

# Studies on the Proliferative Characteristics of Leukemic Cells : In vivo Cell Cycle Analysis Using Bromodeoxyuridine

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/2297/8214">http://hdl.handle.net/2297/8214</a>

## 正 誤 表

金沢大学十全医学会雑誌 第99巻 第4号 732-748 (1990)

### 白血病細胞の増殖動態に関する研究

—生体内における細胞回転の解析—

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

武 田 康

(平成2年7月27日受付)

誤	正
<p>p. 736 Fig. 2. 上から14行目 Rinse smears with PBS</p>	<p>Rinse smears with PBS ↓ Treat smears with 0.05% peroxydase-conjugated IgG/PBS ↓ Rinse smears with PBS</p>
<p>p. 739 左側6行目 (9.7±6.7%)</p>	<p>(9.7±6.7 hr)</p>
<p>p. 742 Fig. 8. 説明上から2行目 9.7±7.7%</p>	<p>9.7±6.7 hr</p>
<p>p. 744 Table 3. 説明下から4行目 BrdU, in vitro</p>	<p>BrdU in vitro,</p>
<p>p. 745 左側下から2行目 白血病細胞の細胞動態を、</p>	<p>白血病細胞の増殖動態を、</p>
<p>p. 745 右側上4行目 細胞動態を知る指標として</p>	<p>増殖動態を知る指標として</p>

## 白血病細胞の増殖動態に関する研究

### —生体内における細胞回転の解析—

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

武 田 康

(平成2年7月27日受付)

チミジンの同族体であるプロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) およびそのモノクローナル抗体を用いて、生体内における白血病細胞の増殖動態を解析する方法を探る目的で、本研究に対して十分な説明を行い、同意を得られた急性白血病患者を対象にして検討した。細胞の増殖動態の指標として、骨髄中の白血病細胞の DNA 合成期 (synthetic phase, S 期) にある細胞の割合 (BrdU-labeling index, BrdU-LI) および DNA 合成期時間 (duration of synthetic phase, Ts) を選んだ。まず、プロモデオキシウリジンによる標識率を得るために、プロモデオキシウリジン 200mg/m<sup>2</sup> を一回で静脈内に投与した後、骨髄穿刺を施行し、塗抹乾燥標本を作製し、抗プロモデオキシウリジン・モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。標識細胞と非標識細胞とは容易に鑑別でき、また、ギムザ染色による後染色を施すことにより、同時に細胞の形態も十分に観察可能であった。対象とした31例のプロモデオキシウリジンによる標識率は2.4%から15.6%、平均値で7.2%であり、これまで報告されている値とほぼ一致した。DNA 合成期時間を算定するために、1回目の骨髄穿刺後再びプロモデオキシウリジン 200mg/m<sup>2</sup> を150分かけて持続点滴し、点滴終了時 (初回のプロモデオキシウリジン投与から180分後) に再度穿刺を行い塗抹標本を作製した。1回目と同様な方法で染色した後、本剤による標識率を算定し、その増加率 ( $\Delta$ LI) を求めた。対象とした13例全例で増加がみられ、その平均値は3.1%であった。プロモデオキシウリジンによる標識率および増加率から求めた DNA 合成期時間は3.1時間から27.4時間、平均値で9.7時間となり、これまでの報告にほぼ一致する成績であった。なお、本法によって求めた標識率および DNA 合成期時間と骨髄中の白血病細胞の割合ならびに骨髄の有核細胞数との間には、有意の相関はみられなかった。今回検討した方法により、容易にしかも安全に生体内における白血病細胞の増殖動態を迅速かつ正確に解析できることが分かった。本法は、今後、低形成性白血病あるいは骨髄中の白血病細胞の占める割合が低い白血病 (low percentage leukemia) などの病態の把握、前白血病状態の解析、再発および薬剤耐性の解明などを進める上できわめて有用な方法と考える。

---

**Key words** acute leukemia, bromodeoxyuridine, cell cycle, immunohistochemical method

---

腫瘍細胞の増殖動態を知ることは、腫瘍の基礎的研究のみならず臨床上也治療法の決定、予後の推定の際などにはきわめて重要な要素でありこれまで多くの検討がなされてきている<sup>1-3)</sup>。とくに、白血病においては、各々の腫瘍細胞が遊離した状態にあるために、増

殖状態を解析しやすく、比較的検討が進んでいる。しかし、これまでは、ラジオアイソトープでラベルされたチミジンあるいはウリジンなどの核酸前駆物質を直接体内に注入する以外には、生体内 (in vivo) での白血病細胞の増殖動態を解析することは不可能であった

---

Abbreviations: ALL, acute lymphocytic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; BrdU, bromodeoxyuridine; BrdU-LI, BrdU-labeling index; DAB, diaminobenzidine; FAB, French-American-British classification; FCM, flow

ために、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>9-10</sup>。

近年、チミジンの同族体であるプ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) にある細胞を容易に算定できるようになった<sup>9</sup>。また、本剤は、従来、放射線増感剤として臨床的に用いられている薬剤であり、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>10</sup>。

プロモデオキシウリジンおよびそれに対するモノクローナル抗体を用いて行う細胞増殖動態の解析方法としては、フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) 法<sup>11,12</sup>および免疫組織化学的方法<sup>10</sup>がある。前者は一度に大量の細胞について迅速に解析できるという利点を有するが、目的とする細胞が多く採取でき、しかも多数を占めている必要があり、また、高価な解析機器を要するという欠点もある。一方後者は、大量の検体を早く処理するには適さないが、各々の細胞を直接顕微鏡下で観察しながら解析できるために、細胞数の少ない検体にも、また、目的とする細胞の占める割合の低い検体にも利用できる。とくに急性白血病では、正常骨髄細胞に混じって小数の白血病細胞しかみられない例、あるいは骨髄が低形成であり、フローサイトメトリーにより解析できるほどには細胞の採取できない例がしばしばみられ、このような例には免疫組織化学的方法はきわめて有用である。すでに著者ら<sup>10,14</sup>は、細胞の形態とプロモデオキシウリジンの取り込み状態とをより正確に、しかも同時に観察できるように従来の方法を改良し、使用している。

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プロモデオキシウリジンを静脈内に投与し、骨髄中の白血病細胞の本剤による標識率 (BrdU-labeling index, BrdU-LI) を免疫組織化学的方法を用いて算定した。さらに、本剤を一定時間持続点滴静注することにより、DNA 合成時間 (the duration of synthetic phase, Ts) の算定が可能か否かを検討した。

#### 対象および方法

##### I. 対 象

##### 1. プロモデオキシウリジンによる標識率を算定した症例

未治療の急性白血病患者31例を対象として、プロモデオキシウリジンによる標識率を求めた。年齢は15才から81才で、男性16例、女性15例である。病型は急性骨髄芽球性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) 15例 (French-American-British classification, FAB 分類 M1 2例, M2 13例)、急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) (FAB 分類 M3) 4例、急性骨髄単球性白血病 (acute myelomonocytic leukemia, AMMoL) (FAB 分類 M4) 3例、急性単球性白血病 (acute monocytic leukemia, AMoL) (FAB 分類 M5a) 3例、急性リンパ芽球性白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) 6例 (FAB 分類 L1 2例, L2 4例) である。診断時の末梢血中の白血病細胞は、全くみられなかった例から、 $15.4 \times 10^4/\mu$  1個みられた例まで様々であった。骨髄の有核細胞数 (cellularity) は、低形成5例、正形成4例および過形成22例であり、骨髄中の白血病細胞の割合は、18.4%から99.5%の間であった。中でも、白血病細胞の占める割合の低い (80%未満) 症例は、11例であった (表1)。

##### 2. DNA 合成期時間を算定した症例

プロモデオキシウリジンによる標準率を算定した31例中 DNA 合成期時間の算定も試みた症例は、13例である。年齢は15才から81才で、男性6例、女性7例であり、病型は急性骨髄芽球性白血病 (FAB 分類 M2) 9例、急性前骨髄球性白血病 (FAB 分類 M3) 2例および急性リンパ芽球性白血病 (FAB 分類 L2) 2例である。末梢血中の白血病細胞の数は、0個から $29.2 \times 10^4/\mu$  1個であり、骨髄の有核細胞数を見ると低形成であった症例1例、正形成2例および過形成10例であった。なお骨髄中の白血病細胞の割合は、57.0%から99.0%の間に分布していた (表1および表2)。

#### II. 方 法

##### 1. プロモデオキシウリジンの投与および骨髄採取

患者および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うえで、プロモデオキシウリジン (ラジパット、注射用、武田薬品工業株、東京) を生理食塩水に溶解し、Raza ら<sup>10</sup>の報告に従い  $200\text{mg}/\text{m}^2$  を静脈内に投与した。本剤を投与後30分に1回目の骨髄穿刺を行い、標識率の1 (BrdU-LI $\cdot$ 1) の算定に用い

cytometry; <sup>3</sup>H-TdR, tritiated thymidine; G<sub>1</sub>, the first growth phase; G<sub>2</sub>, the second growth phase; M, mitotic phase; MoAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate buffered saline; S, synthetic phase; Ts, the duration of synthetic phase

た。その後、同量のプロモデオキシウリジンを150分かけて持続点滴静注し、点滴終了後2回目の骨髓穿刺を行い、標識率の2 (BrdU-LI・2) の算定に用いた。これまでの報告では<sup>9)</sup>では、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。したがって本剤による標識細胞が分裂期 (mitotic phase, M期) に移行しないように、1回目のプロモデ

オキシウリジン投与から2回目の持続点滴投与終了までの時間は180分とし、この時間内での本剤による標識率の増加を観察した (図1)。

## 2. 免疫組織化学的手法による骨髓標本の染色

得られた骨髓液から型のごとく塗抹標本を作製し、著者らの改良した方法に従い、以下の手順で染色した<sup>10)</sup>。なお、抗プロモデオキシウリジン・モノクロー

Table 1. Patient characteristics and BrdU-LI.

