was assumed.

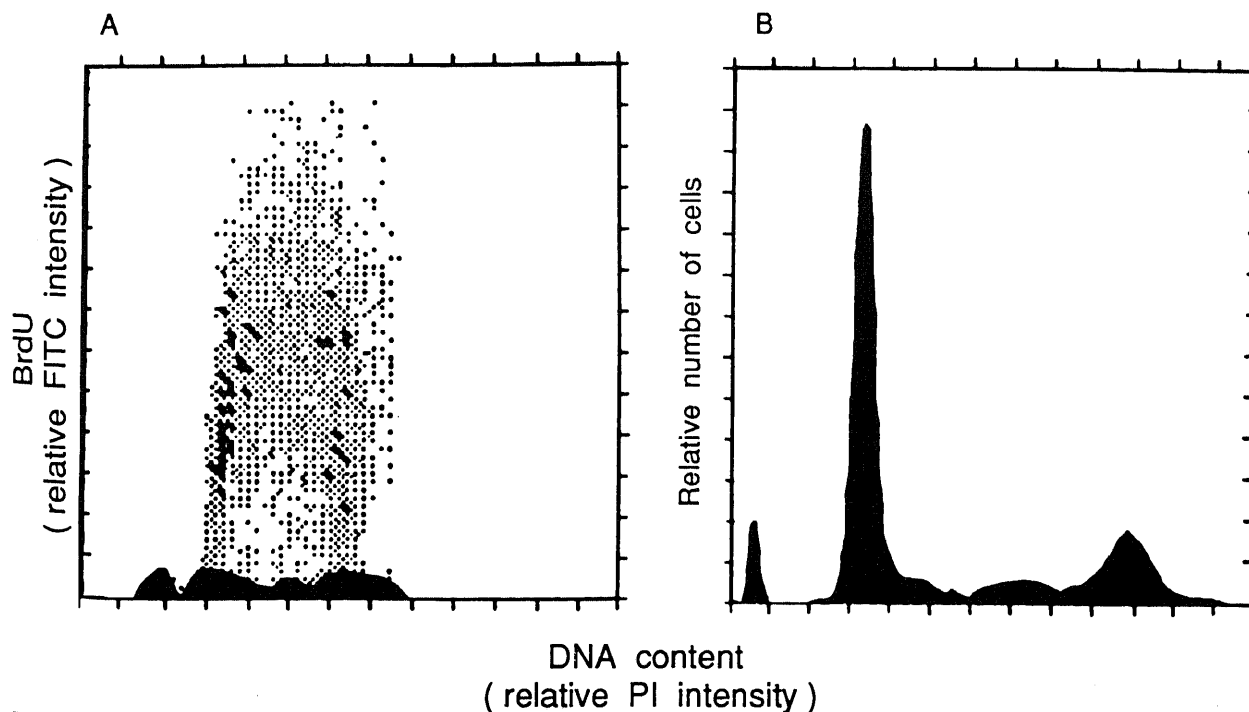


Fig. 7. Bivariate distributions of BrdU and DNA content (A), and DNA histogram (B) in patient 18. A large number of cells with S phase DNA content did not incorporate BrdU.





めに、算定細胞個数に限度があり、同一症例での標識率にバラツキを生じかねない。また、DNAの定量は困難であるために、DNAの量的な検討は不可能である。一方、FCM法は骨髓中の白血病細胞比率が高く、ほぼ均一に増殖している症例で、骨髓有核細胞が $1 \times 10^7$ 個以上回収できる場合には極めて有用で、一度に大量の細胞について数十分以内に、正確に計測が可能である。さらに、DNAを半定量的に測定できるために、DNA異数体などのDNAの量的異常も同時に解析できる<sup>40</sup>。本研究では、これらの特徴を利用してFCM法によるBrdU/DNA二重染色による細胞回転各相の解析を行った。

