

〔原 著〕

DMBA 塗布によるハムスター頬嚢粘膜上皮の 細胞増殖と BrdU の結合

賀来 亨, 中出 修, 八重樫和秀, 大内 知之
蓑輪 泰子, 阿部 英二, 菅野 秀俊, 奥山 富三

東日本学園大学歯学部口腔病理学講座

(主任：奥山富三 教授)

Cheek Pouch Epithelial Cell Proliferation Induced by DMBA Application and Incorporation of BrdU

Tohru KAKU, Osamu NAKADE, Kazuhide YAEGASHI, Tomoyuki OHUCHI,
Yasuko MINOWA, Hideji ABE, Hidetoshi KANNO, and Tomizo OKUYAMA

Department of Oral Pathology, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief : Prof. Tomizo OKUYAMA)

Abstract

The application of an immunohistochemical method in the detection of proliferating cells, that have incorporated thymidine analogue, 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), was studied on cheek pouch mucosas of hamsters treated by three topical applications of 0.5% DMBA mineral oil. Incorporation of BrdU into newly synthesized DNA provides the basis for a simple technique to identify proliferating cells.

BrdU was administered to hamsters by intraperitoneal injections at 6 hour intervals. Tissue was fixed in chilled acetone, embedded in soft paraffin, sectioned at 5 μ m. Deparaffinized tissue sections were incubated with an anti-BrdU antibody, and cells which had traversed the S-phase during the BrdU exposure period were identified immunohistochemically. Proliferation and migration of cheek pouch epithelial cells were identified by antibody staining after one, five, and nine exposures to BrdU. BrdU was mostly present in the nuclei of epithelial cells of the basal cell layer. The BrdU labeling Index (LI), or S-phase fraction, was determined by counting the number of BrdU-labeled cells in the tissue sections. The average LIs for non-DMBA treated and DMBA-treated cheek pouch epithelia, administered a single dose of BrdU

were 2.8% and 12.4% respectively. A higher proportion of labeled cells was present in the basal cell layer of the DMBA-treated animals than in that of the non-DMBA-treated animals.

The ability to measure cell proliferation is important in the study of oral carcinogenesis.

Key words : BrdU, immunohistochemistry, monoclonal antibody, DMBA

緒 言

細胞動態の指標の1つとしてDNA合成細胞(S期細胞)のLabeling Indexがあり, その有用性は知られているが, 従来, これらはアイソトープ, 例えば, ^3H -thymidine や ^{14}C -thymidine が用いられ, これらの取り込みによる autoradiography が使用されてきた。この方法はその使用に制限があり, 結果の判定まで時間を要することが問題であった。Gratzner¹⁾は thymidine の analogue である 5-bromodeoxyuridine (BrdU) を取り込んだ DNA 合成細胞(S期細胞)を認識するモノクローナル抗体を開発した。この抗体はS期細胞を鋭敏にしかも, 免疫組織学的に迅速に同定し得ることから細胞増殖の解析上非常に有効な方法である。BrdU は一時放射線増感剤として注目をあび^{2,3)}, 悪性脳腫瘍の放射線療法^{4,5)}や頭頸部癌の治療⁶⁾に使用された薬剤である。核酸を構成する一要素の thymidine の類似物質で, thymidine 環の5の位置のメチル基が Br におきかわった物質で, 細胞は thymidine と区別することができず, DNA を合成している最中に核内に取り込んでしまう^{2,3)}。DNA に組み込まれた BrdU は二重らせん構造のままではこの抗体は反応せず, 変性処理して単鎖の DNA にしなければならない¹⁾。動物の種類や細胞の種類に関係なく反応する⁷⁻¹⁸⁾と言われている。BrdU を用いたS期細胞の同定は特殊な施設を必要とせず, 短時間で結果の判定が可能なることから, これまでの方法に比べてすぐれた面を持っている。

今回, われわれは 9, 10-dimethyl-1,2-ben-

zanthracene (DMBA) をハムスター頬嚢粘膜に短期間塗布し, 頬嚢粘膜上皮におけるS期細胞の同定を BrdU の腹腔内投与の回数と Labeling Index について, BrdU の免疫組織学的方法を用いた。

