



Title	Flow Cytometryによる放射線照射後の細胞動態の解析 (1)-抗BrdUモノクロナール抗体を用いた細胞動態の解析
Author(s)	赤木, 清; 田中, 敬正
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1989, 49(4), p. 477-483
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/15970
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Flow Cytometry による放射線照射後の細胞動態の解析（1）

—抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた細胞動態の解析—

関西医科大学放射線科

赤木 清田 中敬正

（昭和63年7月20日受付）

（昭和63年11月9日最終原稿受付）

Analysis of Cell Kinetics After Gamma Ray Irradiation Using Anti-BrdU Monoclonal Antibody

Kiyoshi Akagi and Yoshimasa Tanaka

Department of Radiology, Kansai Medical University

Research Code No. : 402.9

Key Words : Radiation, Cell cycle, Flow cytometry,
Anti-BrdU monoclonal antibody

The cell cycle was analyzed using anti-BrdU monoclonal antibody, and changes in cell kinetics after gamma ray irradiation as evaluated by this BrdU-PI double staining were compared with those evaluated by the DNA histogram method based on PI staining. The effect of irradiation on the cell kinetics has been studied according primarily to the number of G2 blocked cells. By the present BrdU method, rapid transition of the G1-S phase was observed within 2 hours of irradiation, and then G1 block was observed. Cells in the S phase progressed to the G2 + M phase, in which they were arrested, resulting in a decrease in the percentage of S cells to 5% or less. After 8 hours, release of G1 block was observed, and G2 + M cells returned to the G1 phase after 18 or more hours. These initial G1 blocked cells induced by irradiation were confirmed for the first time by the present BrdU-PI double staining. By the conventional method based on the DNA histogram, accurate determination of S cell fraction was difficult due to overlapping of the DNA contents of G1 cells and early S cells and those of late S cells and G2 cells. On the other hand, BrdU-PI double staining allowed direct differentiation of G1, S, and G2 + M cells, especially between G1-S and S-G2 + M cells. The analysis of cell kinetics using BrdU is advantageous over the conventional autoradiographic methods in that it allowed more rapid assay with very high sensitivity. In addition, BrdU is already used clinically as an enhancement agent in radiation therapy for cancer. The present method is considered to be indispensable for evaluation of the percentage of S cells in the tumor tissue and analysis of cell kinetics after irradiation and chemotherapy against cancer.

はじめに

従来、Flow Cytometry (FCM) による細胞動態の解析は核DNA量測定により行われている。このDNA量ヒストグラムによる細胞動態の解析、特にS期細胞の算出には、G₁期とearly S期

細胞、late S期細胞とG₂期細胞のDNA量が重なり、正確なS期細胞の分画を算出するのは困難であった。Deans^{1,2)}、高橋³⁾、Frieds^{4,5)}らにより、種々の数学的モデルが報告されており、真のS期細胞の算出を試みている。最近、Gratznerらは、彼等

が開発した抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた細胞動態の解析を報告している⁶⁾。この方法はサイミジンアナログである BrdU (Bromodeoxyuridine)をパルスラベルし、これを FITC 結合抗 BrdU モノクローナル抗体で DNA 合成細胞を検出するものである。数学的モデルを用いずに直接に G₁, S, G₂+M 期の細胞を算出できる。特に G₁-S, S-G₂ 期境界を明確に定めることができ、従来の方法の欠点を補うもので非常に有用なものである。今回、Gratzner, Gray らの報告^{7,8)}を参考に抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた Cell Cycle の解析方法を検討し放射線照射後に起こる細胞動態の変化を調べ、従来の DNA ヒストグラム法とこの本法を比較検討したので報告する。

実験材料および方法

1) 細胞：腫瘍細胞は Eagle MEM (日本) + 10%FCS の培養液で継代培養中の HeLa 細胞 (Flow Lab. より購入) を用いた。実験には対数増殖期の細胞を使用した。

2) 放射線照射：コバルト 60 遠隔照射装置を行った。照射は室温でフラスコ (Nunc 163371 25 cm²) を密栓し、5mm 厚のアクリル板にのせ、下方から線量率 0.8Gy/min で 8Gy 照射した。照射後経時に以下の染色法を施行した。