Case/Sex/Age (yr)	Diagnosis (FAB) <sup>(1)</sup>	WBC <sup>(7)</sup> counts (/μl)	% of leukemic cells in PB <sup>(8)</sup>	Cellularity of BM <sup>(9)</sup>	% of leukemic cells in BM	BrdU-LI
at diagnosis						
1/M/79	AML <sup>(2)</sup> (M1)	17,800	98.0	normo <sup>(10)</sup>	92.0	3.0
2/M/61	AML (M1)	1,800	1.0	hypo <sup>(11)</sup>	39.6	7.5
3/F/70	AML (M2)	1,500	0.0	hyper <sup>(12)</sup>	54.4	15.4
4/M/52	AML (M2)	27,700	55.0	hyper	86.4	15.6
5/F/31	AML (M2)	4,900	34.0	hyper	30.8	4.5
6/F/41	AML (M2)	7,500	33.0	hyper	42.8	6.4
7/M/34	AML (M2)	5,300	11.0	hyper	71.6	9.6
8/M/62	AML (M2)	1,000	0.0	hyper	94.5	8.9
9/M/66	AML (M2)	2,000	12.0	hyper	57.6	7.8
10/M/77	AML (M2)	17,600	86.0	normo	95.2	4.4
11/M/81	AML (M2)	2,800	24.0	hypo	85.6	7.6
12/F/15	AML (M2)	5,100	40.0	normo	60.0	10.5
13/F/37	AML (M2)	2,600	46.0	hyper	57.0	5.0
14/F/61	AML (M2)	6,700	23.0	hyper	90.0	7.3
15/F/67	AML (M2)	2,200	15.0	hyper	82.2	8.9
16/M/42	APL <sup>(3)</sup> (M3)	67,400	98.0	hyper	95.0	4.6
17/M/19	APL (M3)	15,900	95.0	hyper	98.0	6.3
18/F/34	APL (M3)	82,700	99.0	hyper	99.0	5.6
19/F/68	APL (M3)	2,200	93.0	hyper	91.0	4.9
20/M/78	AMMoL <sup>(4)</sup> (M4)	6,300	40.0	hypo	18.4	4.2
21/M/74	AMMoL (M4)	17,800	99.0	hyper	82.8	7.5
22/F/47	AMMoL (M4)	4,400	46.0	hypo	66.4	6.8
23/M/17	AMoL <sup>(5)</sup> (M5a)	140,000	99.0	hyper	86.0	5.6
24/F/21	AMoL (M5a)	147,300	90.0	hyper	99.5	13.2
25/F/62	AMoL (M5b)	59,700	75.0	hyper	58.0	9.5
26/F/19	ALL <sup>(6)</sup> (L1)	1,660,000	93.0	hyper	90.0	4.4
27/F/39	ALL (L1)	284,400	99.0	hyper	99.6	2.4
28/M/49	ALL (L2)	5,300	98.0	hypo	87.0	8.8
29/M/46	ALL (L2)	7,800	10.0	normo	85.6	4.0
30/M/70	ALL (L2)	12,800	30.0	hyper	98.0	10.0
31/F/29	ALL (L2)	307,000	95.0	hyper	99.0	2.5

The mean±standard deviation of BrdU-LI was 7.2±6.7%. (1), French-American-British classification; (2), acute myelogenous leukemia; (3), acute promyelocytic leukemia; (4), acute myelomonocytic leukemia; (5), acute monocytic leukemia; (6), acute lymphocytic leukemia; (7), white blood cell; (8), peripheral blood; (9), bone marrow; (10), normocellular; (11), hypocellular; (12), hypercellular.

ナル抗体は高価であり、使用する量を節約するために、標本上、細胞形態が最もよく観察できると考えられる引き終わり付近の一定の部分を選び、ダイヤモンドナイフで目印を付け、以下この部分が十分に染色されるように注意しながら操作を進めた(図2)。

#### 1) 乾燥・固定

標本作製後直ちにドライヤーを用いて冷風にて2時間以上乾燥し、その後、70%エタノールで30分間固定した。固定終了後、そのまま標本を室温に放置し、乾燥させた。

#### 2) 内因性ペルオキシダーゼの阻害

用時に調整した0.3%過酸化水素加メタノールにて30分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。処理後リン酸緩衝液(phosphate buffered saline, PBS) pH 7.2にて3回洗浄した。

#### 3) DNAの変性(denaturation)

0.07規定水酸化ナトリウム(0.07 N NaOH)および0.1モルのホウ酸ナトリウム(0.1 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ )を、そ

れぞれ3分間ずつ作用させ、二本鎖から一本鎖へのDNAの変性を行い、DNAの中に取り込まれているプロモデオキシウリジンを露出させ、モノクローナル抗体と結合しやすいようにした<sup>9)</sup>。

#### 4) 非特異的抗体の結合の防止

リン酸緩衝液で3回洗浄した後、2%ウマ血清(Dako社, Glostrup, Denmark)加リン酸緩衝液で20分間処理し、非特異的抗体の結合を防いだ。なお、この処理から後染色前までは標本の乾燥を防止するために、湿った口紙を敷いた湿潤箱の中で操作した。

#### 5) 抗プロモデオキシウリジン・モノクローナル抗体の調整および反応

次に塗抹面の周囲のウマ血清加リン酸緩衝液を口紙で十分に吸い取った後、0.5% Tween 20 (Sigma社, St. Louis, U.S.A) 加リン酸緩衝液にて10倍に希釈した抗プロモデオキシウリジン・モノクローナル抗体(Becton DICKINSON社, California, U.S.A)を30分間作用させた。なお、マウス免疫グロブリン G

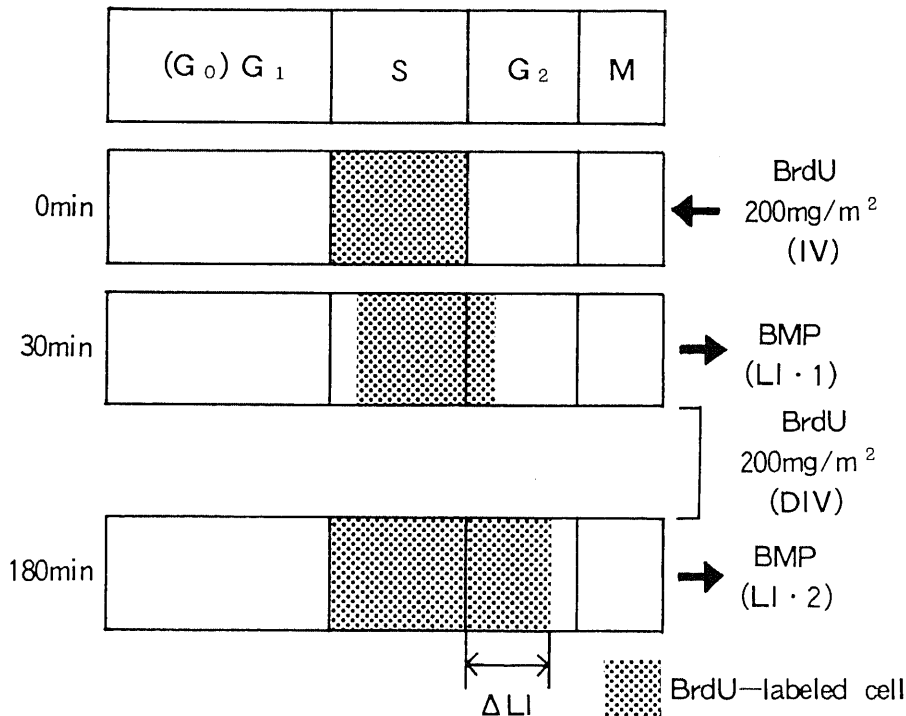


Fig. 1. Schedule for an analysis of cell cycle characteristics of leukemic cells in bone marrows using bromodeoxyuridine. Two hundred mg/m<sup>2</sup> of BrdU was administrated to the patients with acute leukemia. Thirty min later, the first bone marrow aspiration was performed to calculate BrdU-LI·1. Then, the same dose of BrdU was administrated for 150 min. After the completion of infusion, the second bone marrow aspiration was performed to calculate BrdU-LI·2.

