

## 第4章 カラー画像解析装置を用いた顕微測光法による 培養細胞のDNAヒストグラムの解析

### 第1節 目的

今回開発した画像解析装置を用いた核DNA量の測定法のCV値は5%前後であり、DNAヒストグラムパターンの変化の検出が可能と考えられる。そこで、まず、1) 通常の培養条件下の培養細胞の核DNA量を測定し、DNAヒストグラムを作製して、一般にDNAヒストグラムの解析に用いられているフローサイトメトリー(FCM)の結果と比較した。次に、2) S期同調培養時のDNAヒストグラムパターンの変化、3) 血清濃度を下げた時のDNAヒストグラムと増殖曲線の変化について本法を用いて検討した。3) については、画像解析法で得られるDNAヒストグラムパターンの変化が妥当なものかを検討するために、FCMで同じ試料を測定した。

### 第2節 材料と方法

#### 2-1. 通常培養条件下の培養細胞のDNAヒストグラムパターンの分析

##### 2-1-1) 画像解析用の標本の作製

ヒト肺腺癌由来のTKB-6, ヒト肺大細胞癌由来のTKB-3を用いた。細胞を通常の培養条件下(培地として、Dulbecco's modified minimum essential medium (MEM) + 10% fetal calf serum (FCS))で、滅菌したスライドガラスを底置した培養シャーレ内で培養。細胞密度が適当になったところで、スライドガラスを取り出し、軽くすすいだ後、メタノール-ホルマリン-酢酸(容積比85:10:5)から成る固定液を用いて、室温で1時間固定した。

以下の手順でフォイルゲン染色を行い、核DNA量測定用の標本とした。

- (1) 固定液を洗い流すために、蒸留水で洗浄。
- (2) 4 N塩酸で加水分解。(30℃, 最長30分間)
- (3) 0.1 N塩酸に5分間浸漬。(室温)
- (4) シッフ試薬(Sigma, USA)でフォイルゲン染色。(室温, 遮光, 90分間)
- (5) 亜硫酸水を通す。(5分間×3回)
- (6) 流水水洗。(10分間)
- (7) アルコール, キシレンの脱水系列を通した後,  
Eukitt (O.Kinder, Germany) で封入。

#### 2-1-2) フローサイトメトリー (FCM) 用の標本の作製

上記と同じ条件で培養し, 0.25%トリプシン-0.02%EDTA-CMF・PBSで細胞を培養シャーレから剥し, 遠心後, 5%FCS-PBSに浮遊。この細胞浮遊液を70%冷エタノール(-20℃)で固定。以下の手順で染色を行い, フローサイトメトリー用の標本とした。

- (1) 固定後の標本を遠心後, 上清を捨て, PBSで洗浄 → 遠心 → PBSに再浮遊を2回。
- (2) 核の破壊産物・RNAを除去するため, RNaseのPBS溶液(1mg/ml)を細胞10<sup>6</sup>個あたり0.2mlを加え, 37℃で20分間処理。
- (3) PBSで2回洗浄。
- (4) 遠心後, 上清を捨て, ヨウ化プロピジウム(Propidium iodide, PI, 10μg/ml)-PBS溶液10mlに細胞を浮遊させ, 4℃で30分間染色。  
(遮光)
- (5) 塵をとるために70メッシュで濾過後, 冷暗所で計測時まで保存。
- (6) 計測時, 適当な濃度(10<sup>6</sup>/mlくらい)にPBSで希釈。

#### 2-1-3) 核DNA量の測定

##### a) 画像解析法

それぞれのスライド標本につき，500個以上の細胞の核DNA量を測定し，G1/OピークのDNA量の5%を階級幅としてDNAヒストグラムを作製した。

#### b) FCM

FACScan (Becton Dickinson, USA) を用いて20,000核のDNA量の計測・解析を行った。

### 2-2. S期同調培養時のDNAヒストグラムパターンの分析

#### 2-2-1) S期同調培養

ヒト甲状腺未分化癌より樹立した培養株TTA-1を用いた。

S期同調培養としては，過剰のチミジン，ヒドロキシウレアによる2段階のS期同調培養法を用いた。この方法は以下の機序に基づいている(39,40)。

DNA合成の前駆体となるチミジンは，細胞に過剰(mMオーダー)に与えられるとdTTPの蓄積を起こし，リボヌクレオシドニリン酸還元酵素(ribonucleoside diphosphate reductase)に対するアロステリック制御を攪乱することによってdCTPプールの減少，ひいてはDNA合成の停止をもたらす。S期以外の細胞は，細胞周期を進行しS期の直前に蓄積する(41)。