3) 染色方法：染色法には、蛍光抗体法による抗 BrdU 結合 fluorescein isothiocyanate (FITC) と Propidium Iodide (PI) による二重染色方法を用いた。その染色方法を Fig. 1 に示す。

① 細胞：培養中の細胞に 10 μM の BrdU (ラジバット 武田製薬より購入した) を 30 分間パルスラベルする。標識された細胞を Trypsin 処理し、単一浮遊細胞にして、リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄する。70% エタノールで固定後、測定するまで 4 °C で保存する。

② 酸処理による DNA 一重鎖変成処理；4N 塩酸で 30 分間、室温処理し、PBS 及びほう酸、ほう砂緩衝液 (pH 8.5) で中和する。

③ 間接法による抗 BrdU-FITC と抗体染色：抗 BrdU モノクローナル抗体 (Becton-Dekinson 社藤沢薬品より購入した) を 5 μl, 0.5% Tween 20 を含む 50 μl, 1% 牛血清アルブミン加 PBS 250 μl

Pulse Labeled with BrdU (5 μg/ml) for 30 min. in CO₂ incubator at 37°C
Washed twice with PBS.
Fixed Ethanol (70%) for 30 min. at 4°C
Treated of acid (4N HCl) for 30 min. at room temperature.
Washed twice with PBS.
Neutralize the acid with 0.1M Na₂B₄O₇ (pH 8.5)
Add the Anti-BrdU and incubate for 30 min. at room temperature.
Washed twice with PBS.
Add the FITC conjugated mouse IgG for 30 min. at room temperature.
Wash twice with PBS.
Staining with Propidium Iodide (20 μg/ml)
Flow Cytometry Analysis using a FACS Analyzer.

Fig. 1 Method of Double Staining

を加えて、37°C で 30 分間反応させる。PBS で洗浄後、FITC 標識マウス IgG 抗体 (Tago 社より購入した) を PBS で 100 倍希釈したもので 37°C, 30 分間接触反応させる。直接法を用いるなら、FITC 結合抗 BrdU モノクローナル抗体を同量、同じ溶液で反応させると 1 段階が省略できる。この後 PBS で洗浄する。

④ Propidium Iodide (PI) による二重染色；DNA 染色に低濃度 PI 液 (Sigma 社 2 μg/ml) で 30 分間行う。この場合リボヌクレアーゼ (RNase) による DNA 処理は必要でない。

⑤ FCM 装置及び測定条件：用いた FCM は (FACS Analyzer (Becton-Dekinson 社製)) であり、蛍光色素は FITC, PI を使用した。この色素の励起波長は共に 488 nm であるので Argon Laser を用いて励起を行った。蛍光測光は FITC には 530 nm の Band Pass Filter を用い、PI には 630 nm の Long Pass Filter を用いて 2 パラメーターで蛍光を測定した。

結果

1) Cytoprogram の解析方法；Fig. 2 に HeLa 細胞の対数増殖期にある細胞集団 (コントロール) の DNA ヒストグラム (Fig. 2A) を示す。BrdU-PI 二重染色での、2 次元分布、及び 3 次元表示 (Fig. 2B, C, D) を示す。従来の DNA ヒストグラムに比べて、この BrdU-PI 二重染色法は直接 G₁, S, G₂+M 期細胞を区別でき、特に G₁-S, S-G₂+

