

## Bromodeoxyuridine (BrdU) / 抗Bromodeoxyuridine抗体を用いた リンパ球芽球化試験の検討

小河原はつ江, 金谷 尚美, 高橋美紀子, 阿久澤由紀,  
倉茂 達徳, 土屋 純  
群馬大学医療技術短期大学部  
(1991年9月27日 受理)

## Lymphocyte Blastogenesis Using the Bromodeoxyuridine / Antibromodeoxyuridine Method in Cell Smears

Hatsue OGAWARA, Naomi KANAYA, Mikiko TAKAHASHI, Yuki AKUZAWA,  
Satonori KURASHIGE and Jun TSUCHIYA  
*College of Medical Care and Technology, Gunma University,  
Maebashi, Gunma 371, Japan*

Key Words : Lymphocyte blastogenesis, Monoclonal antibody, Bromodeoxyuridine (BrdU)

SUMMARY: Immunocytochemical measurements of lymphocyte blastogenesis in cell smears with antibromodeoxyuridine monoclonal antibodies were investigated. In this method, neither radioisotopes nor special apparatus except for a CO<sub>2</sub>-incubator are necessary, and accurate values can be obtained without difficulty. Additionally, these values correlate closely with the results obtained by the tritiated thymidine method. Therefore, it was suggested that this method is clinically useful as a screening test for lymphocyte blastogenesis.

### 目 的

リンパ球芽球化試験には<sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>H-TdR) uptake法<sup>1)</sup>, 核酸-蛍光プローブを用いる方法<sup>2,3)</sup>, フローサイトメトリーによるbromodeoxyuridine (BrdU) / 抗BrdU抗体法<sup>4,5)</sup>などが知られているが, 特殊な施設や設備を必要とするのが難点であった. そこで我々はthymidineと類似した構造を持つため, S期の細胞に取り込ませることのできるBrdUをPHA刺激後のリンパ球に作用させ, BrdU / 抗BrdU抗体法により染色し, 芽球化率を判定する方法を検討したの

で, その結果を報告する.

### 方法および対象

健常者として群馬大学医療技術短期大学部学生および職員15名, 群馬大学医学部第二外科入院中の担癌患者3例, 日高病院を訪れた慢性透析患者18例, 計36例について検討した.

へパリン加血液より無菌的に末梢リンパ球をFicoll-Conray液 (LSM, Organon Teknika Co., Durham, NC) で分離後, RPMI1640メディウム (Whittaker Bioproducts, Inc., Maryland) で2回洗浄し, 10%ウシ胎児血清RPMI1640メディウ

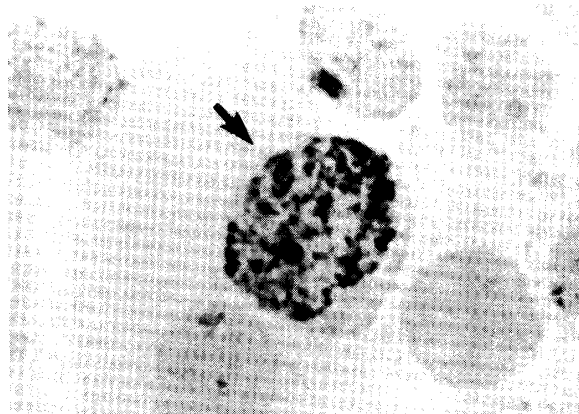
ムに $1 \times 10^6$ /mlの細胞濃度で浮遊し、PHA-P (Sigma社L-8754, St. Louis, MO) を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう添加して、 $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  incubatorで72時間培養した。これらの培養細胞について、 $^3\text{H-TdR}$  uptake法とBrdU/抗BrdU抗体法で芽球化率を測定した。

①  $^3\text{H-TdR}$  uptake法<sup>6)</sup>： 培養終了4時間前に、 $0.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の終濃度で、 $^3\text{H-TdR}$  (New England Nuclear Co., Boston) を添加し、更に4時間培養後リンパ球を回収し、リンパ球内の $^3\text{H-TdR}$ の取りこみ量を液体シンチレーションカウンターで測定した。測定値は放射活性 (PHA刺激時放射活性 - 非刺激放射活性) と刺激指数 (刺激後カウント値 / 非刺激カウント値) とで評価した。