そこでチミジンを洗い去るかあるいはデオキシチミジンを加えると，細胞はDNA合成を再開しS期からG2期へと進行する。過剰チミジン処理を開始した時に，S期にあった細胞はそれ以外の集団より先行して細胞周期をまわるため，これだけでは同調は不完全である。そこで細胞集団の先頭が次のS期に入る前，最後尾がS期を完了した時に2回目のDNA合成阻害剤処理を行う。

過剰チミジン処理は他のDNA前駆体合成阻害剤に比べて毒性が低く，二重処理法に適しているが，過剰チミジンを除去しても細胞内のdTTPプールが高くなっているため，<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みでDNA合成を調べる場合，最初のうちは実際の合成量より低値にみられるという欠点がある。そのため2回目のDNA合成阻害には通

常ヒドロキシウレアを用いる。ヒドロキシウレアは $XDP \rightarrow dXDP$ の反応を触媒するリボヌクレオシドニリン酸還元酵素のもつフリーラジカルを消去することにより、酵素活性を阻害するが、これも洗い去ることによって可逆的にDNA合成を再開する(42)。

具体的には以下の条件で培養を行った。

- (1) 培養細胞を滅菌したスライドガラスを底置した培養シャーレ内で48時間培養。(通常の培養条件下、培地は Dulbecco's modified MEM + 10% FCS を用いた。)
- (2) チミジンを最終濃度2.5 mMになるように加え、30時間培養。
- (3) 培地を捨て、PBSで2回すすいだ後、新しい培地を加え、18時間培養。
- (4) ヒドロキシウレアを最終濃度1 mMになるように加え、15時間培養。
- (5) 培地を捨て、PBSで2回すすいだ後、新しい培地を加え、培養を継続。

#### 2-2-2) 固定・フォイルゲン染色

(2) ~ (5) の処理の直前、および処理(5)の15時間、30時間後にスライドガラスを取り出し、軽くすすいだ後、メタノール-ホルマリン-酢酸液(前述)を用いて、室温で1時間固定。

固定後、前項と同様の手順でフォイルゲン染色を行い、核DNA量測定用の標本とした。

#### 2-2-3) 画像解析法による核DNA量の計測

画像解析法を用いて、それぞれのスライド標本につき、500個以上の細胞の核DNA量を測定し、G1/OピークのDNA量の5%を階級幅としてDNAヒストグラムを作製した。

#### 2-3. 血清濃度を下げた時のDNAヒストグラムと増殖曲線の分析

### 2-3-1) 培養条件および画像解析用標本の作製

ヒト甲状腺未分化癌より樹立した培養株 T T A-1 を用いた。

Dulbecco's modified MEM に F C S を最終濃度 10 % , 3 % となるように加えた培地を用いた。この培地を用いて、滅菌したスライドガラスを底置した培養シャーレ内で T T A-1 を培養し、48 時間後にスライドガラスを取り出し、前述と同じ手順で固定、フォイルゲン染色を行い、画像解析用の標本とした。

### 2-3-2) フローサイトメトリー ( F C M ) 用の標本の作製

前項目と同じ条件で培養し、48 時間後に 0.25 % トリプシン-0.02 % E D T A-C M F · P B S で細胞を培養シャーレから剥し、遠心後、5 % F C S · P B S に浮遊。この細胞浮遊液を 70 % 冷エタノール ( - 20 ° C ) で固定。本章、2-1 ( 36 頁 ) と同様の手順で染色を行い、フローサイトメトリー用の標本とした。