抗BrdU抗体を作用させるためには、細胞内二重鎖DNAを単鎖化する必要がある。塩酸によるDNA変性処理(denaturation)が必要である。これに対して、PIは二重鎖DNAに結合するために、すべてのDNAを単鎖化してしまうと二重染色は不可能となる。このため、塩酸処理は $2N^{20}$ あるいは $4N^{40}$ で行われているが、本研究では $2N$ で処理をした。本研究に先だって、急性前骨髄球性白血病の培養株である、HL-60細胞を用いて染色性についての検討を行ったが、BrdU標識細胞は「逆U字型」あるいは「馬蹄型」と表現される形態を示して分布し、細胞回転各相の識別は明瞭であり、標識率はこれまでの報告にほぼ一致して約60%であった<sup>20</sup>。さらに、BrdUを生体内投与した症例の染色性も良好で、標識細胞の蛍光強度はS期中期で最大となり、S期の識別は容易であった。したがって、今回用いた染色方法は十分に測定に使用できるものと考えられた。

これまでに報告されている種々の方法での、急性白血病細胞における骨髓中のS期細胞比率は以下の通りである。 $^3H$ -TdRを用いたオートラジオグラフィによる生体内での検討では、太田<sup>9</sup>は2.4から13.5%、土屋<sup>20</sup>は0.4から14.6%に分布していると報告し、かなりの個体差があったと述べている。Raza<sup>12</sup>は急性白血病患者に初めてBrdUを生体内に投与し、検討したが、標識率は3から11%であった。また、Riccardi<sup>20</sup>のBrdUによる生体内での検討では、標識率は0.9から11.7%であった。本研究で得られたBrdU-LIは2.4から18.2%、平均値10.4%であり、これまでの報告とほぼ一致した結果であった。Raza<sup>12</sup>はBrdU-LIについて生体内と生体外投与で検討し、両者に差はなかった報告している。本研究では1例のみではあるが、生体内投与の標識率は7.5%、生体外投与では7.3%で両者に差はなかった。この結果から、標識率のみを求める場合には、生体に影響を与えない生体外投与でも可能と考えられた。

FCM法による細胞回転は、従来、核酸に親和性の強いPIやエチジウム・ブロマイドなどを用いて染色し、DNAヒストグラムを作製して、そのDNA分布から作図あるいはシュミレーションにより理論計算<sup>34-37</sup>を行うことによって解析されてきた。この方法では、第一間期後期(late G<sub>1</sub>期)とDNA合成期初期(early S期)、およびDNA合成期後期(late S期)と第二間期初期(early G<sub>2</sub>期)の区別が困難であり、また、図7に示すようにDNA量はS期に相当していても、BrdUを取り込んでいない。すなわちDNA合成を行っていない細胞(quiescent, S<sub>0</sub> cells)が存在しているなど、実際の白血病細胞の増殖動態を正確に解析できるとは言えない。大山<sup>51</sup>は、胃癌細胞を用いて検討し、BrdU-LIとDNAヒストグラムによるDNA合成期細胞比率との間には相関がなく、前者にquiescent細胞を加えると相関が認められたと述べている。Colly<sup>50</sup>のDNAヒストグラ

ムによるDNA合成期細胞比率でも6.7%から25.2%と他の報告よりは高めで、かなりの個体差を認めている。本研究のDNAヒストグラムから求めたDNA合成期比率は、5.9%から32.7%で、BrdU-LIより有意に高く、個体差も大きく、これまでの報告と同じように本法の限界を示す結果であった。