② BrdU/抗BrdU抗体法： 北村らの方法<sup>7)</sup>を用いた。培養終了1時間前に終濃度 $10 \mu\text{mol}/\text{l}$ になるようBrdU (Sigma社B-5002, St. Louis, MO) を培養瓶に加え、1時間培養後、細胞をpH 7.4 PBSで2回洗浄し、沈渣に3%ウシ血清アルブミン-PBS (BSA-PBS) を加えて塗沫標本を作成した。十分に乾燥後、冷70%エタノールで30分間固定し、乾燥、保存した。次に、PBSに10分間浸した後、0.3% $\text{H}_2\text{O}_2$ メタノールに30分間放置して内因性ペルオキシダーゼを破壊。PBS洗浄後、 $0.07 \text{mol}/\text{l}$  NaOHで2分間アルカリ処理し、 $0.1 \text{mol}/\text{l}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ で2分間中性化した。PBS洗浄後、BSA-PBSで20倍希釈した抗BrdU monoclonal抗体 (IMMUNOTECH S. A., Marseille Cedex France) と室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、ビオチン化抗マウスIgGで1時間反応させた。PBS洗浄後、ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase Complex) 試薬 (Vector Lab. Inc., Burlingame, CA) を、室温で30分間反応させた。ペルオキシダーゼ染色はジアミノベンチジンを基質として10分間染色し、マイヤーのヘマトキシリンで10~15分間核染色をした。図1の如く、核が強く茶褐色

色に染まった細胞をBrdU標識細胞とし、全細胞500個中に占めるBrdU標識細胞の割合をBrdU標識率とした。

図1 BrdU/抗BrdU抗体法染色像

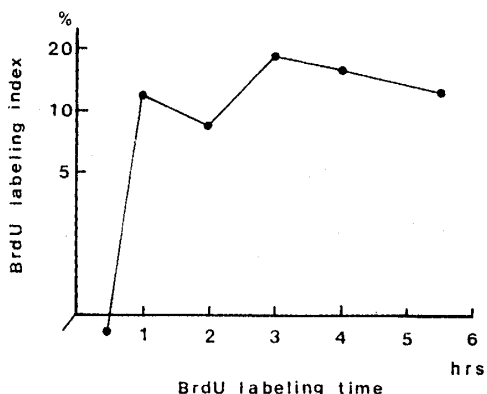


(矢印：BrdU標識細胞)

## 結果

- ① 固定液の検討： 冷70%エタノールと緩衝ホルマリン・アセトン混液 (BFA) について比較検討したところ、冷70%エタノールではBrdU標識細胞を染色することができたが、BFA固定では染色できなかった。
- ② 内因性ペルオキシダーゼ処理条件について： 0.3% $\text{H}_2\text{O}_2$ メタノールと0.5%過ヨウ素酸について同一症例の標本で比較検討したところ、BrdU標識率は0.3% $\text{H}_2\text{O}_2$ メタノールでは23%、0.5%過ヨウ素酸では7%となった。
- ③ BrdU標識時間について： 同一試料で、培養細胞にBrdUを取りこませる時間を30分間から5時間30分まで変化させて検討したところ、30分間ではBrdU取込みを確認できなかったが、1時間から5時間30分までは8.5~12.5%の範囲で標識率に変動がみられたものの、1時間値と5時間30分後の値に有意の差は認められなかった。(図2)
- ④ BrdU/抗BrdU抗体法と $^3\text{H-TdR}$  uptake法との関係： 健常者9例と担癌患者3例を対象としてBrdU/抗BrdU抗体法における

図2 BrdU標識時間とBrdU標識率の関係



BrdU標識率と<sup>3</sup>H-TdR放射活性との関係を図3に示した。両者間には相関係数 (R) = 0.8007,  $Y=251.9X+414.1$  ( $P<0.01$ ) の関係が成立した。図4には、BrdU/抗BrdU抗体法と<sup>3</sup>H-TdR uptake法によるPHA刺激と無刺激の放射活性比率、即ち刺激指数との関係を示した。両者間では $R=0.6504$ ,  $Y=0.79X+3.60$  ( $P<0.05$ ) の関係が成立した。

⑤ 各疾患群におけるリンパ球芽球化試験の成績： BrdU/抗BrdU抗体法と<sup>3</sup>H-TdR uptake法による成績を健常者15例、担癌患者3例および慢性透析患者18例について比較し、図5に示した。それぞれの平均値±SDは、 $17.6\pm 10.3\%$   $4781\pm 2868$ dpm,  $3.33\pm 1.99\%$ ,  $1276\pm 777$ dpm,  $6.5\pm 3.1\%$ ,  $1798\pm$