### 2-3-3) 核 D N A 量の測定

#### a) 画像解析法

500 個以上の細胞の核 D N A 量を測定し、G1/Oピークの D N A 量の 5 % を階級幅として D N A ヒストグラムを作製した。

#### b) F C M

F A C S c a n ( Becton Dickinson, USA ) を用いて 20,000 核の D N A 量の計測・解析を行った。

### 2-3-4) 倍加時間 ( doubling time )

血清濃度が細胞の増殖に及ぼす影響の指標として、細胞計数法により倍加時間を求めた。

### 2-3-5) Labelling Index ( L.I. ), Mitotic Index ( M.I. ) の測定

細胞の増殖能の指標として、Labelling Index (L.I.)、Mitotic Index (M.I.) の測定を行った。

a) Labelling Index (L.I.)の測定

T T A-1 を2-1)と同じ条件で、滅菌したスライドガラスを底置した培養シャーレ内で培養し、48時間後に bromodeoxyuridine (BrdU) を最終濃度  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加。30分後にスライドガラスを取り出し、軽く洗浄後、メタノール-ホルマリン-酢酸液(容積比85:10:5)で、室温1時間固定。

以下の手順でBrdUの免疫染色を行った。

- (1) 軽く洗浄後、4N塩酸にて加水分解。(室温, 30分間)
- (2) Palitisch 緩衝液(ホウ酸-塩化ナトリウム-ホウ砂緩衝液, pH9.0)に5分間浸漬。
- (3) リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)で洗浄。(5分間×3回)
- (4) 0.2%ウシアルブミン-PBSによる非特異反応のブロック。(室温, 30分間)
- (5) 正常ウマ血清による非特異反応のブロック。(室温, 30分間)
- (6) マウス抗BrdUモノクローナル抗体(Beckton-Dickinson, USA)の反応。(室温, 60分間)
- (7) PBSで洗浄。(5分間×3回)
- (8) ビオチン化ウマ抗マウス抗体(Vector)と反応。(室温, 30分間)
- (9) PBSで洗浄。(5分間×3回)
- (10) ABC試薬(Avidin-Biotin peroxidase complex; Vector)と反応。(室温, 30分間)
- (11) PBSで洗浄。(5分間×3回)
- (12) 基質としてDAB(四塩酸ジアミノベンジジン)試薬を用いて発色。  
適当な発色が得られたら、水道水で反応を停止。
- (13) ヘマトキシリンで後染色。
- (14) アルコール, キシレンの脱水系列を通した後, 封入。

カラー画像解析装置を用いて、1,000 個の核のうち免疫染色陽性の核の個数を計測し、Labelling Index を算出した。

#### b) Mitotic Index (M.I.)の測定

画像解析法による核DNA量の測定中にM期の細胞数を数え、Mitotic Index を算出した。

### 第3節 結果

#### 3-1) DNAヒストグラムパターンの分析

画像解析法とFCMで測定したTKB-3, 6のDNAヒストグラムを Fig.4-1 に示す。

画像解析法によるヒストグラム (Fig.4-1, a) とFCMによるそれ (同, b) を比べてみると、TKB-3ではG2/Mピークが画像解析法によるデータでは低く、むしろS期中・後期の割合が高くなっているが、全体としては両者のヒストグラムは細胞ごとにそれぞれ似たパターンを示した。

#### 3-2) 同調培養時のDNAヒストグラムパターンの推移

同調処理各段階の培養細胞のDNAヒストグラムの推移を Fig.4-2 に示す。

それぞれの処理段階でDNAヒストグラムのパターンは明らかに異なる。

(a) 同調処理前のDNAヒストグラムでは、G1/O期とG2/M期に相当する2つのピークが認められる。

(b) 過剰チミジンの処理後には、なだらかなピークが1つ認められ、細胞がS期初期を中心にして集積していることが推定される。

(c) ヒドロキシウレア添加前のヒストグラムでは、G1/Oピークが処理前に比べ

てより急峻になっている。

(d) ヒドロキシウレア処理直後には、1つのピークがほとんど全ての細胞により形成されている。

(e) ヒドロキシウレア処理終了15時間後には、ピークがややなだらかになりながらもそのままS-G2/Mへ移行している。

(f) 処理終了30時間後には、もはや同調されていない。

### 3-3) 血清濃度を下げた時のDNAヒストグラムと増殖曲線の変化

血清濃度3, 10%の時のTTA-1のDNAヒストグラムを Fig.4-3 に示す。

画像解析法により得られたDNAヒストグラム (Fig.4-3, a) では、血清濃度10%の時はG1/OとG2/Mの2つのピークが見られるが、血清濃度3%の時はG2/Mのピークがはっきりしない。FCMで得られたDNAヒストグラム (同, b) では、血清濃度3%の時にもG1/OとG2/Mの2つのピークが見られるが、血清濃度10%の時のS期及びG2/M期の占める割合、各々26.4%, 20.0%が血清濃度3%の時にはそれぞれ8.7%, 18.3%に減少している。