細胞回転においてTsの長さは、S期細胞の比率とともに細胞の増殖能を示す良い指標である。また、臨床で使用される抗腫瘍剤の多くはDNA合成阻害剤であるために、投与期間の設定および効果の予測に、Tsの測定は極めて有用である。Tsの算定法のひとつとして、核DNA標識細胞が経時的に変化していく過程を追跡する方法がある。Clarkson<sup>9</sup>はかつて、急性白血病症例に $^3H$ -TdRを投与し、オートラジオグラフィ法により標識細胞の変化を観察し、生体内の細胞回転時間を測定した。しかし、この方法は測定までに数週間を要し、頻回の骨髓穿刺が必要のために、実用的とはいえなかった。Begg<sup>52</sup>は、S期にある細胞のG<sub>2</sub>M期への移動率が一定であると仮定し、その移動率からTsを算出する、移動追跡法を考案した。この方法は、1回の検体採取で算出できるために、複数回の検体採取が困難な、固形癌などの場合には特に有効である<sup>52</sup>。しかし、1回のみでの測定値から算出であるために、得られた結果は予測値にすぎないという欠点がある。もう一つの方法は、標識物質を一定時間細胞に作用させて、その取り込み量の増加により算出する方法である。Sasaki<sup>20</sup>は、培養細胞株にBrdUを一定時間持続的に接触させ、この間の標識率の増加率からTsを算出する方法を報告している。本研究では、白血病という比較的検体が採取しやすい腫瘍細胞を取り扱っており、また生体内における細胞動態のより正確な解析を行うために、Sasaki<sup>20</sup>の方法を用いて検討した。標識率の増加を知るために行う骨髓穿刺は、2回が限度であり、本研究では2点間の標識率の変化から解析を試みた。すなわち、BrdUの1回静脈内投与による標識率(BrdU-LI・1)と、その後150分かけて再びBrdUを持続点滴した後に得られた標識率(BrdU-LI・2)をグラフ上にプロットし、回帰直線によりTsを算定した。この方法では、第1回目のBrdU投与により標識された細胞が分裂期に入る前に2回目の投与が終了し、2回目の骨髓穿刺を施行する必要がある。本研究では、白血病細胞のG<sub>2</sub>期が約180分であるというこれまでの報告<sup>320</sup>を参考にして、1回目の投与開始から、2回目の投与終了までの時間を180分と定めた。また、この方法でTsを求めるためには、個々の細胞で各増殖相を通過する時間に差がなく、しかも180分の間に、非増殖相も含めた各相の細胞数にも変化がないと仮定する必要がある<sup>54</sup>。本研究でもこのような仮定に基づいて算定した。Tsが算出されると、BrdU-LIによってTpotが計算可能であった<sup>24,25</sup>。

この方法によって得られた、急性白血病3例のTsは13.5、21.6および33.9時間であり、Tpotはそれぞれ6.8、10.7および8.5日であった。これらの結果は、これまでの報告と概ね一致した値となっている<sup>420</sup>。本研究によって得られた生体内におけるBrdU-LI、TsおよびTpotの結果より急性白血病細胞の細胞増殖動態を検討すると、個体差が大きいものの、正常骨髓細胞に比べてS期にある細胞の比率は極めて低く、その通過時間もかなり長く、細胞回転時間も長いことが明らかとなった。このことから、白血病細胞の増殖力は弱く、寿命の長い異常細胞の蓄積が増殖動態から見た白血病の特徴であることが確認された。

最後に、本研究で対象とした、急性白血病未治療例22例の化学療法効果および再発との関係について検討する。BrdU-LIとCR到達の有無との関係では、危険率5%以下でCR到達群の標識率が有意に低かった。再発群は4例と例数も少なく、有意な差はなかったが、寛解を維持している群に比べて、初回治療前の標識率はやや高い傾向にあった。前述したように、抗腫瘍剤の多くはS期に作用することから、S期細胞の比率は直接治療効果と結びつき、寛解率、予後とも関係すると推定される。Hillenら<sup>50</sup>はS期細胞の多い比例は高率に寛解に達したと報告しているが、一方Riccardiら<sup>51</sup>はS期細胞比率の低い症例が、化学療法の反応性が有意に良好であったと報告している。しかしDosikら<sup>52</sup>はS期細胞比率の多寡は細胞の減少効果とは関連するが、寛解率や予後とは関連がないとしており、一定した見解が得られていない。本研究では、BrdU-LIの低い群で寛解率が高かったが、非寛解群には化学療法後の骨髓低形成による感染症死の例なども含まれており、必ずしも抗腫瘍剤の感受性のみを直接反映しているものではなく、今後の検討課題と考えられる。

以上、本研究はBrdUとそのMoAbを用いてFCMによる二重染色法、およびBrdUの2回標識法によるTsとTpotの測定により、生体内における白血病細胞の増殖動態の解析を行った最初のものであり、このような解析が正確に行えることが確認された。今後、急性白血病の化学療法期間の設定や、再発、ならびに薬剤感受性の検討などを行う上で、直接生体内での増殖動態を解析できる本法は、応用範囲も広く、有用な手段になるものと考えられる。