(mouse immunoglobulin G, Ig G) (Dako 社) を同様に調整して陰性コントロールとした。

#### 6) 酵素抗体法間接法

リン酸緩衝液で3回洗浄した後、リン酸緩衝液で0.05%に希釈したペルオキシダーゼ接合抗マウス・ヤギ免疫グロブリン G (peroxydase conjugated anti-mouse goat immunoglobulin G) (Cappel 社, West Chester, U.S.A) を30分間処理した。リン酸緩衝液で3回洗浄し、0.05ジアミノベンチジン (diaminobenzidine, DAB) (Sigma 社) 加0.01%過酸化水素水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)/0.05Mトリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl buffer) pH 7.2にて15分間反応させ、ペルオキシダーゼを発色させた。

#### 7) 後染色

ゆるやかな流水中で5分間水洗し、その後ギムザ染色にて10分から15分間後染色を施した。

#### 8) 封入・検鏡

染色後、流水にて十分に水洗し、乾燥させた後、封入剤 (マリノール) (武藤化学, 東京) にて封入し、鏡検した。

#### 3. プロモデオキシウリジンによる標識率の算定

まず、弱拡大で目印をした部位全体の染色性を観察した後に、細胞が均等に分布した部位を選び、油浸系強拡大 (対物レンズ×100) とした。白血病細胞であることを確認しながら順次500個を観察し、その中のプロモデオキシウリジンで標識された細胞を数え、白血

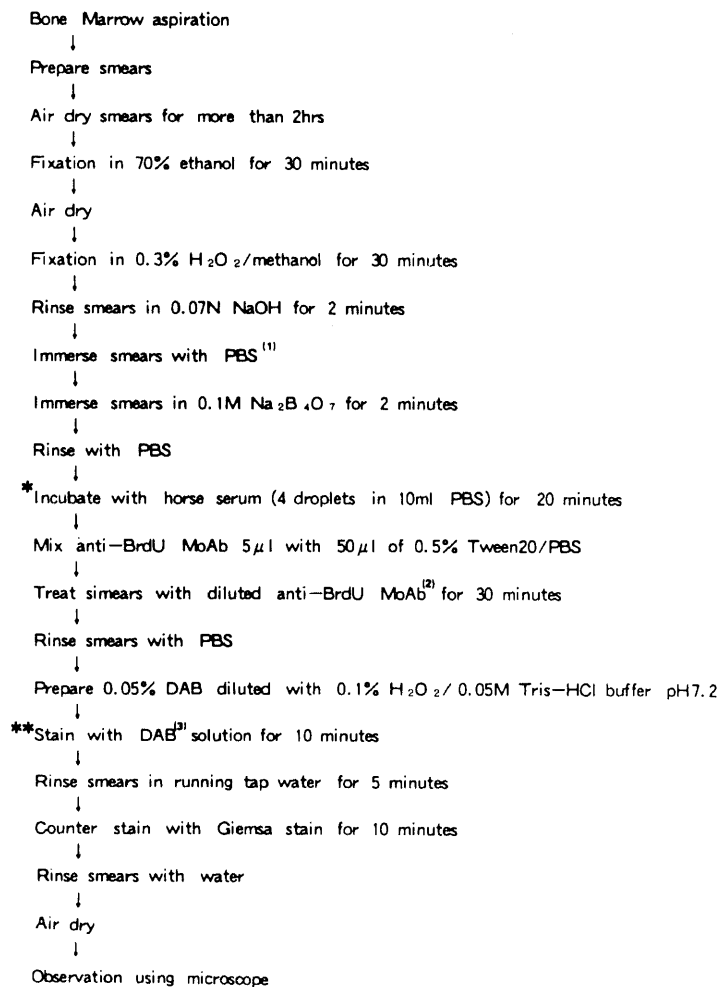


Fig. 2. Immunohistochemical method using anti-BrdU monoclonal antibody. Procedures from \* to \*\* were done in a humidified chamber. (1), phosphate buffered saline; (2), monoclonal antibody; (3), diaminobenzidine.

病細胞の標識率を算定した。なお、一回目の骨髓穿刺により得られた標本で算定した値 (BrdU-LI・1) を、その症例の標識率とした。

#### 4. DNA 合成期時間の計算

増殖相にある各々の白血病細胞の各時期の長さに違いがなく、これらの細胞は同期しておらず、かつプロモデオキシウリジンの投与中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>15)</sup>。

$$Ts = (\text{BrdU-LI} \cdot 1) / R \quad (\text{hr})$$

$$R = \{(\text{BrdU-LI} \cdot 2) - (\text{BrdU-LI} \cdot 1)\} / 3 \quad (1/\text{hr})$$

ここでRは単位時間当たりに DNA 合成期を移行する白血病細胞の全体に対する割合 (%) を示している。

## 成 績

### I. 白血病細胞の染色性

後染色を施す前のプロモデオキシウリジン標識細胞の核は、ジアミノベンチジンの発色により褐色調に染まり、非標識細胞とは容易に鑑別できた。しかし、細胞質はきわめて薄く黄色に染まる程度であり、細胞形態の詳細な観察は不可能であり細胞の存在は確認できるものの細胞の同定は困難であった。陽性細胞の核は取り込んだプロモデオキシウリジンの量を反映して、わずかに細顆粒状に染まるものから核全体が濃染するものまで様々であった (図3 A, B)。

細胞の形態学的観察を容易にするために、本研究では、ギムザ染色による後染色を施した。その結果、細

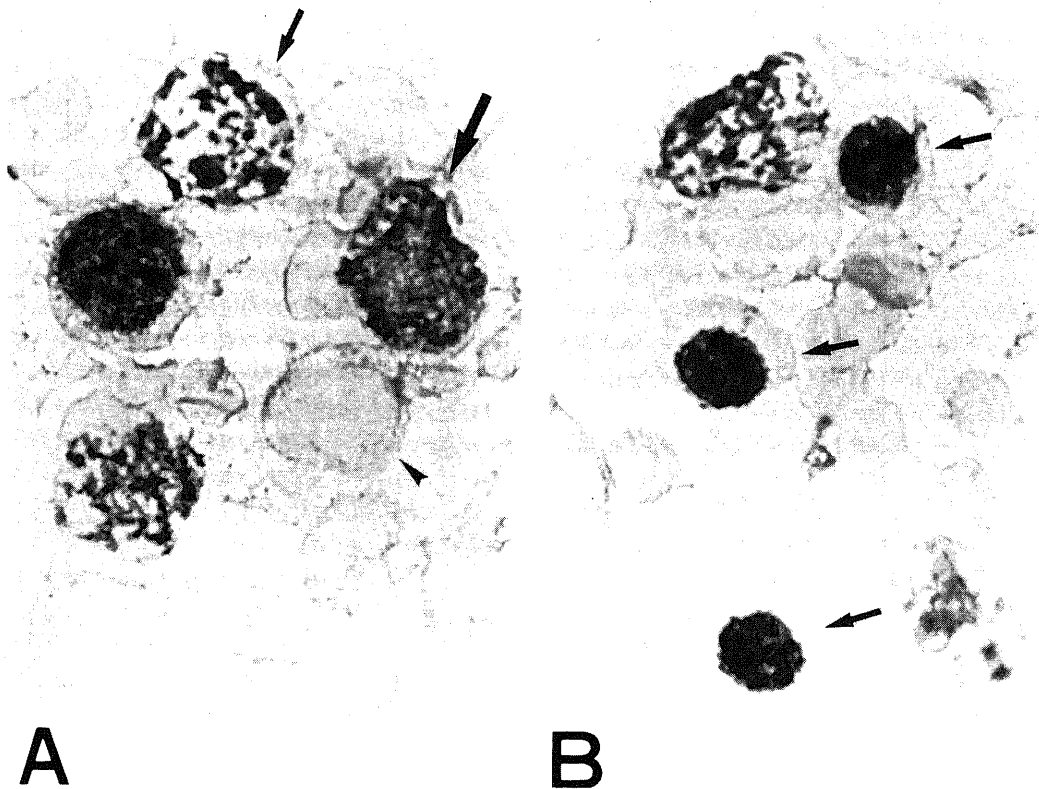


Fig. 3. Immunoperoxidase-stained bone marrow cells from the leukemic patient (case 15). Nuclei of the cells incorporating BrdU were diffusely (large arrow), or coarsely (small arrow) stained. Unlabeled cells were also observed (arrow head) (A). Erythroblasts (arrows) and leukemic cells were seen. Erythroblasts were labeled with BrdU (B). ( $\times 1,000$ ).