血清濃度3%, 10%の時の増殖曲線を Fig.4-4 に示す。血清濃度3%, 10%の時の倍加時間はそれぞれ39時間, 25時間であった。

L.I., M.I.の測定結果を表4-1 に示す。血清濃度10%の時のL.I., M.I. はそれぞれ37.5%, 3.86%, 血清濃度3%の時のL.I., M.I. はそれぞれ27.0%, 1.45%で、血清濃度3%の時のL.I., M.I. は10%の時に比べて有意に低かった。

表 4-1 血清濃度3%, 10%下でTTA-1培養時のL.I.とM.I.

	Labelling Index	Mitotic Index
FCS 10%	37.5 % (226/602)*	3.86 % (23/596)**
FCS 3%	27.0 % (167/618)*	1.45 % ( 9/620)**

(\*,\*\* p<0.05)



#### 第4節 考 察

画像解析法とFCMで測定したDNAヒストグラムの比較では、全体としては両者のヒストグラムは細胞ごとにそれぞれ似たパターンを示しているが、TKB-3ではG2/Mピークが画像解析法によるデータでは低く、むしろS期中・後期の割合が高く測定された。

S期同調培養法においては各処理段階に応じたDNAヒストグラムのパターンの変化が認められた。

画像解析法により得られた血清濃度10%の時のDNAヒストグラムではG1/OとG2/Mの2つのピークが見られるが、血清濃度3%の時はG2/Mのピークがはっきりしない。FCMで得られたDNAヒストグラムでは、血清濃度3%の時にもG1/OとG2/Mの2つのピークが見られるが、血清濃度10%の時のS期、G2/M期の占める割合、各々26.4%、20.0%が血清濃度3%の時にはそれぞれ8.7%、18.3%に減少している。これらのDNAヒストグラム上の変化は、血清濃度3%、10%の時の倍加時間はそれぞれ39時間、25時間であることや、Mitotic Index・Labelling Indexに有意な差があることから、細胞の増殖能の変化を反映しているものと考えられる。

以上の如く、血清濃度3%の時の画像解析法により得られたDNAヒストグラムでは、G2/Mのピークがはっきりしないが、FCMにより得られたDNAヒストグラムでは、G1/OとG2/Mの2つのピークがはっきり認められる。画像解析法で得られるDNAヒストグラムは、FCMによるDNAヒストグラムと必ずしも相同ではない。この理由としては、1)本法の%CVがFCMより大きい、すなわち、測定精度がやや劣ること、2)1つの標本についての測定数がFCMの10~100分の1程度であること、3)今回の測定では、FCMでは酵素処理により細胞浮遊液とし、さらにRNase処理を施したものを測定対象としたが、画像解析法ではスライドガラス上に接着して増殖している細胞を特に処理せずに用いたため、スライドガラス上の測定する場所により細胞の増殖態度に差がある可能性があること、などが考えられる。

特に、標本処理の違い 3) は測定精度とは関係なくCV値の増大を招くことが考えられ、1)と3)の両者がヒストグラム上の差の主な原因と考えられる。今後、さまざまな標本をFCMと比較しながら測定し、検討する必要がある。

しかし、上述の2), 3) は逆に本法の利点ともなる。すなわち、ごく少量の細胞しか得られないときは、FCMで核DNA量を測定することは困難であるが、本法では可能である。また、FCMはその原理から測定できるのは細胞浮遊液だけであるが、本法は細胞浮遊液は勿論、塗抹標本を作製することによって測定できるほか、浮遊液以外の試料も制約はあるものの、スライド標本の形にさえできれば測定できる。今回のようにスライドガラス上に這わせた細胞の核DNA量の測定もできる。この利点はスライドガラス標本上での増殖態度と対応させたデータを得られることである。(例えば、細胞密度の高いところと低いところでDNAヒストグラムのパターンに差があるか、等である。)このような標本の測定は他の顕微測光法でも可能であるが、本法の特徴は、今回核DNA量の計測時に同時にMitotic Indexを測定したように、形態の同時観察や形態特徴量の測定が容易にできることである。