図3 BrdU標識率と<sup>3</sup>H-TdR放射活性の関係

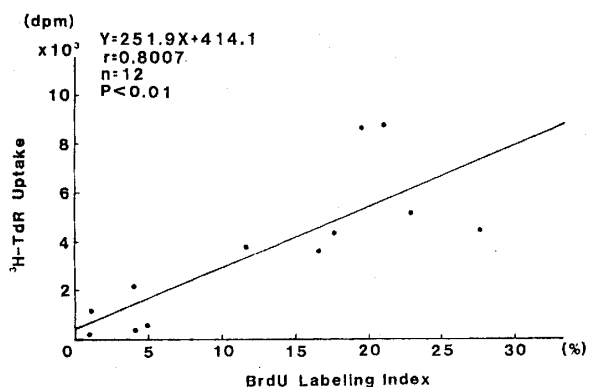


図4 BrdU標識率と刺激指数の関係

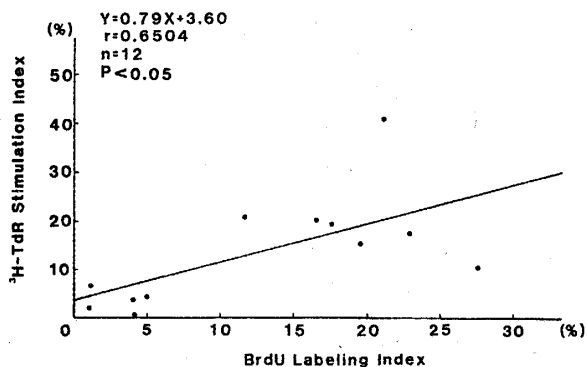
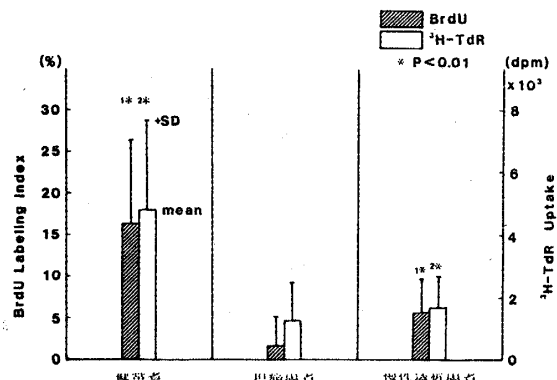


図5 慢性透析患者および担癌患者におけるBrdU標識率



884dpmとなった。健常者と慢性透析患者の間には $P<0.01$ で、有意差が得られた。担癌患者は症例数が少ないため、統計学的に有意差は得られなかった。

## 考 察

BrdU/抗BrdU抗体法をリンパ球芽球化試験に応用するにあたり、若干の基礎的検討を行った。まず、固定液について検討したところ、緩衝ホルマリン・アセトン混液は、細胞表面抗原の保存と形態の保存には良い<sup>8)</sup>とされているが、BrdU/抗BrdU抗体法では核内DNAがアルカリ処理により露出する必要があり、組織収縮力の強いホルマリンを含む固定液では、2分間のアルカリ処理で抗原であるDNAが露出した

い可能性が考えられる。従って、固定には冷70%エタノールの方が適していることがわかった。

ABC法で染色する場合、内在するペルオキシダーゼ (POD) を破壊する必要がある。内因性POD破壊の検討では0.3% $H_2O_2$ メタノールの方が0.5%過ヨウ素酸処理より標識率が高いことがわかった。0.5%過ヨウ素酸は処理の時間が短く、形態の保存性も良く、細胞の観察に優れていたが、結果に示した如く、BrdU標識率において低下傾向がみられた。その後の検討でアルカリ処理時間を30秒ほど延長すると標識率が0.3% $H_2O_2$ メタノールでの測定値に近付くことがわかった。試薬が酸性のためアルカリ処理が十分効果を示さなかったと思われた。0.3% $H_2O_2$ メタノールの $H_2O_2$ 濃度については小林ら<sup>9)</sup>の検討成績を参考にした。

培養細胞に対するBrdUの作用時間を決めるための検討を行った。30分間では不十分であったが、1時間以後は5時間30分まで大きな変化を認めなかったため、以後の検討はBrdUを培養終了1時間前に添加して標識することとした。