## 結 論

骨髓中の急性白血病の細胞増殖動態を、生体内で解析するためにチミジンの同族体であるBrdUとそのMoAbを用いて、FCM法により検討した。対象は、急性白血病の未治療例で、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ついて検討し、以下の結果を得た。

1. BrdU-LIの測定のために、本剤200mg/m<sup>2</sup>を一度に静脈内投与し、30分後に骨髓穿刺を施行し、抗BrdU抗体を用いて免疫蛍光抗体間接法によって染色した。同時にPIによる二重染色を行い、FCMによってヒストグラムを作成した。この方法によりBrdU標識細胞と、細胞回転各相との区別は明瞭であった。また、DNA量はS期にあるが、本剤により標識されない細胞(quiescent, S<sub>0</sub> cells)の区別も容易であった。

2. 対象とした22例のBrdU-LIは、2.4から18.2%、平均値で10.4%であり、これまでの報告とほぼ一致する結果であった。

3. TsとTpotを算定するために、1回目の骨髓穿刺後再びBrdU 200mg/m<sup>2</sup>を持続点滴し、1回目の投与180分後に2回目の骨髓穿刺を行い、標識率の増加を測定した。今回検討した3例のTsは13.5, 21.6, 33.9時間で、Tpotはそれぞれ6.8, 10.7, 8.5日であり、これまでの報告とほぼ一致していた。

4. 生体内で測定したBrdU-LIは、正常骨髓細胞より極めて低値であり、Ts, Tpotも長いことから、急性白血病細胞の増殖力は弱く、寿命の長い細胞の蓄積が増殖動態の特徴であることが確認された。

5. BrdU-LIと予後との関係では、CR到達群で、標識率が有

意に低値であった。また、再発群とCR維持群では、再発群で標識率がやや高い傾向にあったが、有意な差はなかった。

6. 本研究で検討した方法により、迅速で正確な白血病細胞の増殖動態の解析ができることが判明した。さらに本法は大量の細胞を瞬時にして解析でき、同時にDNA異数体などのDNAの量的解析も可能なことから、有用な手段と考える。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導と御助言を頂きました中村忍助教授をはじめ第三内科学教室の諸先生方に深謝いたします。

なお、本論文の一部は、FCM-Cell Biology・フローサイトメトリー合同研究会、パネルディスカッション(1990年、東京)、第22回国際血液学会総会(1988年、ミラノ)において発表した。

## 文 献

- 1) Howard, A. & Pelc, S. R.: Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity (suppl)*, 6, 261-273 (1953).
- 2) Quastler, H. & Sherman, F. G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.*, 17, 420-438 (1959).
- 3) Clarkson, B., Ohkita, T., Oka, 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).
- 4) Murphy, S. B., Aur, R. J. A., Simone, J. V., George, S. & Mauer, A. M.: Pretreatment cytokinetic studies in 94 children with acute leukemia; relationship to other variables at diagnosis and to outcome of standard treatment. *Blood*, 49, 683-691 (1977).
- 5) Saunders, E. F., Lampkin, B. C. & Mauer, A. M.: Variation of proliferative activity in leukemic cell populations of patients with acute leukemia. *J. Clin. Invest.*, 46, 1356-1363 (1967).
- 6) 太田和雄: <sup>3</sup>H-サイミジンの血液学への応用. *日血会誌*, 27, 693-704 (1954).
- 7) 土屋 純, 茂木正毅, 佐藤貞夫, 島野俊一, 小野垣義男, 須田哲夫, 蒙 民光, 前川 正: 急性白血病における骨髓および末梢白血病細胞の増殖能の検討. *臨床血液*, 15, 851-857 (1974).
- 8) Gratzner, H. G. & Leif, R. C.: An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*, 1, 385-389 (1981).
- 9) Gratzner, H. G.: Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo-deoxyuridine: A new agent for detection of DNA replication. *Science*, 218, 474-475 (1982).
- 10) Szybalski, W.: X-ray sensitization by halopyrimidines. *Cancer Chemother. Rep.*, 58, 539-557 (1974).
- 11) Kawata, T., Yoneyama, Y., Sugiyama, K., Ohyama, S., Kosaka, T., Yamaguchi, A., Miwa, K. & Miyazaki, I.: Proliferative activity of early gastric cancer measured by in vitro and in vivo bromodeoxyuridine labeling. *Cancer*, 64,