DNAヒストグラムは細胞の増殖態度を反映しているから、本法を用いて、培養細胞系の細胞増殖能の解析が可能である。実際、菅間らは本法により、肺癌関連モノクローナル抗体の細胞増殖へ及ぼす影響を解析している(43)。また、画像解析法を細胞周期に応用した例としては Wachsmuth らの方法がある(44,45)。細胞周期の解析 cell cycle analysis には、通常、 $^3\text{H}$ -チミジンや bromodeoxyuridine(BrdU)の取り込み率を肉眼的に計測する方法が用いられているが、彼らはその取り込み率の計測をTVカメラと画像解析装置を組み合わせ、自動的に行う方法を考案している。

カラー画像解析法によるDNAヒストグラムパターンとFCMによるDNAヒストグラムパターンの差がいかなる原因に基づくのか、今後、さまざまな標本をFCMと比較しながら測定し、検討する必要があるが、本法は細胞動態の有用な解析法となり得る。

## 第5節 小 括

今回、考案した画像解析法で、カラー画像解析法によるDNAヒストグラムパターンとFCMによるDNAヒストグラムパターンはほぼ類似しているが、S期がやや高く、G2 + Mのピークがなだらかであった。これは、測定精度と標本処理の違いによるCV値の増大が主な原因と考えられた。今後、さまざまな標本をFCMと比較しながら測定し、検討する必要がある。S期同調培養法に伴うDNAヒストグラムの変化、血清濃度を下げた時のDNAヒストグラムのわずかな変化も検出することができた。従って、本法は細胞動態の解析法として有用と考えられる。また、本法の特徴である形態観察が同時に可能であることを利用して、mitotic index を算出し核DNAヒストグラムにおけるM期の割合を求めることが出来た。