次に、BrdU/抗BrdU抗体法の有用性について検討を行ったところ、本法は $^3H$ -TdR uptake法の成績と良い相関性が得られた。 $^3H$ -TdR uptake法では放射活性の程度で示す場合と刺激指数で表す場合とがあるが、いずれとも相関し、特に放射活性 (dpm) で表わされた値と良く相関し、臨床的にも有用であることがわかった。しかし、健常者において芽球化率が72時間培養では低値であったものが、96時間培養で上昇した例がみられたり、固定後長時間 (2週間以上) 保存した標本では、染色性が著しく低下する例などもみられた。培養時間については今回は72時間で実施したが、96時間、120時間と時間をかえて検討する必要がある。しかし、スクリーニングの目的で行うのであれば、本法のように72時間でも十分評価できるものと思わ

れる。

本法は72時間培養後のBrdU標識率をもって幼若化能を評価するわけであるが、健常者の正常値は $17.6 \pm 10.3\%$ と、従来の形態学的に判定する方法(60~90%)<sup>10)</sup>に比較して明らかな低値を示した。一方、Yoffeyら<sup>11)</sup>はオートラジオグラフィにより72時間後の $^3H$ -TdRの取込み細胞比率を $28.3 \pm 1.9\%$  (健常者8名)と報告している。武内ら<sup>4)</sup>はBrdU標本率が96時間培養で最高27~28% (健常者2名)の値を示したという。当然のことながらS期の細胞の増加を幼若化の指標としているYoffeyらや竹内らの成績に近い結果が得られた。さらに、リンパ球機能低下を起こしやすい担癌患者や慢性透析患者<sup>12)</sup>では低値を示し、後者と健常者との間に有意の差が認められたことは、リンパ球幼若化能の低下を充分反映していると思われた。

近年、リンパ球の表面形質をもとにリンパ球subsetを分画することが普及し、やや煩雑なリンパ球芽球化試験は研究的に行われる傾向にある。リンパ球反応能を測定する芽球化試験とリンパ球subset比率とでは自ずから意義が異なるので、アイソトープを使わないのでできる本法の有用性は大きいと考える。

## 結 語

BrdU/抗BrdU抗体法による塗沫標本でのリンパ球芽球化試験の検討結果を報告した。本法はアイソトープの使用が避けられる上、 $CO_2$ インキュベーター以外は特殊な機械、設備を必要としないので、比較的容易に測定できるのが特徴的である。 $^3H$ -TdR uptake法との相関関係も良好で、臨床的にも有用であることがわかった。

(本文は第39回日本臨床衛生検査学会で発表したものをまとめた。)

## 謝 辞

検体の提供にご協力を賜りました日高病院安藤義孝院長，群馬大学医学部付属病院第2外科病室の皆様へ感謝申し上げます。

## 参考文献

1. 小林茂人，平野隆雄：免疫学的臨床検査—結果の解釈とその理論—リンパ球，臨床免疫 18：604-615, 1986.
2. 原 昭典，浜井潤二，佐藤三郎，横山三男：Flow cytometryを応用したリンパ球の幼若化機能検査法，臨床病理 36：710-714, 1988.
3. 橋本淑美，本田 盈，尾崎重忠，高橋恒夫，池田久實，関口定美：蛍光自動測定装置によるリンパ球幼若化反応の迅速測定法，臨床検査 33：582-586, 1989.
4. 武内信一，塩田洋子，高梨 茂：BrdUモノクローナル抗体法によるリンパ球幼若化試験の検討，衛生検査 36：1639-1642, 1987.
5. Gratzner HG：Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine：a new reagent for detection of DNA replication, Science 218：474-475, 1982.
6. 倉茂達徳，阿久沢由紀，吉田 智，安藤義孝：透析患者の血清IAP濃度とそのリンパ球反応抑制能および患者リンパ球反応との相関，医学のあゆみ 139：417-418, 1986.
7. 北川 博，金田次弘：Labelling Index検討のためのBrdU，検査と技術 16：1374-1375, 1988.
8. 山田和順：組織化学初学者のための基礎と実際，p. 406-431，南江堂，1988.
9. 小林和美，大竹茂樹，中西 二，伊藤恵子，岡藤和博，吉田 喬，中村 忍，松田 保：免疫細胞化学法による血液塗沫乾燥標本における細胞表面抗原の検索，臨床病理 34：699-704, 1986.
10. 巽 典之：新版正常値ハンドブック，p. 130，財団法人化学及血清療法研究所，1983.
11. Yoffey, J. M. Winter, C. B. Osmond, D. G. Meek, E. S.：Morphology studies in the culture of human leukocytes with phytohaemagglutinin, Brit. J. Haemat. 11：488-497, 1965.
12. 倉茂達徳，阿久沢由紀：慢性血液透析患者における血清の免疫抑制活性とリンパ球のサプレッサー細胞活性，医学と生物学 114：19-21, 1987.