実験材料および方法

実験動物は生後約6週のゴールデン・ハムスターを用い, 発癌剤0.5%DMBA ミネラルオイル溶液を頬嚢粘膜に4日毎, 3回塗布した。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma) を 10% dimethylsulfoxide/saline に溶解し, 25 mg/kg の割合で DMBA 3回塗布1日後に腹腔内に投与した。BrdU 腹腔内投与は1回のみと6時間毎のパルス・ラベルにより5回, 9回の投与を行った。動物は最終 BrdU 投与1時間後に屠殺した。コントロールは頬嚢にミネラルオイルの塗布を行った。組織は冷アセトン固定, 軟パラフィン包埋を行い, 5 μm の薄切切片とした。BrdU の免疫組織学的方法は Avidin-biotin peroxidase complex method (ABC法) により行った¹⁹⁾。概略を記すと, 組織切片の脱パラフィンを行い, アルコールを通し, 水洗した後, 4N-HCl で 37°C, 20分切片を処理し, DNA の単鎖化をはかり, 200倍に希釈した抗 BrdU モノクローナル抗体 (Becton-Dickinson 社製) と 4°C, overnight で反応させ, Biotin 化抗マウス免疫グロブリン馬血清 (1:100) (Vector 社製), Avidin-Biotin peroxidase complex (Vector 社製) を反応させ, 次に Graham and Karnovsky²⁰⁾の方法に順じて 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 50mg/100ml の

0.05%Tris-HCl buffer, pH7.6で茶褐色に反応させ、Bioleit 封入を行った。核染色はヘマトキシリンを用いた。

BrdU 染色の陰性対照として、非免疫マウス血清を一次抗体として使用した。組織学的検索はヘマトキシリンエオジン染色を行った。

BrdU による S 期細胞の標識率の検索は任意の部分における全細胞核をカウントし、BrdU によりラベルされた核をカウントし、次の式を Labeling Index とした。

$$\text{Labeling Index (LI\%)} = \frac{\text{BrdU-labeled cells}}{\text{total number of cells}} \times 100$$

結 果

頬嚢粘膜に DMBA を短期間、すなわち、4 日毎、3 回塗布することにより、頬嚢粘膜上皮における細胞増殖の解析を BrdU の免疫組織化学的方法により DNA 合成細胞の同定を行った。

DMBA の 3 回塗布では組織学的に上皮の肥厚は大部分認められず、DMBA 無塗布との差異は認められなかった。BrdU によりラベルされる細胞、S 期細胞、は主として基底層の細胞に局限していた (Figs.1-4)。BrdU 1 回腹腔内投与の LI は DMBA 無塗布では $2.8 \pm 0.9\%$ (Fig.1)、DMBA 3 回塗布では $12.4 \pm 3.0\%$ (Fig.2) で、DMBA 塗布で著しい S 期細胞の増加が認められる ($P < 0.001$) (Table 1)。BrdU のパルス・ラベルの回数を増やすと DMBA 無塗布では BrdU 5 回、9 回では LI はそれぞれ 12.0 ± 2.8 (Fig.3) $15.7 \pm 4.4\%$ で、BrdU 1 回と BrdU 5 回、9 回では有意差 ($P < 0.001$) が認められるが、BrdU 5 回、9 回では有意差は認められなかった (Table 1)。DMBA 3 回塗布では BrdU 5 回 (Fig.4)、9 回のそれぞれの LI は $23.0 \pm 4.5\%$ 、 $55.7 \pm 9.1\%$ と投与回数が増すにつれて、BrdU によりラベルされた S 期細胞の著しい増加が認められる (Table 1)。DMBA 無塗布、BrdU 5 回と DMBA 3 回