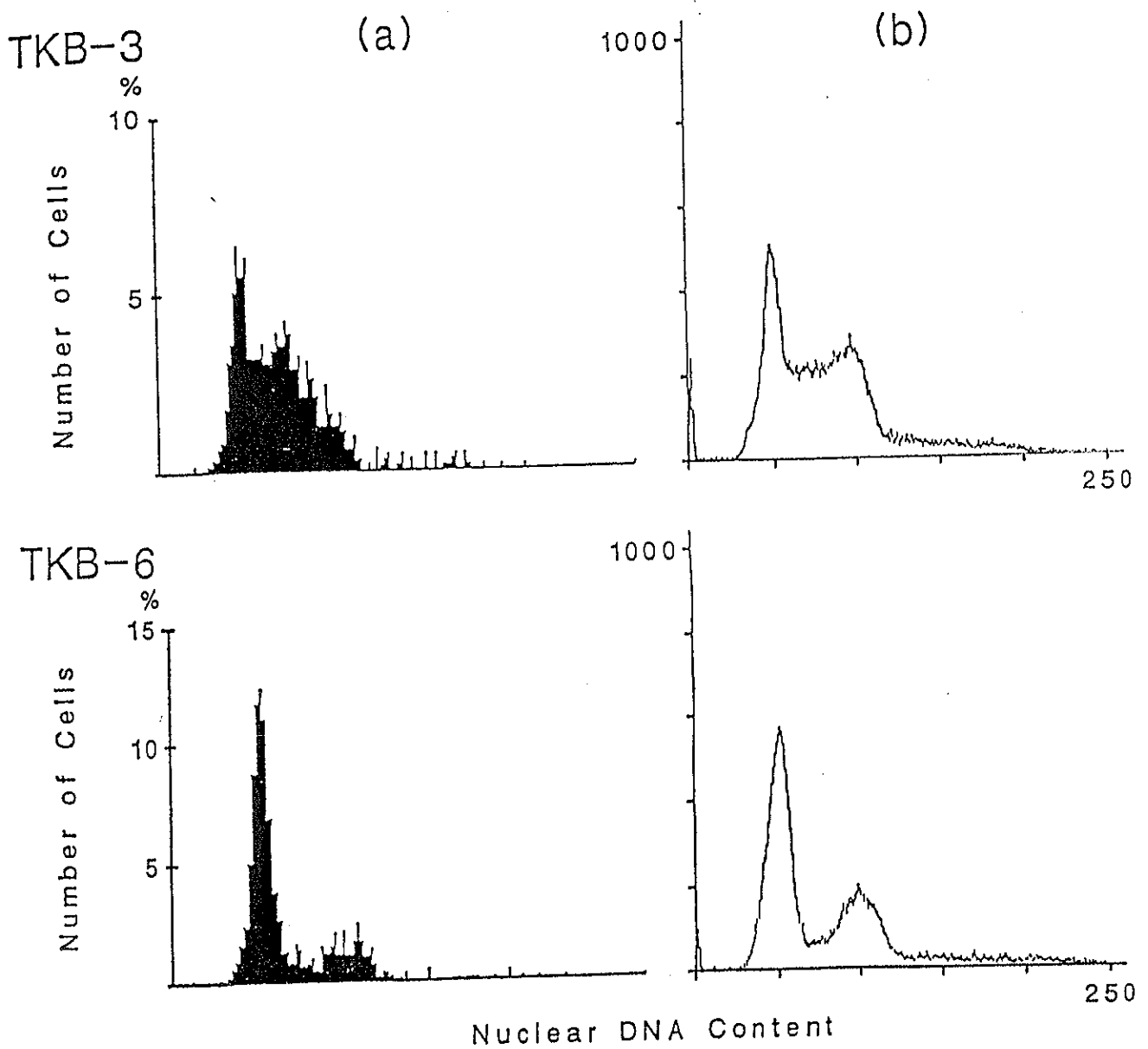
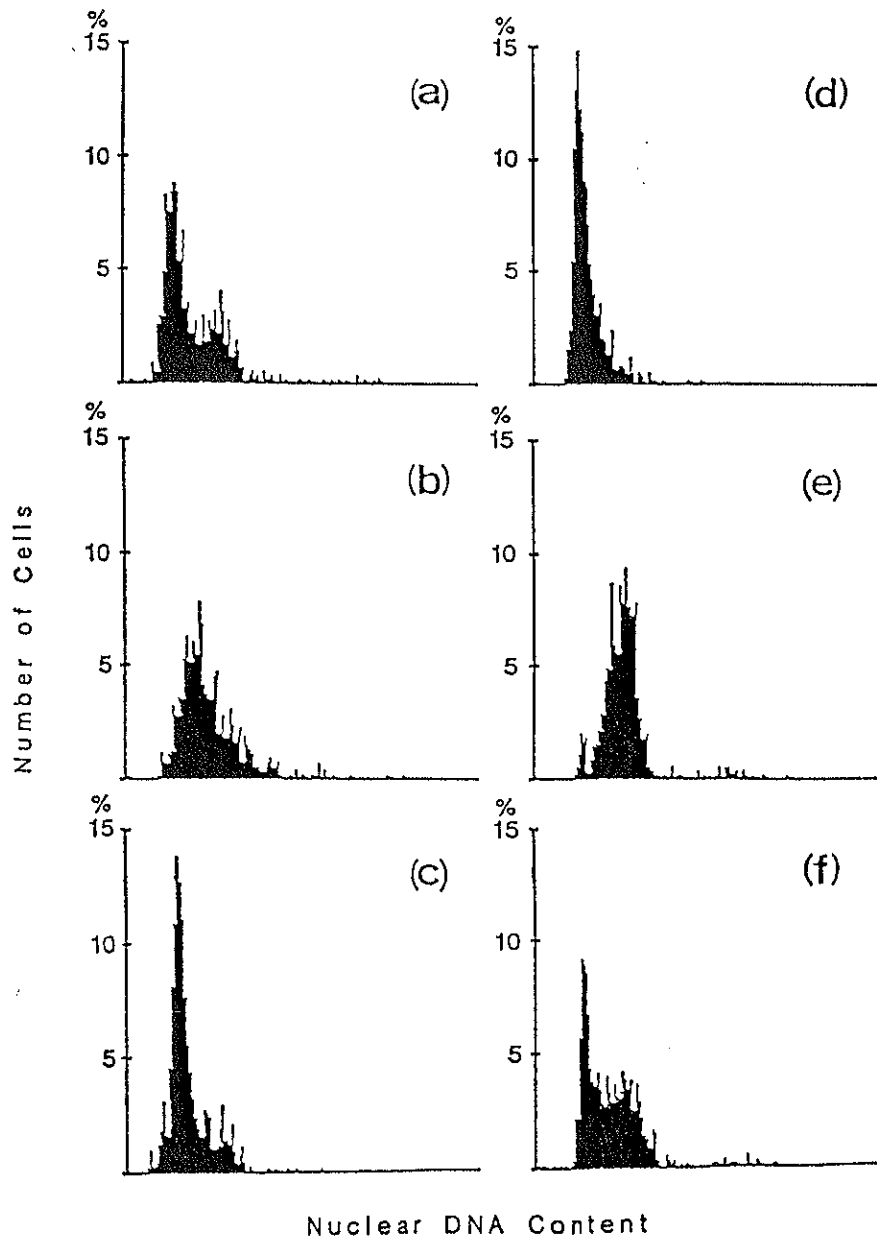