胞は比較的良好に染まり、同定が可能となった。しかし、操作中に生ずる変性のためか、細胞質内のアズール顆粒およびアウエル小体は染まらなかった。また、ギムザ染色はやや薄く染めることが肝要であり、染色時間が20分以上になると核も濃染するために、本剤をわずかに取り込んだ細胞では標識されているか否かの判定が不可能となった。

## II. プロモデオキシウリジンによる標識率の算定結果

31例の骨髄中の白血病細胞のプロモデオキシウリジンによる標識率は、2.4%から15.6% (平均±標準偏差 (mean±standard deviation), 以下同じ, 7.2±6.7%) であった (表1および図4)。

骨髄中の白血病細胞の割合に従って、50%未満4例、50%以上80%未満7例および80%以上20例の3群に分類して検討すると、各群の最小値、最大値および

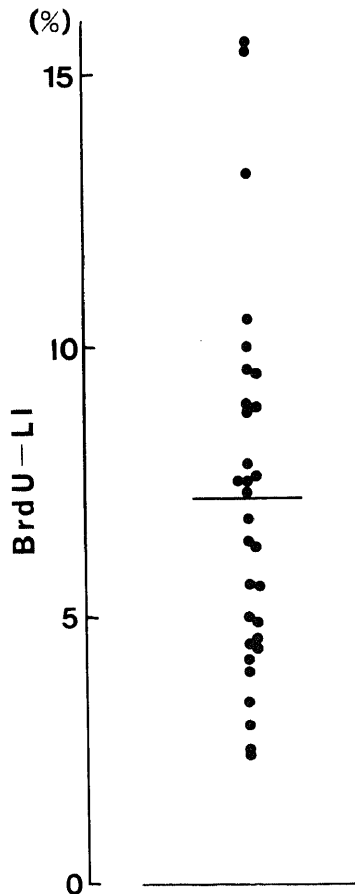


Fig. 4. Distribution of BrdU-LIs in 31 cases. The mean±standard deviation (mean±S.D.) was 7.2±3.4%.

平均±標準偏差はそれぞれ4.5%から7.5% (5.7±1.6%), 5.0%から15.4% (9.2±3.3%) および2.4%から15.6% (6.8±3.4%) となり、一次元配置による検定では3群間に統計上有意味な差は認められなかった (図5)。骨髄の有核細胞数により低形成、正形成および過形成の3群に区別し、各々の標準率の最小値、最大値および平均±標準偏差をみると、それぞれ4.2%から8.8% (7.0±1.7%), 3.0%から10.5% (5.5±3.4%) および2.4%から15.6% (7.5±3.7%) であり各群間に一次元配置による検定では統計上有意味な差はみられなかった (図6)。

## III. DNA 合成期時間の算定結果

DNA 合成期時間を算定するために、2回のプロモデオキシウリジンの静脈内投与を行った13例の第1回目に算定した標識率の値は、2.5%から10.5% (平均±標準偏差, 以下同じ, 7.2±2.4%) であった。本剤の持続点滴静注終了直後に測定した第2回目の標識率の値は、3.6%から16.1% (10.3±3.8%) に上昇した。1回

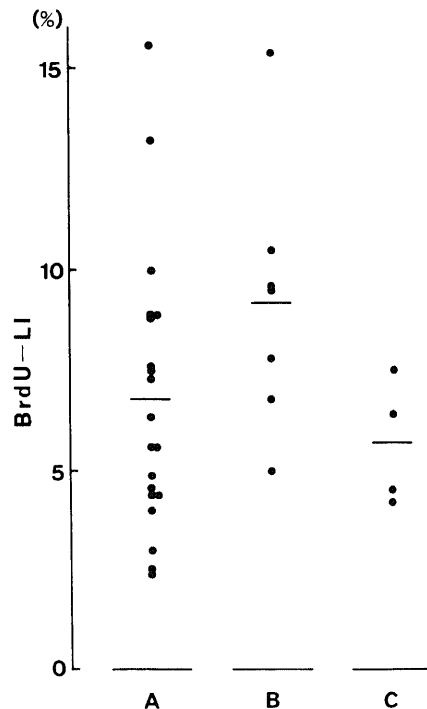


Fig. 5. BrdU-LIs vs. the percentage of leukemic cells in bone marrows. Thirty-one cases were divided into three groups according to the percentage of leukemic cells in bone marrows. A,  $\geq 80\%$ ; B, 50%~80%; C,  $< 50\%$ .  $p > 0.1$  (statistically not significant in one way layout method).

目および2回目に算定した標識率より求めたその増加率 ( $\Delta$  LI) は、0.8%から6.3% ( $3.1 \pm 1.9\%$ ) となった。なお、第2回目の標識率が第1回目の標識率より低値を示した例はなかった(表2, 図7A, B)。

以上の結果より求めた DNA 合成期時間は、3.1時間から27.4時間 ( $9.7 \pm 6.7\%$ ) となった(図8)。

骨髓中の白血病細胞の占める割合により80%未満の4例および80%以上の9例に分類しそれぞれの DNA 合成期時間をみると、前者は4.4時間から19.5時間 ( $8.5 \pm 7.4$ 時間)、後者は3.1時間から27.4時間 ( $10.6 \pm 7.8$ 時間) となり、両者の間に一次元配置による検定では統計上有意差はなかった(図9)。

IV. プロモデオキシウリジンの副作用

今回の31例44回の静脈内投与では、自覚的にも他覚的にもプロモデオキシウリジンによると考えられる副

作用は全く認められなかった。

考 察

腫瘍細胞の増殖動態は、疾患の組織学的悪性度、治療効果および予後と密接に関連するとされており、これまで、脳腫瘍、胃癌、子宮内膜癌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きている<sup>11-13</sup>。急性白血病においても、白血病細胞の増殖動態は、患者の年齢、全身状態および白血病の病型などとともに、治療計画を決定する上できわめて重要な要素の一つとなっている<sup>10</sup>。すでに Yoshida ら<sup>14</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トリチウムチミジン (tritiated thymidine, <sup>3</sup>H-TdR) の標識率 (labeling index, LI) を知り、標識率の高、低によって治療法を変え、良好な寛解率を得ており、Hillen ら<sup>15</sup>もフローサイトメトリーを用いて観察し、DNA 合成期にある細胞の多い例は高率に寛解に達したと述べている。また、Raza ら<sup>16</sup>は DNA 合成期にある細胞が多く、DNA 合成期の時間も短縮して増殖が旺盛であると推定される例では、直ちに強力な治療を行い、逆に DNA 合成期にある細胞が少なく、長い細胞回転時間を有する例では、未治療で経過を観察するか、あるいは少量長期にわたる化学療法を選択するとよいとしている。このように、腫瘍細胞の増殖動態と臨床との密接な関係を示す報告は数多くみられる。さらに、現在使用されている抗腫瘍剤のほとんどが増殖相 (非増殖相 (G<sub>0</sub>期) 以外) にある細胞に作用し、しかも、特定の増殖期にある細胞に効果を示すことから<sup>10</sup>、細胞回転の各相にある細胞の比率および各相を細胞が通過する時間を正確に求めることは、治療上きわめて有用である。

腫瘍細胞の増殖動態を解析する方法としては、これまで、ラジオアイソトープで標識された核酸前駆物質であるトリチウムチミジンやトリチウムウリジン (<sup>3</sup>H-uridine) を用いてオートラジオグラフィ法により観察する方法<sup>4-8</sup>およびフォイルゲン (Feulgen) 反応<sup>20-22</sup>あるいはフローサイトメトリーにより核 DNA 量を定量的に観察する方法<sup>23-26</sup>が繁用されてきた。しかし、これらの方法には、①ラジオアイソトープを使用するために場所ならびに対象に制限がある、②解析までに長時間を要する、③DNA 量から細胞回転状態を推定するために不正確となる、などの問題があり、刻々と変化する臨床の場では、十分に応用されてはいなかった。1982年、プロモデオキシウリジンに対するモノクローナル抗体が開発され、市販されるようになったために<sup>9</sup>、プロモデオキシウリジンを用いて免

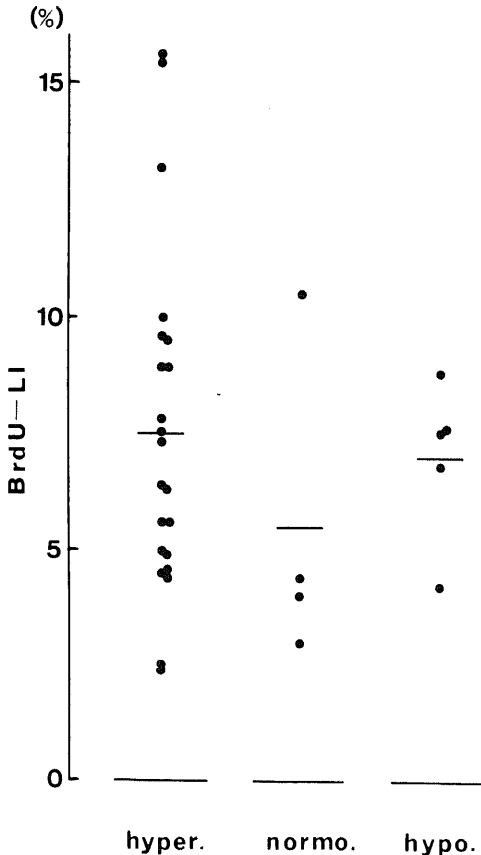


Fig. 6. BrdU-LIs vs. the cellularities of bone marrows. "hypo" denotes hypocellular bone marrow; "normo" denotes normocellular bone marrow; "hyper" denotes hypercellular bone marrow.  $p > 0.1$  (statistically not significant in one way layout method).