- 1665-1668 (1989).
- 12) Raza, A., Ucar, K. & Pleisler, H. D.: Double labeling and in vitro versus in vivo incorporation of bromodeoxyuridine in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cytometry*, **6**, 633-640 (1985).
- 13) Danova, M., Wilson, G., Riccardi, A., Mazzini, G., Ucci, G., Giordano, M., Brugnattelli, S., Luoni, R., McNally, N. J. & Ascari, E.: In vivo administration of bromodeoxyuridine and flow cytometry for cell kinetic studies in human malignancies. *Hematologica*, **72**, 115-119 (1987).
- 14) Dolbear, F. Gratzner, H., Pallavicini, M. G. & Gray, J. W.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5573-5577 (1983).
- 15) 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).
- 16) Nakamura, S., Takeda, Y. & Kanno, M.: Practical uses of bromodeoxyuridine in the field of diagnostic cytology. *Mitteilungsdienst-GBK*, **17**, 102-105 (1989).
- 17) 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: 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. *日臨細誌*, **27**, 531-535 (1988).
- 18) Nakamura, S., Takeda, Y., Kanno, M., Yoshida, T., Ohtake, S., Kobayashi, K., Okada, Y. & Matsuda, T.: Application of bromodeoxyuridine (BrdU) and anti-BrdU monoclonal antibody for the in vivo analysis of proliferative characteristics of human leukemic cells in bone marrows. *Oncology*, **48**, 285-289 (1991).
- 19) 高橋 学: Flow cytometry の生物学への応用. *化学と生物*, **21**, 728-738 (1983).
- 20) 土屋 純, 前川 正: 白血病細胞の細胞回転. *医学のあゆみ*, **128**, 967-972 (1984).
- 21) 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. *泌尿器科紀要*, **34**, 1339-1348 (1988).
- 22) Bagwell, C. B., Hudson, J. L. & Irvin, G. L.: Nonparametric flow cytometry analysis. *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 293-296 (1979).
- 23) 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).
- 24) Steel, G. G.: *Growth Kinetics of Tumors*, 1st ed., p86-216, Oxford University Press, Oxford, 1977.
- 25) Riccardi, A., Danova, M., Dionigi, P., Cebrelli, T., Butti, G., Mazzini, G. & Wilson, G.: Cell kinetics in leukemia and solid tumors studied with in vivo bromodeoxyuridine and flow cytometry. *Br. J. Cancer*, **59**, 898-903 (1989).
- 26) 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).
- 27) Hoshino, Y., Ito, S., Asai, A., Shibuya, M., Prados, M. D., Dodson, B. A., Davis, R. L. & Wilson, C. B.: Cell kinetic analysis of human brain tumors by in situ double labelling with bromodeoxyuridine and iododeoxyuridine. *Int. J. Cancer*, **50**, 1-5 (1992).
- 28) 吉野内光夫: 抗 BrdU 抗体と Ki-67 を用いた子宮癌の検討. *日癌治誌*, **69**, 251-252 (1987).
- 29) Tarao, K., Shimizu, A., Harada, M., Ohkawa, S., Okamoto, N., Kuni, Y., Ito, Y., Tamai, S., Iimori, K., Sugimasa, I., Takemia, S., Okamoto, T., Inoue, T. & Kanisawa, M.: In vitro uptake of bromodeoxyuridine by human hepatocellular carcinoma and its relation to histopathologic findings and biologic behavior. *Cancer*, **68**, 1789-1794 (1991).
- 30) 小林正喜: 泌尿器系悪性腫瘍における bromodeoxyuridine (BrdU) 抗体を用いた標識率 (LI) の臨床的意義. *日大医誌*, **49**, 724-733 (1990).
- 31) Yoshida, T., Hattori, K., Nakamura, S., Mitamura, E., Kobayashi, S., Ohtake, S. & Tanimoto, K.: A simple rapid autoradiography for <sup>3</sup>H-thymidine labeling index and its application to therapy of adult acute leukemia. *Cancer*, **46**, 2298-2307 (1980).
- 32) 小川一誠: 細胞回転と癌化学療法. *癌と化学療法*, **3**, 1093-1101 (1971).
- 33) 大竹茂樹, 小林三郎, 吉田 喬, 中村 忍, 谷本一夫, 服部絢一: 成人急性非リンパ性白血病における N<sup>4</sup>-Behenoyl-1-β-d-arabinofuranosylcytosine による S-phase partial synchronization の試み. *臨床血液*, **22**, 1-10 (1981).
- 34) Baish, H., Gohde, W. & Linden, W. A.: Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of cell cycle. *Radiat. Environ. Biophys.*, **12**, 31-39 (1975).
- 35) Dean, P. N. & Jett, J. H.: Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. *Cell Biol.*, **60**, 523-527 (1974).
- 36) Fox, M. H.: A model for the computer analysis of synchronous DNA distributions obtained by flow cytometry. *Cytometry*, **1**, 71-77 (1980).
- 37) Fried, J.: Method for the quantitative evaluation of data from flow microfluorometry. *Comput. Biomed. Res.*, **9**, 263-276 (1976).
- 38) Molstyn, G., Pyke, K., Gardner, J., Ashroft, R., Fazio, A. & Bhathal, P.: Immunohistochemical identification of proliferating cells in organ culture using bromodeoxyuridine and a monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.*, **34**, 697-701 (1986).
- 39) Moran, R., Darzynkiewicz, Z., Staianocoico, L. & Melamed, M.: Detection of 5-bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation by monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 821-827 (1985).
- 40) 田中敬正, 高橋正治, 黒田康正, 太田文彦, 文珠敏郎, 三好豊二, 山辺博彦: 放射線増感剤ハロゲン化ピリミジンの頭頸部腫瘍への応用. *臨床放射線*, **14**, 765-775 (1969).