Fig. 4-1

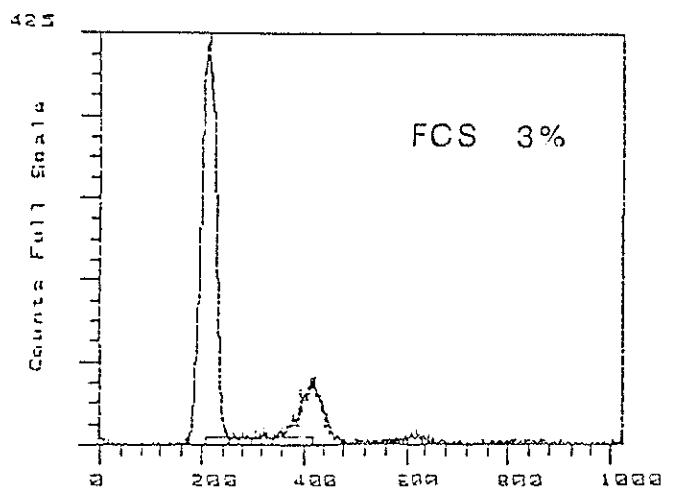
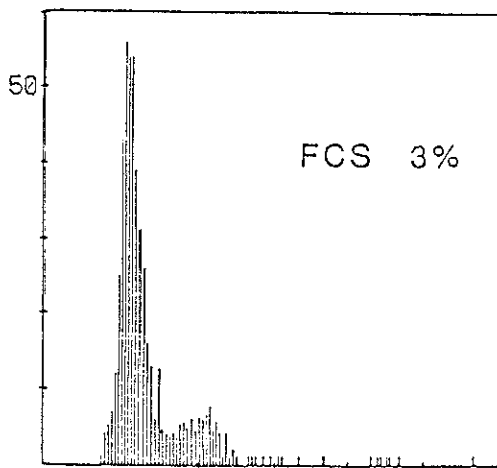
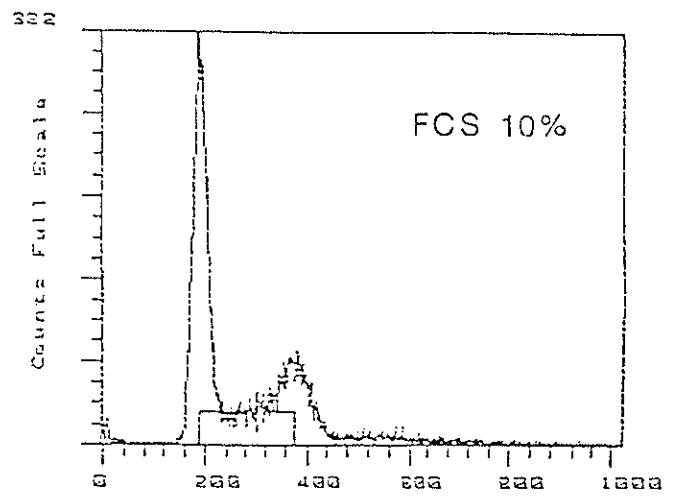
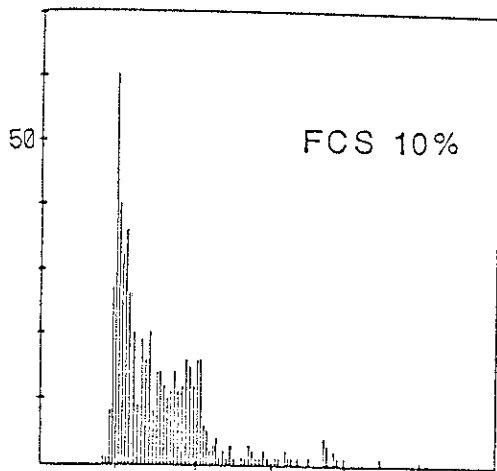
DNA frequency histograms of TKB-3 and TKB-6 cells in (a) color image analysis system and (b) flow cytometry.