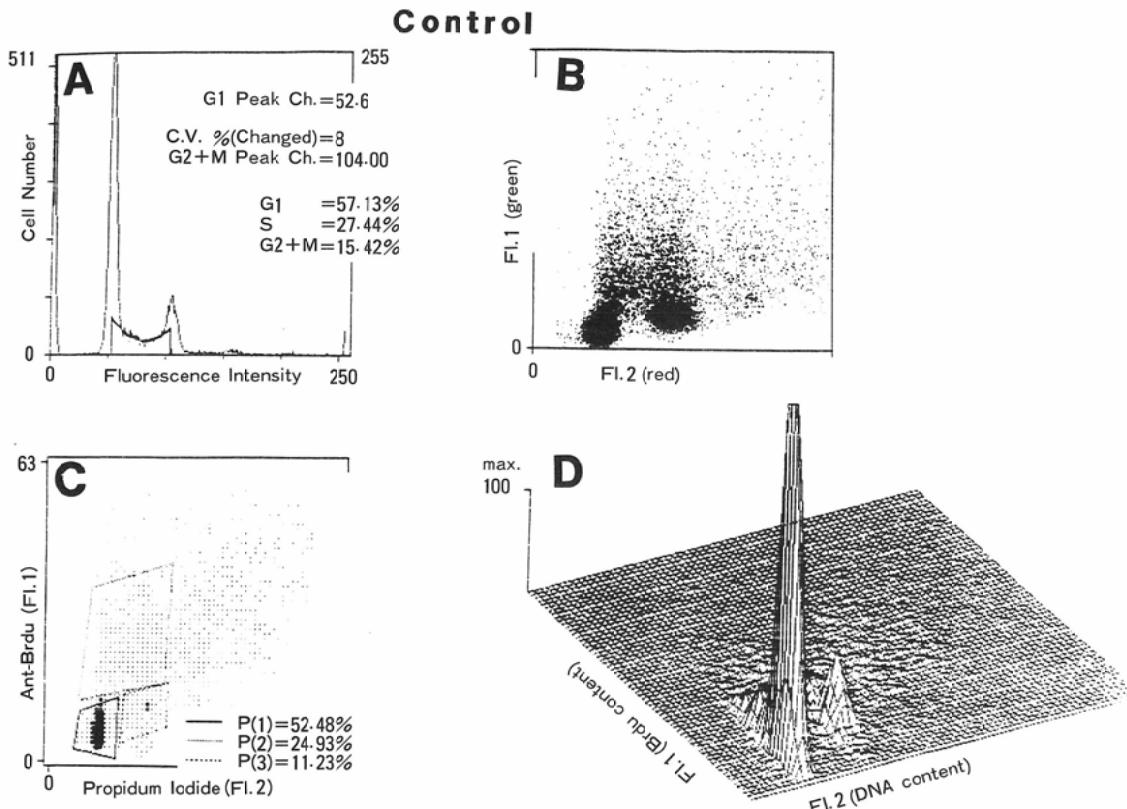


Fig. 2 Analysis of cell kinetics of HeLa cells (Logarithmic Phase)

M, 境界を明瞭に識別できた(Fig. 2C)。また Fig. 2C に示す様に対数増殖期の細胞であっても S 期の DNA 量を持つ細胞でも BrdU を取り込まない細胞(休止期 S 期細胞)が存在することが示唆された。この Control の細胞集団の S 期細胞の割合を Dean's 法による DNA ヒストグラムの解析からの算出では 27.4% (Fig. 2A), BrdU 法では 24.9% (Fig. 2C) とほぼ同じ値を得ることができた。この様な G₁ ピーク値の CV 値が小さい時には DNA ヒストグラムの解析でも二重染色法でも同じ値を得ることができた。Fig. 3 に 8Gy 照射後 24 時間に存在する細胞集団の Cytogram を示す。BrdU-PI 二重染色法で S 期細胞の割合は 4.7% と少ないが (Fig. 3C), DNA 量ヒストグラムからの Dean's の算出方法では 61% (Fig. 3C) と大きく異なった値が得られた。しかし G₁, G₂ ピークの CV 値が大きくなつたために解析できなくなつた。

2) 照射後の細胞動態の経時的変化; Fig. 4 に放射線 8Gy 照射後の 3 次元分布の経時的変化を示す。Fig. 5 にこの方法より得られたこれらの G₁, S, G₂+M 期細胞の分画の経時的変化を示す。Fig. 4, 5 より照射直後、2 時間以内に G₁ から S に急速な移行があり照射後 8 時間まで軽い G₁ Block が起こることが判った。S 期にあった細胞はそのまま DNA 合成を行い Cell Cycle を進行し、次第に G₂ 期に集積した。そして 24 時間後には S 期細胞分画が 5% 以下となつた。照射 12 時間後で G₁ から S 期細胞の移行が再開し、G₁ Block の解除が起こつた。次に G₂ 期から G₁ 期への移行、即ち G₂ Block の解除は 18 時間以降に起こつた。照射後の変化としては従来より G₂ Block の変化は示されていたが、この BrdU-PI の二重染色により照射直後に G₁-S が Block されることが判つた。また照射により BrdU の取り込み量の低下が見