疫組織化学的方法<sup>27)</sup>ならびにフローサイトメトリー法<sup>28)29)</sup>により、容易にしかも短時間に DNA 合成期にある細胞を算定できるようになった。また、白血病では、腫瘍細胞の増殖の場が骨髄を中心として多臓器にわたるために<sup>30)</sup>、生体外では生体内での動態を正確に把握することは困難であり、従来より生体内での解析が望まれており、直接生体に投与できるプロモデオキシウリジンの導入は、この分野での一層の発展を期待させる。

本研究では、プロモデオキシウリジンを用いて急性白血病における生体内での増殖動態の解析が可能か否かを、まず本剤による標識率を指標にして検討した。さらに、プロモデオキシウリジンの一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 DNA 合成期の時間を求める方法を考案し、その有用性につき検討した。本研究では、患者本人あるいは家族より十分な説

明による同意を得た上で本剤の投与を行っているが、注意すべきことは、この薬剤を直接生体内に投与することにより生ずる副作用である。プロモデオキシウリジンは、すでに放射線増感剤として臨床に用いられており、とくに脳外科領域においては、プロモデオキシウリジンと代謝拮抗剤の持続的動脈内投与を併用した放射線療法 (BrdU-Antimetabolite-continuous intraarterial infusion Radiation therapy, BAR 療法) として繁用され、総量 15g から 50g の大量が血管内あるいは脳室内に投与されている。その際の副作用としては、一過性の爪の変形、軽度の白血球の減少以外、特記すべきものは報告されていない<sup>31)32)</sup>。本研究での投与量は、 $200\text{mg}/\text{m}^2$  ときわめて少量であり、今回の症例では本剤によると思われる副作用は全く認められなかった。Raza 等<sup>33)</sup>の報告でも本研究とほぼ同じ量を投与しているが、副作用はみられていない。まず安全に投与できるものと考えられるが、人体外の検討

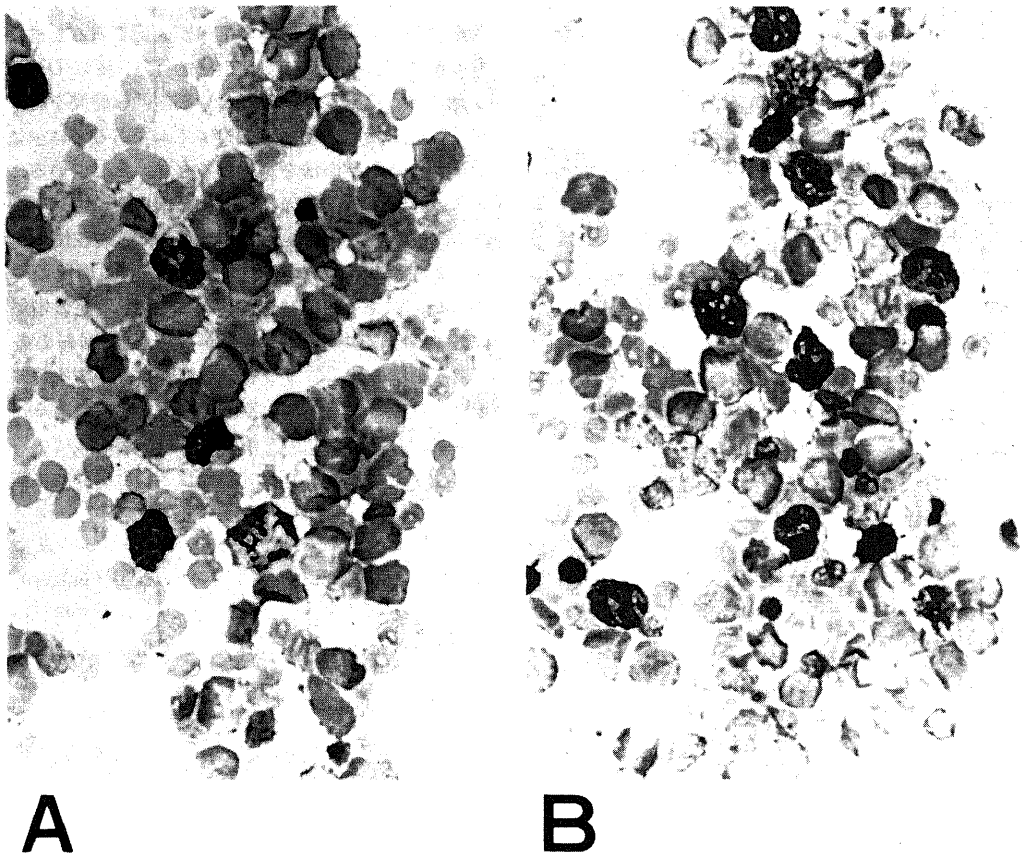


Fig. 7. BrdU-LI·1 and BrdU-LI·2 of the case 15. BrdU-LI·1 was 8.9% (A). BrdU-LI·2 increased to 10.9% (B). ( $\times 400$ )

では、本剤には発癌作用はないものの核 DNA 内に取込まれるために突然変異誘発作用があるとされており<sup>30</sup>、投与には慎重を要するものと思われる。

次にプロモデオキシウリジンによる標識率を求めるための本剤の投与方法について検討する。静脈内投与後プロモデオキシウリジンが長時間血中に残存した場合には、投与から骨髄穿刺までの間に第一間期 (the first growth phase, G<sub>1</sub> 期) から DNA 合成期に移行してきた細胞が、次々に標識されることが予想される。とくに、DNA 合成期にある細胞の割合が少なく、しかもその時期の時間の短い例においては、プロモデオキシウリジンによる標識率が実際の DNA 合成期にある細胞の割合よりも多く算定される危険性がある。したがって、本剤を投与すると同時に骨髄穿刺を施行しなければならないという手技上の問題が生ずる。しかし、プロモデオキシウリジンの体内での代謝をみると、静脈内投与後、肝において速やかに脱プロム化を受け、10分後に血中濃度は10%以下となるとされている<sup>30</sup>。このようにプロモデオキシウリジンの血中半減期はきわめて短く、生体への1回の投与により、ほぼその瞬間に DNA 合成期にある細胞を標識 (pulse labeling) することになると考えられ、投与後患者の状態の観察ならびに骨髄穿刺の準備のために、本法のように穿刺までに30分間程度の余裕を取っても差し支えないものと思われる。

プロモデオキシウリジンの投与量は、既述のように投与後の長期にわたる副作用を考慮すると、DNA 合成期にある全ての細胞が標識される最少の量が望ましい。しかし、プロモデオキシウリジンの投与量とそれによる標準率との関係について実験的に検討した報告によると、両者間には正の相関があるとされている<sup>30</sup>。ので、量が少なすぎると DNA 合成期にある細胞を十分には検出できない可能性もある。重要な点ではあるが、同一患者において投与量を変えて検討することは不可能であるため、本研究では、Raza ら<sup>30</sup>の報告に従い1回の量を 200mg/m<sup>2</sup>とした。なお、Raza ら<sup>30</sup>は、最近、100mg/m<sup>2</sup>に減量しての検討を行い、200mg/m<sup>2</sup>を投与した際の標準率とほぼ一致した結果であったと報告し、副作用を考慮して 100mg/m<sup>2</sup>への減量を勧めている。今後、さらに減量が可能か否か検討を要することと考える。

プロモデオキシウリジンを取り込んだ細胞の検出法としては、免疫組織化学的方法およびフローサイトメトリー法の2つがある。フローサイトメトリーにより解析するためには、白血球細胞が80%以上を占め、しかも 10<sup>7</sup>/ml 個以上の細胞が採取可能でなければならないという制約がある。急性白血球では、細胞数の少ない例 (低形成性白血球)、白血球細胞の占める割合の低い例 (low percentage leukemia)、さらに骨髄異形成症候群などのように、フローサイトメトリーでの解

Table 2. BrdU-LI-1, BrdU-LI-2 and Ts.