- (a) before treatment (b) just after excessive thymidine treatment  
 (c) 18hrs after excessive thymidine treatment  
 (d) just after hydroxyurea treatment  
 (e) 15hrs after hydroxyurea treatment  
 (f) 30hrs after hydroxyurea treatment

Fig. 4-2

DNA frequency histograms of TTA-1 cells treated with excessive thymidine and hydroxyurea.



(a) Color image analysis

(b) Flow Cytometry

Fig. 4-3

DNA frequency histograms of TTA-1 cells cultured with the medium containing 10% FCS and 3% FCS.

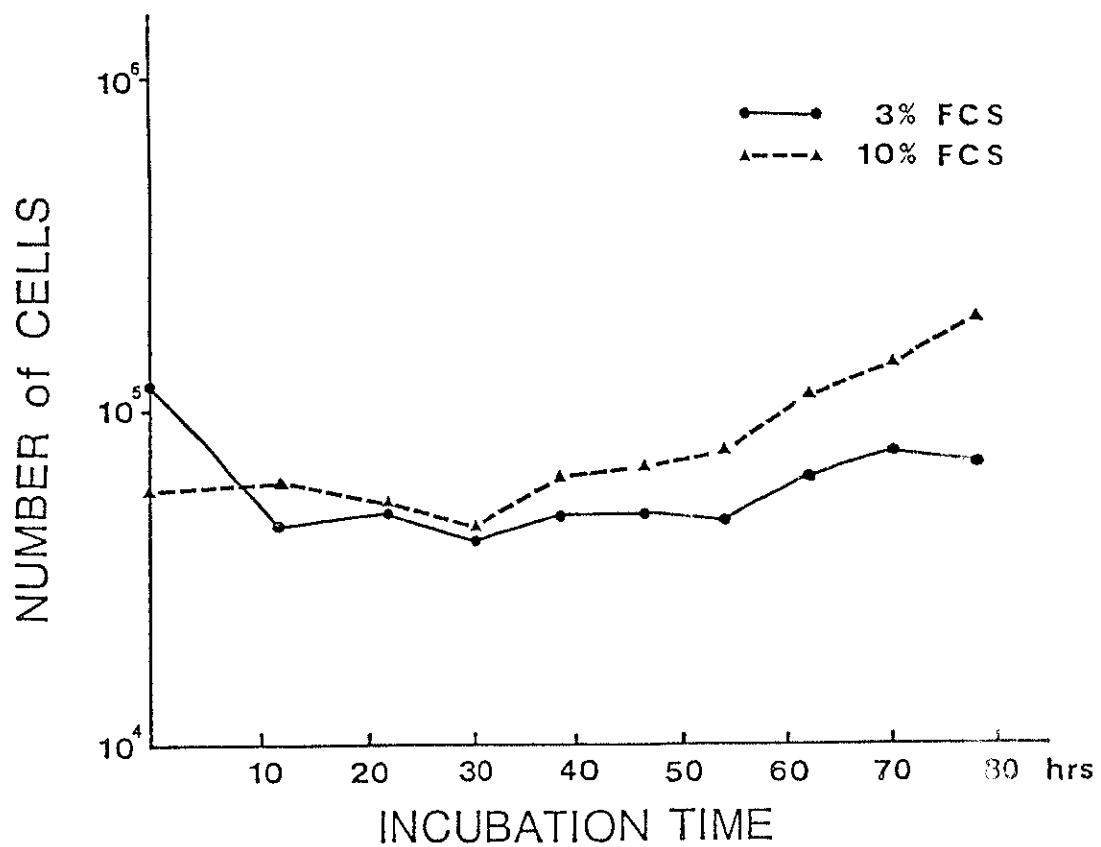


Fig. 4-4 Growth curve of TTA-1 cells cultured with the medium containing 10%FCS and 3%FCS.