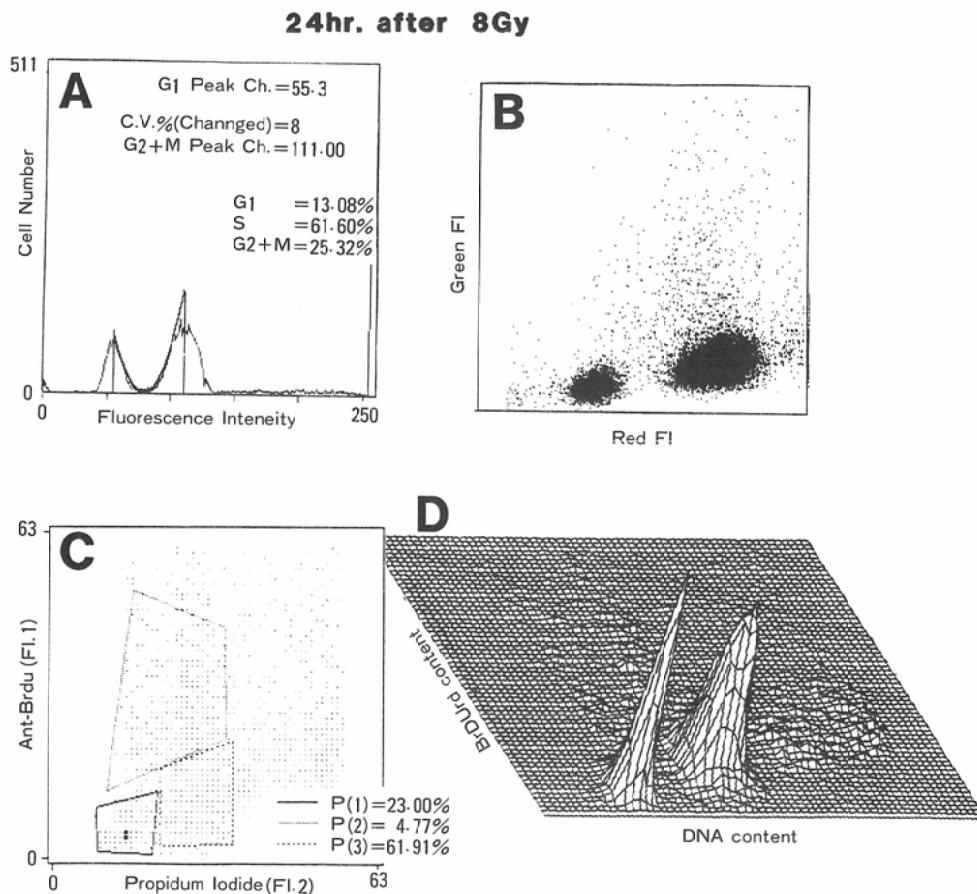


Fig. 3 Analysis of cells kinetics HeLa cells (24 hours after irradiation at 8 Gy)

られ、これはDNA合成能が低下するためと考えられる。

考 察

BrdU (5-Bromodeoxyuridine) は核酸の構成物質の thymidine の類似物質でサイミヂンのメチル基が Br に置換した物質である。BrdU は thymidine と同様に、DNA 合成期に細胞核内に取り込まれる。1982年に Gratzner らはこの BrdU を取り込んだ DNA 合成細胞を認識する单一クローニングの抗体を開発した⁶⁾。この BrdU で細胞をラベルし、DNA に intercalate したこの BrdU に特異的に結合する抗 BrdU モノクローナル抗体結合 FITC で緑色染色し、DNA 合成(S期)細胞を検出するものである。また同時に細胞核 DNA 量を PI で赤色染色し、この 2重染色を 2 パラ

メータで測定することにより正確に細胞動態 (G₁, S₁ G₂+M 期細胞の同定) を解析できる。この方法は S 期細胞を迅速、鋭敏に同定できることから細胞動態解析上、利用価値が高い。DNA 量ヒストグラムの数学的解析だけの細胞動態の解析は放射線、薬剤の影響で G₁ ピーク、G₂ ピークの CV 値が大きく変化した時には解析が困難であることを考えると、この二重染色法はいずれの場合でも容易に、かつ正確に解析できるので有用である。しかし、この染色法にも問題点がある。それはこの抗 BrdU モノクローナル抗体—FITC 染色は DNA が二重鎖では蛍光を発しないために、酸処理、煮沸等で DNA の二重鎖を一重鎖にする必要がある。この二重染色法で重要な事は DNA 一重鎖变成法にある。特に塩酸の濃度、作用時間、