Case <sup>(1)</sup>	LI-1 <sup>(2)</sup> (%)	LI-2 <sup>(3)</sup> (%)	ΔLI <sup>(4)</sup> (%)	Ts (hr)
7	9.6	15.9	6.3	4.6
8	8.9	12.2	3.3	8.1
9	7.8	9.0	1.2	19.5
10	4.4	5.5	1.1	12.0
11	7.6	10.4	2.8	8.1
12	10.5	16.1	5.6	5.6
13	5.0	8.4	3.4	4.4
14	7.3	8.1	0.8	27.4
15	8.9	10.9	2.0	13.4
18	5.6	11.1	5.5	3.1
19	4.9	6.7	1.8	8.2
30	10.0	15.7	5.7	5.3
31	2.5	3.6	1.1	6.8
mean±SD	7.2±2.4	10.3±3.8	3.1±1.9	9.7±6.7

The Ts of 13 patients were investigated. In all cases, BrdU-LI-2 was larger than BrdU-LI-1. (1), Case numbers were identical to those in Table 1.; (2), BrdU-LI-1; (3), BrdU-LI-2; (4), (BrdU-LI-2) - (BrdU-LI-1).

析に適さない例がしばしばみられる<sup>30)</sup>. このような例には、個々の細胞の形態を観察しながら同時にプロモデオキシウリジンの標識状態をみることのできる、免疫組織化学的方法が適している. したがって本研究では、すでに著者らが改良した方法<sup>13)</sup>に従って免疫組織化学的染色を施した.

血液細胞は小型であるために、よく伸展した状態で観察する必要があり、骨髓塗抹乾燥標本を作製し、用いた. 細胞が重なり合わないようできるだけ薄く塗抹し、直ちに冷風を当て2時間以上乾燥させた. 乾燥はきわめて重要な操作であり、これが不十分な場合には、染色中にしばしば細胞の剝離あるいは変形がみられた. プロモデオキシウリジンの取り込みの観察には酵素抗体間接法を用いた. 本剤が取り込まれているか否かの観察には、より多くのペルオキシダーゼ (peroxidase) の付着するペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ (peroxidase anti-peroxidase, PAP) 法あ

るいはアビチン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin peroxidase complex, ABC) 法が優れているが、反応が強すぎると核が濃く染まり却って核の形態ならびにプロモデオキシウリジンの取り込みの量が十分に観察できなくなる危険性があるために、本研究では用いなかった. なお、抗プロモデオキシウリジン・モノクローナル抗体は、市販のものをリン酸緩衝液にて約10倍に希釈して用いることにより良好な反応性が得られた.

ジアミノベンチジンの発色では、標識された細胞の核が黒褐色に染まってみえるのみであり、細胞形態の観察は不可能である. 形態の詳細な観察には後染色が重要であり、すでに著者らは種々の染色法について検討し、対象が血液細胞であることも考慮して、ギムザ

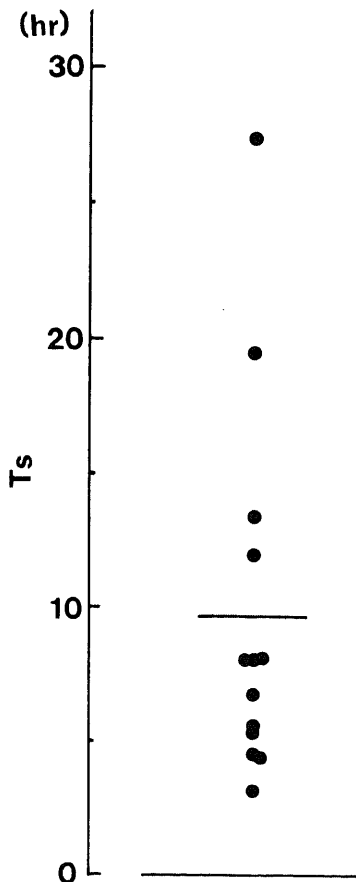


Fig. 8. The distribution of Ts in 13 cases. Mean  $\pm$  S.D. was  $9.7 \pm 7.7\%$ .

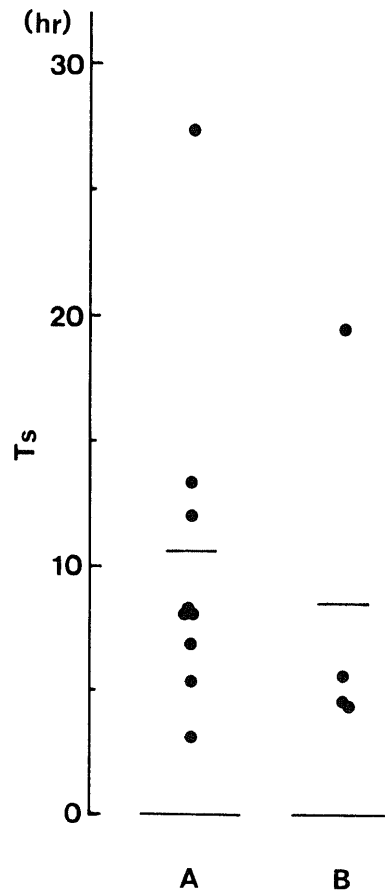


Fig. 9. Ts vs. the percentage of leukemic cells in bone marrows. Thirteen cases were divided into two groups according to the percentage of leukemic cells in bone marrows. A,  $\geq 80\%$ ; B,  $< 80\%$ .  $p > 0.1$  (statistically not significant in one way layout method).

染色を用いている。本研究でもギムザ染色を行ったが、できるだけ薄く染色し、しかも細胞形態が十分に観察可能であることが肝要で、濃く染めると形態はよく観察できるが、核も濃染するためにプロモデオキシウリジンの取り込みの状態が観察できなくなった。このように注意しながら後染色を施すことにより、白血病細胞の占める割合が80%未満であった11例においても、白血病細胞とそのほかの細胞とは容易に鑑別でき、白血病細胞のみのプロモデオキシウリジンの取り込み状態を正確に把握することが可能であった。

以上のようにして染色した標識細胞の核は、微細顆粒状に染まるものから核全体が濃染するものまで様々であった。このような染色態度の差異を、Dierendonckら<sup>37)</sup>はDNA合成期におけるDNA合成部位の違いによるものとしている。つまり、細胞がDNA合成期に入りDNA合成する際には、まず多数あるイントロンをほとんど同時に複製し、次に各遺伝子の部分へと移行し、さらに核小体周囲および核小体へと進み、最後は核膜とDNA附着部位を複製し、終了する。従って、プロモデオキシウリジンが投与された時に細胞がDNA合成期のどの時期にあったかにより、①核小体を除いた核全体の微細顆粒状の発色、②核全体が濃染、③核小体周囲の環状の発色、④核小体のみの染色、⑤複数の粗な対となった顆粒、の5つのパターンに分けられ、染色態度を観察することにより、標識細胞がDNA合成期のどこに位置していたかを判定できるとしている。本研究でも、注意深く観察したが、それぞれそのパターンの中に種々移行型があり5つのパターンに分けるのはきわめて困難であった。しかし、染色態度に差があるのは確かであり、今後増殖態度との関係について検討を要することと考える。

これまで報告されている、未治療例の骨髓中の白血病細胞のDNA合成期の細胞の比率をみると、トリチウムチミジンを用いたオートラジオグラフィ法およびフローサイトメトリーによるDNA量からの算定では、2%から20%である(表3)。Razaら<sup>38)</sup>の行ったプロモデオキシウリジンを用いた生体内における初めての検討でも同様な値であった。当研究で得られた本剤による標識率は、2.4%から15.4%、平均値7.2%とこれまでの報告と一致する結果であり、本法の正確さを示すものと考えられる。これまではDNA合成期にある細胞の比率と、白血病の病型、白血病細胞の数およびその割合、さらには前治療の有無の間にはいずれも有意な相関はみられていない<sup>38,39)</sup>。今回の検討でも、骨髓中の白血病細胞の割合および骨髓の有核細胞数に従ってプロモデオキシウリジンによる標識率を比

較したが、統計学上有意な差はみられなかった。しかし、これまでの報告がいずれも小数例についての検討であるため、直ちにこれらの間に差がないと断定できない。今後の症例の積み重ねが必要であろう。

次に、DNA合成期時間の求め方について考察する。細胞回転上、細胞が最も活発に生物学的活動を行うのは、DNAを合成する時期である<sup>40)</sup>。従ってDNA合成期の長短は、その時期にある細胞の比率とともに細胞の増殖能を示す最も良い指標となる。また、臨床上也、ほとんどの抗腫瘍剤がこの時期に作用するために、その効果を予測する目的で、これまでもその時間を求めるための検討がなされてきている<sup>41-7)</sup>。DNA合成期の算定法としては、核DNA内に取り込まれた標識物質が経時的に変化していく過程を追跡する方法および一定時間標識物質を細胞に作用させて、その取り込み量の増加より算出する方法とがある。