- 41) 星野孝夫: BAR 療法による悪性脳腫瘍の治療. 脳と神経, 20, 601-611 (1968).
- 42) 永井政勝, 松谷雅生, 星野孝夫, 山田 久, 佐野圭司, 高倉公明, 亘理 勉: 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).
- 43) 中村 典: 5-ブロモ-2-デオキシウリジン. 生体の化学, 35, 581-582 (1984).
- 44) Goz, B.: The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyridines into the DNA of eukaryotic cells. Pharmacol. Rev., 29, 249-272 (1978).
- 45) Hoshino, T., Nagashima, T., Murovic, J., Levin, E. M., Levin, V. A. & Rupp, S. M.: Cell kinetic studies of in situ human brain tumors with bromodeoxyuridine. Cytometry, 6, 627-632 (1985).
- 46) Joseph, P. K., Maruyama, Y., Tung, L. A., Bond, S. B. & Revesz, L.: The fate of 5-bromodeoxyuridine, 5-bromodeoxycytidine, and 5-iododeoxyuridine in man. Cancer Res., 23, 260-268 (1963).
- 47) Raza, A., Maheshwari, Y. & Preisler, H. D.: Differences in cell cycle characteristics among patient with acute nonlymphocytic leukemia. Blood, 69, 1647-1653 (1987).
- 48) 高本 滋: Flow cytometry を用いた腫瘍マーカーとしての DNA aneuploidy の検索. がん治療のあゆみ, 7, 83-91 (1988).
- 49) 島袋智之, 山本光孝, 三井 博, 山本憲男, 酒徳治三郎, 篠原陽一: Flow cytometry を用いた Bromodeoxyuridine (BrdU)/DNA Assay の研究. 日癌治誌, 24, 1249-1255 (1989).
- 50) Raza, A., Ucar, K., Bhayana, R., Kempinski, M. & Preisler, H. D.: Utility and sensitivity of anti BrdU antibodies in assessing S-phase cells compared to autoradiography. Cell Biochem. Funct., 3, 149-153 (1985).
- 51) 大山繁和, 米村 豊, 松本 尚, 津川浩一郎, 岩佐和典, 瀬川正孝, 木村寛伸, 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).
- 52) Colly, L. P., Peters, W. G., Hermans, J., Honders, W. A. & Willemze, R.: Percentage of S-phase cells in bone marrow aspirates, biopsy specimens and bone marrow aspirates corrected for blood dilution from patients with acute leukemia. Leuk. Res., 11, 209-213 (1987).
- 53) Begg, A. C., McNally, N. J. & Shrieve, D. C.: A method to measure the duration of the DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. Cytometry, 6, 620-626 (1985).
- 54) Wimber, D. E. & Quastler, H.: A <sup>14</sup>C- and <sup>3</sup>H-thymidine double labeling technique in the study of cell proliferation in tradescantia root tips. Exp. Cell Res., 30, 8-22 (1963).
- 55) Hillen, H., Wessels, J. & Haanen, C.: Bone-marrow-proliferation patterns in acute myeloblastic leukemia determined by pulse cytophotometry. Lancet, 1, 609-611 (1975).
- 56) Dosik, G. M., Barlogie, B., Smith, T. L., Gehan, E. A., Keating, M. J., McCredie, K. B. & Freireich, E. J.: Pretreatment flow cytometry of DNA content in adult acute leukemia. Blood, 55, 474-482 (1980).