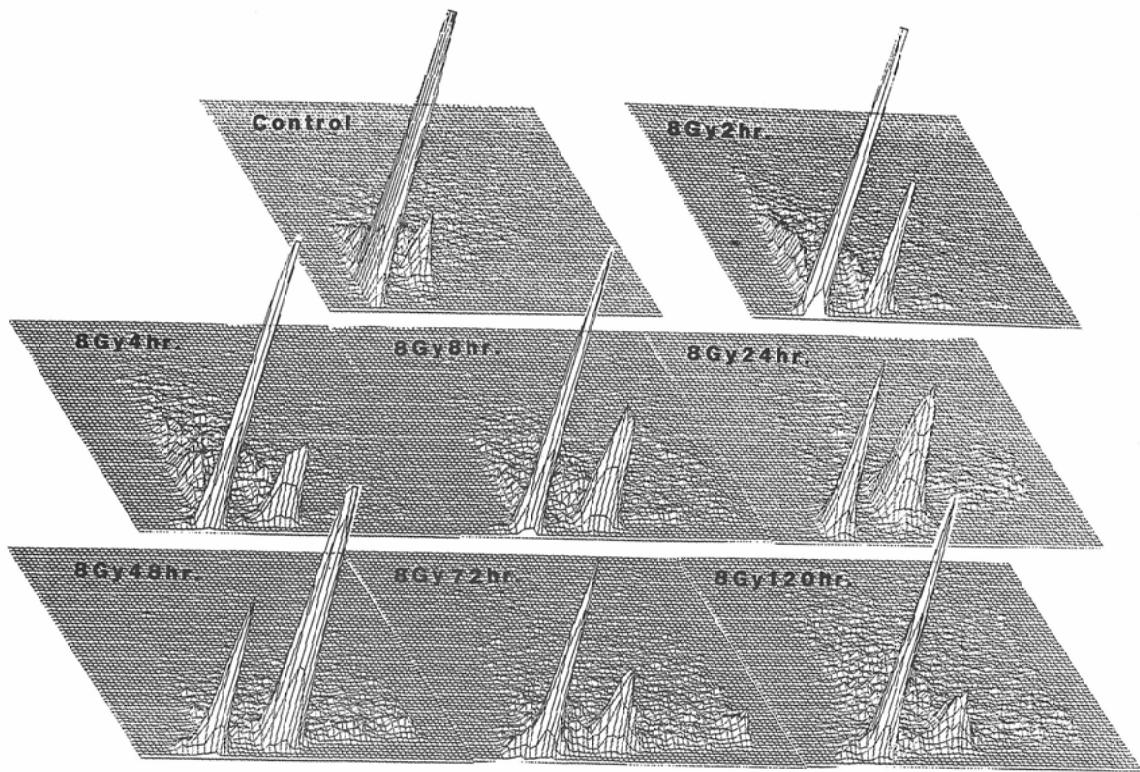


Fig. 4 Serial changes in HeLa cells after irradiation at 8 Gy (three-dimensional representation).

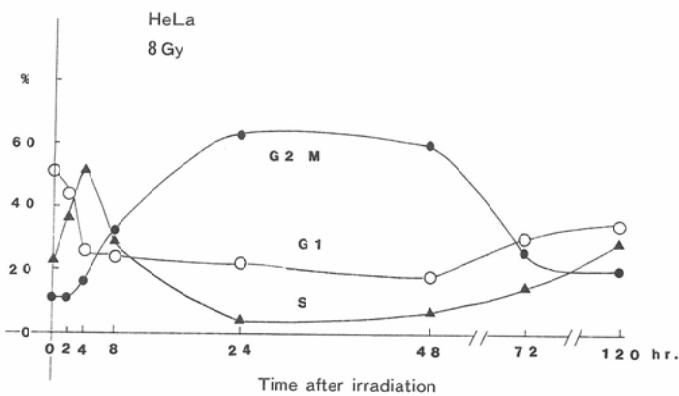


Fig. 5 serial changes in G1, S, and G₂+M cell fractions of HeLa cells after irradiation at 8 Gy.