Clarksonら<sup>4)</sup>はかつて、前者を用い、急性白血病患者にトリチウムチミジンを1回投与し、オートラジオグラフィ法によりトリチウムチミジン標識細胞の数的、質的变化を観察し、生体内におけるDNA合成期時間を含めた細胞回転時間を算定した。しかし、この方法は算定までに時間を要し、また頻りに骨髄穿刺を施行しなければならず、臨床には応用できない。一方、Paiettaら<sup>42)</sup>は、後者に従い、トリチウムチミジンおよび<sup>14</sup>Cで標識されたチミジンの2種類のラジオアイソトープを用いて、二重標識法を行い、一定時間での両者の標識率の差を求めて、生体内におけるDNA合成期時間を算定している。また、Razaら<sup>38)</sup>も、一旦プロモデオキシウリジンにより生体内での一回標識を行った後に骨髓細胞を採取し、生体外で一定時間トリチウムチミジンとともに培養した後、オートラジオグラフィ法を用いてプロモデオキシウリジンによる標識率とトリチウムチミジンによる標識率との差を求め、DNA合成期時間を算定している。しかし、これらの方法は、いずれもラジオアイソトープを使用するために、現在では生体内での算定は不可能である。これまで、ラジオアイソトープを用いた方法以外で生体内における急性白血病細胞のDNA合成期時間を求めた報告はない。近年、Sasakiら<sup>43)</sup>は、培養実験細胞にプロモデオキシウリジンを一定時間持続的に接触させ、フローサイトメトリーによりこの間に増加した標識率を知り、DNA合成期時間を算定する方法を報告している。本研究では、この方法を応用して、急性白血病患者に一定時間プロモデオキシウリジンを持続点滴し、その標識率の増加率からDNA合成期時間を算定する方法を考案し、検討した。つまり、1回目のプ

Table 3. Cell cycle parameters analysed by various methods.

Method	Case	Cell cycle phase								
		G <sub>1</sub>		S		G <sub>2</sub>		M		GF <sup>(9)</sup>
		hr	%	hr	%	hr	%	hr	%	hr
A) in vivo <sup>3</sup> H-TdR <sup>(1)</sup> ARG <sup>(2)</sup>	ref <sup>(6)</sup> .4) 1	24	5.6	22		3	0.66			49
	2	61	6.1	19		3	0.52	0.47		83
	ref.7) AML	109	3.4	20		3	0.4	0.62		134
	AML	74	4.8	21		3	0.2	2		99
	AML		5.9					1		
	AML		2.2							
B) in vitro <sup>3</sup> H-, <sup>14</sup> C-TdR ARG	ref.8) AL <sup>(7)</sup> (20 cases)					5.1±0.6 <sup>(8)</sup>				
	AML			20.0						
	AML			25.3						
	AML			34.7						
	AML			26.7						
	ALL			21.7						
C) PI <sup>(3)</sup> sain FCM <sup>(4)</sup>	ref.22)									
	AML (13 cases)			9.0±2.8						
	ref.24)									
	ALL			8.2±7.0		5.5±2.3				
D) in vivo DNA/BrdU FCM	ref.11)									
	AL (11 cases)			10.6±5.2						
E) in vitro BrdU IHC <sup>(5)</sup>	ref.31)									
	AL (26 cases)			10.0±5.9						

This table summarizes cell cycle parameters calculated by various methods. A), autoradiography (fraction of labeled mitosis) method (<sup>3</sup>H-TdR was administrated to the patients with acute leukemia. The duration and the percentage of each period were obtained.); B), autoradiography (double labeling) method (By incubating bone marrow cells with <sup>3</sup>H-TdR and <sup>14</sup>C-TdR in vitro, the percentage of leukemic cells in S phase (LI) and Ts were obtained.); C), flow cytometry method (Mononuclear bone marrow cells were stained with propidium iodide, and the fluorescence was measured. The LI and the percentage of leukemic cells in G<sub>2</sub> phase were obtained.); D), flow cytometry method (BrdU was administrated to the patients with acute leukemia. In vivo BrdU-LIs were obtained.); E), immunohistochemical method (By incubating bone marrow cells with BrdU, in vitro BrdU-LIs were estimated.). (1), tritiated thymidine; (2), autoradiography; (3), propidium iodide; (4), flow cytometry; (5), immunohistochemical method; (6), reference; (7), acute leukemia; (8), mean±standard deviation; (9), growth fraction.

ロモデオキシウリジンの一回静脈内投与による標識により得られた標識率を前値 (BrdU-LI・1) とし、これと1回目の骨髄穿刺後150分をかけて再びこの薬剤を持続点滴した後に得られた標識率の値 (BrdU-LI・2) から、その増加率 ( $\Delta$  LI) を算定し、DNA 合成期時間を求めた。なお、この方法では、プロモデオキシウリジンを取り込んだ細胞が、分裂期に入る前に持続点滴を終了し、2回目の骨髄穿刺を施行する必要があるために、白血球細胞の第二間期が約180分であるとの報告<sup>9)</sup>を参考にして、1回目のプロモデオキシウリジン投与から2回目の点滴終了までの時間を180分と定めた。さらに、本方法で DNA 合成期時間を求めるには、個々の細胞間で増殖相の各時期を通過する時間に差がなく、しかも180分の間に、非増殖相を含めた各時期の細胞数にも変化がないと仮定する必要がある<sup>10)</sup>。本研究で得られた標識率の増加の平均値は3.1%であり、2回目の標識率が1回目よりも低値を示した例はなく、今回用いた免疫組織化学的方法でも、十分に増加率を把握できるものと考えられた。

このように算定した未治療急性白血球13例の DNA 合成期時間は平均値で9.7時間であり、これまでの報告とほぼ一致する結果が得られたが、症例によりかなりのバラツキがみられた。本研究で得られた生体内におけるプロモデオキシウリジンによる標識率の値および DNA 合成期時間の値より、急性白血球細胞の細胞回転状態をみると、症例によりバラツキはあるものの、DNA 合成期にある細胞の比率は意外に少なく、また、その時間もかなり長く、細胞の増殖力は想像以上に弱いのではないかと推定される。このことから、白血球細胞の増加は、細胞の分裂によるものよりも、むしろ、一旦産生された細胞が長期にわたり生存し、次々と蓄積されることにより生ずるのではないかと考えられる。

本研究により、プロモデオキシウリジンおよびそのモノクローナル抗体を用いて生体内における白血球細胞の増殖動態を把握できることが明らかになった。今回の生体内での研究では、これまでの生体外での解析とほぼ同様の成績が得られたが、今後、前白血球状態の解析、再発ならびに薬剤耐性の問題など、生体と密接に関連するような事柄について検討する際には、直接生体内での増殖動態を知り得る本法は、きわめて有用な手段になるものと考えられる。

あるプロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) とそのモノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的方法により検討した。対象は未治療の急性白血病患者で、細胞動態を知る指標として、この薬剤による標識率 (BrdU-LI) および DNA 合成期時間 (Ts) の2つを選び、これらの算定の可能性について検討し、以下の結果を得た。

1. プロモデオキシウリジンによる標識率の算定のために、本剤 200mg/m<sup>2</sup>を一回で静脈内に投与し、一回標識を行った後に1回目の骨髄穿刺を施行し、塗抹乾燥標本を作製し、酵素抗体法間接法により染色した。なお、後染色としてギムザ染色を施行した。この方法により、細胞の形態とプロモデオキシウリジンの取り込み状態の両者ともに良好に観察できた。

2. 今回対象とした31例のプロモデオキシウリジンによる標識率は、2.4%から15.6%、平均値で7.2%であり、これまでの報告とほぼ一致する結果を得た。

3. DNA 合成期時間を算定するために、1回目の骨髄穿刺後再びプロモデオキシウリジン 200mg/m<sup>2</sup>を150分かけて持続点滴し、2回目の穿刺 (1回目のプロモデオキシウリジン投与180分後) を行い、その標識率の増加率 ( $\Delta$  LI) を求めた。この方法により、平均値で3.1%の標識率の増加を得た。

4. 今回検討した13例の DNA 合成期時間は、3.1時間から27.4時間、平均値で9.7時間となり、症例によりかなりバラツキはみられるものの、これまでの報告にほぼ一致する成績であった。

5. プロモデオキシウリジンによる標識率および DNA 合成期時間と骨髄中の白血球細胞の割合ならびに骨髄の有核細胞数との間には、有意な相関はみられなかった。

6. 生体内で算定したプロモデオキシウリジンによる標識率は比較的低値であり、DNA 合成期時間も長いことから、急性白血球細胞の増殖力は弱いと推定した。

本研究で検討した方法により、安全にしかも容易に生体内における白血球細胞の DNA 合成期にある細胞の比率ならびに DNA 合成期時間を早期に知り得ることが分かった。さらに本法は細胞形態をも同時に観察可能であり、フローサイトメトリー法に比較して応用範囲は広いと考える。

## 結 論

骨髄中の白血球細胞の細胞動態を、生体内で解析するための方法を開発する目的で、チミジンの同族体で

## 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感謝の意を表します。また、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血液グループの諸先生方に深謝いたします。