**Studies on the Cell Cycle of Acute Leukemic Cells: Flow Cytometric Analysis by in vivo Administration of Bromodeoxyuridine** Masatoshi Kanno, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., 101, 663—675 (1992)

**Key words** acute leukemia, bromodeoxyuridine, cell cycle, flow cytometry, S phase

#### Abstract

In order to study the possibility of analyzing in vivo cell kinetics of leukemic cells in bone marrow of patients with acute leukemia, using bromodeoxyuridine (BrdU) and its monoclonal antibody by flow cytometry, the BrdU-labeling index (BrdU-LI), the duration of DNA synthetic phase ( $T_s$ ) and the potential doubling time ( $T_{pot}$ ) were calculated. An informed consent was obtained from each of the 22 patients, and the patients were administrated 200 mg/m<sup>2</sup> of BrdU by bolus intravenous injection prior to chemotherapy. The bone marrow cells were aspirated thirty minutes after the injection and the leukemic cells were fixed with 70% of -20°C-cooled ethanol. After being denaturated with 2N HCl, the cells were stained by indirect immuno-fluorescent method using anti BrdU-antibody and FITC-conjugated goat anti-mouse antibody. Then, the cells were stained with propidium iodide (PI), and bivariate distributions of BrdU and DNA content were simultaneously determined by flow cytometry (EPICS-CS). The values of BrdU-LI of the leukemic cells ranged from 2.4 to 18.2% (mean 10.4%), which were significantly lower than those of leukemic cells in S phase calculated from DNA histogram. It was considered that the difference resulted from the presence of the number of cells having S phase DNA content without DNA synthesis; quiescent ( $S_0$ ) cells. The second BrdU drip infusions for 150 minutes of 200 mg/m<sup>2</sup> were performed to obtain the increased value of BrdU-LI during the interval between the first bolus infusion and the end of the second drip infusion. The length of  $T_s$  and  $T_{pot}$  was estimated by the regression line obtained by plotting two values of BrdU-LI; BrdU-LI · 1 and

BrdU-LI · 2. These results were similar to those estimated using other methods. Concerning the relationship between these values and prognosis, the values of BrdU-LI in complete remission (CR)-entered patients were significantly lower than those of patients who had not so far responded to treatment (failure patients). Furthermore, the values of BrdU-LI in relapsed patients tended to be higher than those of CR-maintained ones, although the difference was not statistically significant. Flow cytometric analysis of bivariate distributions of BrdU and DNA content makes it possible to recognize in vivo cell cycle parameters of leukemic cells more easily and rapidly with high accuracy than the other methods.