酸処理後の洗浄等で FITC, PI の蛍光量が異なる。強い酸処理では、PI の蛍光量を低下させる。弱い酸処理では DNA が 1 重鎖になりにくく抗 BrdU モノクローナル抗体との結合が不十分で抗

BrdU-FITC の染色性は低下する。また、酸処理後の洗浄、中和が不十分な時は低 pH による抗原抗体反応の低下のため FITC 蛍光量は低下する。この DNA 変成処理には酸処理のほか 50% For-

maide (PBS) 80°C, 30分加温, また, 100°Cの湯に入れるだけでよい等の報告もある⁸⁾. このDNA変成処理には細胞毎で微妙に異なるのでその至適な条件は細胞毎に検討する必要がある. 測光上の注意としてPIは強い蛍光を出し, 530nmまでにもスペクトル領域を持ち FITCと相互かぶりを起こすために, PIは低濃度染色を行い530nm領域を補正する必要がある.

従来より放射線照射後の細胞動態の解析には³H サイミジンを用いた Autoradiography の研究で数多く報告されている¹¹⁾. 山田らは³H サイミジン標識核の頻度から G₁期から S 期への移行には変化がないが³H サイミジン標識分裂像の出現頻度の推移から G₂期の遅延であると報告している¹²⁾. Whimore らは照射後の変化として, 分裂細胞の見られない状態でも DNA は合成され続けること, 細胞分裂の無い状態(巨細胞の形成)でも DNA や RNA は一定の割合で合成されるが, 著明な G₂ block の起こることを報告している¹³⁾.

同様に, 岡田らは照射後 DNA の合成の割合は多少低下するが, 分裂遅延の見られる間も G₁期から S 期, S 期から G₂期への移行の割合はあまり影響されないこと等が報告されている¹⁴⁾. また寺島らも HeLa 細胞や L 細胞では著しい G₁ block の現象を見いだす事は出来なかつたと報告している¹⁵⁾. しかし我々のこの BrdU-PI の二重染色法の解析では8Gy 照射後の細胞動態の変化は照射直後 2 時間以内に, 急速な G₁期から S 期への移行と G₁ Block の現象が明確された. 以前より, ³H サイミジンの Autoradiography での放射線による細胞動態の解析では G₁ Block に関して一部再生肝や骨髄細胞等で報告されているが¹⁶⁾, Autoradiography でこの現象を観測することは困難と考える.

なぜなら Autoradiography では特に標識細胞と非標識細胞との区別を行うためのしきい値の決定が主観的となり, 正確な G₁, S, G₂期の区別ができるにくいので, HeLa 細胞でも G₁期から S 期の急速な移行の識別, および G₁ Block を見いだすことは困難であると考える. この BrdU による細胞動態の解析は, 従来の autoradiography や

DNA 量ヒストグラムの解析に比べて G₁-S 境界, S-G₂期境界を明瞭に区別出来るために上記の現象を観測し得たと考える. 我々が観察した照射直後の G₁期から S 期への Rapid Transition の現象の機序については不明である. しかし, これは G₁ 細胞ではなく early S 期細胞で放射線刺激によって急速な DNA 合成が起こった結果, 見かけ上, G₁期から S 期の Rapid Tradition として観察されたと考えられる. 今後同調培養法等を用いてより詳しい解析が必要である.

本法は Autoradiography に比べて短時間に結果が得られ, Radioisotope を使用しないために場所等に制限を受けない利点も多い. Doleare らは⁸⁾¹⁹⁾この抗 BrdU モノクローナル抗体の検出感度が非常に高いことを報告している. 既に星野らは脳腫瘍の成長解析にこの方法での検出の可能性を検討し, 臨床的にも使用可能なことを報告している¹⁷⁾¹⁸⁾. この BrdU は癌放射線治療時の放射線増感剤(ラジバト)としてすでに臨床応用可能な薬剤である. 人腫瘍の場合, 病理組織診断上, 細胞の異形成や分裂像の多少が腫瘍の悪性度と相關しないことが多い. 本法による腫瘍組織中の S 期細胞の割合, また, 放射線, 制癌剤照射後に起る細胞動態の変化はその腫瘍の悪性度, 感受性を示す指標となりうることをうかがわせる. 将来, 本法は人腫瘍の細胞動態の解析には必要不可欠なものとなるであろうし, 腫瘍学, 治療面でも役立つものと考える.