なお、本論文の一部は、第31回日本臨床血液学会総会(1989年)において発表した。

### 文 献

- 1) Kawata, T., Yoneyama, Y., Sugiyama, K., Ooyama, 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).
- 2) 松谷雅生, 河野 武, 浅井明雄, 藤巻高光, 林幸子, 小池盛雄, 田村 晃, 佐野圭司: Bromodeoxyuridine モノクローナル抗体による脳腫瘍成長解析法. *医学のあゆみ*, **133**, 876-877 (1981).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 太田和雄:  $^3\text{H}$ -サイミジンの血液学への応用, *日血会誌*, **27**, 693-704 (1964).
- 8) 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).
- 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) Raza, A., Ucar, K. & Pleisler, M. D.: Double labeling and in vitro versus in vivo incorporation of bromodeoxyuridine in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cytometry*, **6**, 633-640 (1985).
- 11) Dolbeae, F., Gratzner, H., Pallavicini, M. G. & Gray, J. W.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 5573-5577 (1983).
- 12) 神野正敏, 吉田 喬, 大竹茂樹, 小林和美, 平井潤子, 武田 康, 松田 保: BrdU を用いた In vivo における白血病細胞動態の解析. *フローサイトメトリー*, **8**, 98-101 (1988).
- 13) Nakamura, S., Takeda, Y. & Kanno, M.: Practical uses of bromodeoxyuridine in the field of diagnostic cytology. *Mitteilungsdienst-GBK*, **17**, 102-105 (1989).
- 14) 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).
- 15) Wimber, D. E. & Quastler, H.: A  $^{14}\text{C}$ - and  $^3\text{H}$ -thymidine double labeling technique in the study of cell proliferation in tradescantia root tips. *Exp. Cell Res.*, **30**, 8-22 (1963).
- 16) 土屋 純, 前川 正: 細胞回転と化学療法. *癌と化学療法*, **5**, 717-726 (1973).
- 17) Yoshida, T., Hattori, K., Nakamura, S., Mitamura, E., Kobayashi, S., Ohtake, S. & Tanimoto, K.: A simple rapid autoradiography for  $^3\text{H}$ -thymidine labeling index and its application to therapy of adult acute leukemia. *Cancer*, **46**, 2298-2307 (1980).
- 18) Hillen, H., Wessels, J. & Haanen, C.: Bone-marrow-proliferation patterns in acute myeloblastic leukemia determined by pulse cytophotometry. *Lancet*, **1**, 609-611 (1975).
- 19) 小川一誠: 細胞回転と癌化学療法. *癌と化学療法*, **3**, 1093-1101 (1971).
- 20) 小原寛治: 人急性白血病細胞の DNA 量に関する研究—顕微分光測光法による検討—. *日血会誌*, **33**, 363-381 (1970).
- 21) 丸尾直幸, 中坊俊雅, 堀内博彦, 近藤元治: 顕微蛍光測光法による白血病細胞の動態の解析. *日血会誌*, **46**, 1200-1208 (1981).
- 22) 島崎千尋, 中西 忍, 春山春枝, 伊勢村卓司, 中

川雅夫, 伊地知浜夫: 顕微蛍光測光法による白血球細胞増殖動態の解析. 日血会誌, 45, 93-97 (1982).

23) Look, A. T., Meluin, S. L., Williams, D. L., Brodew, G. M., Pahl, G. V., Kalwinsky, D. K., Murphy, S. D. & Mauer, A. M.: Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in child acute leukemia. *Blood*, 60, 959-967 (1982).

24) French, M., Manel, A. M., Magand, J. P., Fiere, D., Adeleine, P., Guyotat, D. & Bryon, P. A.: Adult acute lymphoblastic leukemia: Is cell proliferation related to other clinical and biological features? *Br. J. Haematol.*, 65, 419-423 (1987).

25) Smets, L. A., Slater, R. M., Behrend, H., Veer, M. B. V. & Blok, J. H.: Phenotypic and karyotypic properties of hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Br. J. Haematol.*, 61, 113-123 (1985).

26) 椿 和央, 岩永隆行, 入交清春, 堀内 篤: Flow cytometry による白血球細胞の増殖動態観察と治療への応用. 臨床血液, 22, 1916-1922 (1981).

27) Morstyn, 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).

28) Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M. G. & Gray, J. W.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 5573-5577 (1983).

29) Moran, R., Darzynkiewicz, Z., Staiano-coico, L. & Melamed, M.: Detection of 5-bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation by monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 33, 821-827 (1985).

30) Lichtman, L. A. & Henderson, E. S.: Acute myelogenous leukemia. In W. J., Williams, E., Beutler, A. J., Erslev, & M. A., Lichtman, (eds.), *Hematology*, 4th ed. p.251-272, McGraw-Hill, New York, 1990.

31) 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).

32) 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).

33) Raza, A., Maheshwari, Y. & Preisler, D.: Differences in cell cycle characteristics among patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*, 69, 1647-1653 (1987).

34) 中村 典: 5-ブromo-2-デオキシウリジン. 生体の科学, 35, 581-582 (1984).

35) Joseph, P. K., Maruyama, Y., Tung, L. A., Bond, S. B. & Revesz, L.: The fate of 5-bromodeoxyuridine, 5-bromodeoxycytidine, and 5-iododeoxycytidine in man. *Cancer Res.*, 23, 260-268 (1963).

36) Schutte, B., Reyniers, M. M. J., Bosman, F. T. & Blijham, G. H.: Studies with anti-bromodeoxyuridine antibodies: II. Simultaneous immunocytochemical detection of antigen of expression and DNA synthesis by in vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J. Histochem. Cytochem.*, 35, 371-374 (1987).

37) Dierendonck, J. H., Keyzer, R., Velde, C. J. H. & Corneliss, C. J.: Subdivision of S-phase by analysis of nuclear 5-bromodeoxyuridine staining patterns. *Cytometry*, 10, 143-150 (1989).

38) Hoelzer, D. & Flidner, T. M.: Studies on the regulation leukemic cell production in human acute leukemia. *Blood Cells*, 3, 519-533 (1977).

39) Arlin, Z. A., Fried, J. & Clarkson, B. D.: Therapeutic role of cell kinetics in acute leukemia. *Clin. Haematol.*, 7, 339-362 (1978).

40) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D.: *Molecular Biology of the Cell*, 1st ed. p.611-672, Garland Publishing, Inc., New York, 1983.

41) Paietta, E., Mittermayer, K. & Schwarzmeier, J.: Proliferation kinetics and cyclic AMP as prognostic factors in adult acute leukemia. *Cancer*, 46, 102-108 (1980).

42) 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).

**Studies on the Proliferative Characteristics of Leukemic Cells: In vivo Cell Cycle Analysis Using Bromodeoxyuridine** Yasushi Takeda, Department of Internal Medicine (III), Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa 920-J. *Juzen Med. Soc.*, 99, 732-748 (1990)

**Key words** acute leukemia, bromodeoxyuridine, cell cycle, immunohistochemical method

#### Abstract

To develop a useful method for in vivo analysis of the proliferative characteristics of leukemic cells, the kinetics of acute leukemic cells were investigated by a new immunohistochemical method, using bromodeoxyuridine (BrdU) and its monoclonal antibody. In order to ascertain the proliferative potential of leukemic cells, the BrdU-labeling index (BrdU-LI) and the duration of the DNA synthetic phase ( $T_s$ ) of leukemic cells in bone marrow were calculated. The method is as follows. Firstly, an informed consent was obtained from each of the 31 patients. Prior to treatment, the patients received a bolus intravenous injection of 200 mg/m<sup>2</sup> of BrdU. Thirty min after the injection, bone marrow was aspirated and air-dried smears were made. The smears were stained immunohistochemically using anti-BrdU antibody. BrdU-labeled cells were microscopically identified by the presence of brownish reaction products. The cellular features were also clearly observed by counterstaining with Giemsa stain. The BrdU-LIs were calculated as the percentage of BrdU-labeled cells among 500 leukemic cells for each patient. The BrdU-LIs of leukemic cells from 31 patients ranged from 2.4% to 15.6% (mean 7.2%). To estimate the  $T_s$ , a 150 min-drip infusion of BrdU was started immediately after the first bone marrow aspiration (BMP). After the completion of the infusion, the second BMP was performed to estimate the increasing rate of BrdU-LI ( $\Delta$ LI) during the 180 min. The mean value for  $\Delta$ LI of 3.1% was obtained from 13 patients. From the BrdU-LIs and  $\Delta$ LIs, the calculated mean  $T_s$  were 9.7 hr (range, 3.1 hr to 27.4 hr). These results were also nearly equal to the values estimated using other methods. The BrdU-LIs and  $T_s$  had no significant relationship to the percentage of leukemic cells in the bone marrow and the cellularity of the bone marrow. From these results, it is concluded that this new method is useful for analysing the cell kinetics of leukemic cells from patients with acute leukemia, especially those with hypoplastic leukemia or myelodysplastic syndrome.