結 語

① 放射線照射後の細胞動態をこの BrdU 法で解析すると照射直後 2 時間以内に, 急速な G₁-S への移行が見られ, その後 G₁ Block が起こる. S 期細胞はそのまま G₂+M 期に移行し G₂ Block が起こる. この BrdU-PI の二重染色で放射線による初期の G₁ Block の現象が確認された.

② 従来の DNA ヒストグラムからの Cell Cycle の解析では G₁期と early S 期細胞, late S 期細胞と G₂期細胞の DNA 量が重なり, 正確な S 期細胞の分画を算出するのは困難であった. この BrdU-PI 二重染色法は直接 G₁, S, G₂+M 期細胞を区別でき, 特に G₁-S, S-G₂+M, 境界を明瞭に識別で

きた。

この研究は昭和62年度文部省科学研究費がん特別研究（課題番号62010016鈴木班）の援助により遂行された。

文 献

- 1) Dean PN, Jett JH: Mathematical analysis of DNA distribution derived from flow microfluorometry. *J Cell Biol* 60: 523-527, 1974
- 2) Dean PN, Grey JW, Dolbeare FK: The analysis and interpretation of DNA distribution measured by flow cytometry. *Cytometry* 3: 188-195, 1982
- 3) Takahashi M: A multichannel method for the analysis of DNA content distribution using flow cytometric date. *Computer Biom Research* 14: 506-517, 1981
- 4) Frieds J: Analysis of deoxyribonucleic acid histgram from flow cytometry estimation of the distribution of cells within S phase. *J Histochem Cytochem* 25: 972-951, 1977
- 5) Frieds J, Perez AG, Clarkson BD: Flow cytometric analysis of cell cycle distribution using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the date. *J Cell Biology* 71: 172-181, 1976
- 6) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replications. *Science* 218: 477-476, 1982
- 7) Dolbeare F, Beisker W, Palavicini MG, et al: Cytochemistry for BrdUrd/DNA analysis: Stoichiometry and sensitivity. *Cytometry* 6: 521-530, 1985
- 8) Dolbeare F, Gratzner H, Paravicini MG, et al: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci* 80: 5573-5577, 1983
- 9) Hoshino T, Nagashima T, Murovic J, et al: Cell kinetic studies of in situ human brain tumors with bromodeoxyuridin. *Cytometry* 6: 627-632, 1985
- 10) Pallavicini MG, Lalande ME, Miller RG, et al: Cell cycle distribution of chronically hypoxic cells and determination of the clonogenic potential of cells accumulated in G2+M phases after irradiation of a solid tumor in vivo. *Cancer Res* 39: 1891-1897, 1979
- 11) 土井田幸郎: 放射線による細胞分裂の障害 (2). 放射線細胞生物学. 朝倉書店, 199-215, 1968
- 12) 山田正篤: 哺乳動物細胞の増殖 Cycle に及ぼすレ線の影響, 遺伝学雑誌, 37: 376-377, 1962
- 13) Whitmore FF, Stanners CP, Till JE, et al: Nucleic acid synthesis and the division cycle in X-irradiated L-strain mouse cells. *Biochim Biophys Acta* 47: 66-77, 1961
- 14) Watanabe I, Okada S: Study of mechanisms of radiation-induced reproductive death of mammalian cells in culture: Estimation of stage at cell death and biological description of processes leading to cell death. *Radiation Res* 27: 290-306, 1966
- 15) 寺島東洋三: 細胞の増殖周期と放射線感受性, 放射線細胞生物学, 216-229, 1968
- 16) Lajtha LG, Oliver R, Kumatori T, et al: On the mechanism of radiation effect on DNA synthesis. *Radiation Res* 8: 1-16, 1958
- 17) Nagahsima T, Hoshino T: Rapid detection of S-phase cells by antibromodeoxyuridine monoclonal antibody in 9L brain tumor cells in vitro and in situ. *Acta Neuropathol* 66: 12-17, 1985
- 18) 長島 正, 晃野孝夫: 脳腫瘍成長解析のあゆみと展望—特に抗 Bromouridine 単一クローニング抗体による迅速解析法について—, *Neurological Surgery*, 12: 1007-1018, 1984
- 19) 高橋 学, 佐々木功典, 村上知之: Bromo-Deoxyuridine 標識による細胞動物の解析, 最近医学, 40: 80-84, 1985