塗布、BrdU 1 回の LI はそれぞれ $12.0 \pm 2.8\%$ (Fig.3)、 $12.4 \pm 3.0\%$ (Fig.2) で、同じ LI を示し、DMBA 3 回塗布により S 期細胞の著しい増加を示していることがわかる。DMBA 3 回塗布で認められた組織学的に上皮の下方への増殖が認められる部分では BrdU 5 回腹腔内投与で BrdU によりラベルされた細胞が上皮の 4~5 層に認められ (Fig.5)、また、BrdU 9 回では最表層の細胞にまで BrdU によりラベルされた核が認められ (Fig.6)、著しい S 期細胞の増加を示している所見である。短期間でも DMBA を塗布することにより、正常頬嚢粘膜上皮に比し、BrdU の取り込みにより、同定された S 期細胞の著しい増加が認められる (Table 1)。また、DMBA 塗布で認められた BrdU 5 回、9 回では基底細胞より上層の細胞に BrdU でラベルされた細胞が認められるが (Figs. 5,6)、BrdU 投与開始後、屠殺までの 25 時間、49 時間の間に基底層より移動した細胞と考えられる。

Table 1. Relationship between DMBA-applications and BrdU-uptake

The number of DMBA applications	The number of BrdU injections	LI% ^a
A DMBA 0 ^c	1	2.8 ± 0.9 ^b
B DMBA 3	1	12.4 ± 3.0 ^d
C DMBA 0	5	12.0 ± 2.8 ^g
D DMBA 3	5	23.0 ± 4.5 ^{e,i}
E DMBA 0	9	15.7 ± 4.4 ^{h,l}
F DMBA 3	9	55.7 ± 9.1 ^{f,j,k}

a: Labeling Index (LI%) = $\frac{\text{BrdU-labeled cells}}{\text{total number of cells}} \times 100$

The percentage of cells labeled with BrdU as measured immunohistochemically.

b: Mean \pm Standard Deviation

c: 0 represents no DMBA treatment.

d: $p < 0.001$, compared with A.

e: $p < 0.01$, compared with C.

f: $p < 0.001$, compared with E.

g: $p < 0.001$, compared with A.

h: $p < 0.001$, compared with A.

i: $p < 0.01$, compared with B.

j: $p < 0.001$, compared with B.

k: $p < 0.001$, compared with D.

l: not significant, compared with C.

考 察

頬嚢粘膜上皮におけるS期細胞の同定を行うために、thymidineのanalogueであるBrdUを取り込んだDNA合成細胞、S期細胞を抗BrdU抗体を用い、免疫組織化学的に検出し、発癌剤DMBAの頬嚢粘膜上皮細胞に対する影響についてBrdUの腹腔内投与の回数とLIによりDMBA無塗布群と比較検討した。

BrdUを用いたS期細胞の同定は³H-thymidineのautoradiographyに比しすぐれた方法であるといわれている。すなわち、BrdUの免疫組織化学的方法はautoradiographyよりbackground stainingが少なく、陽性細胞と陰性細胞とがはっきり区別され、短時間で結果の判定が可能で、³H-thymidineによるautoradiographyの結果と差異がないと言われている^{12,17)}。

頬嚢粘膜上皮は4～6層の細胞層よりなり、重層扁平上皮の増殖層である基底細胞層に容易に発癌剤が到達しやすく、他部位、舌^{21,22)}、歯肉²³⁾、口蓋²⁴⁾など、の癌形成過程より、容易に発癌するものと思われる²⁵⁾。このことはDMBA 3回塗布のみでも、DMBA無塗布群に比し、BrdU 1回では約4倍のLIを、BrdU 5回、9回ではそれぞれ2倍、3倍のLIを示し、また、DMBA無塗布、BrdU 5回、最初のBrdU投与25時間後に屠殺し得た頬嚢粘膜上皮のLIとDMBA 3回塗布、BrdU 1回の頬嚢粘膜上皮のLIはそれぞれ $12.0 \pm 2.8\%$ 、 $12.4 \pm 3.0\%$ と同じLIを示したことより、頬嚢粘膜上皮基底層に発癌剤が容易に作用したことを裏付ける所見である。DMBA 3回塗布、BrdU 5回、9回腹腔内投与で最初のBrdU投与開始25時間後、49時間後に屠殺し得た頬嚢粘膜上皮で、上皮の下方への増殖、上皮肥厚の認められる部位でBrdUでラベルされた細胞核を免疫組織化学的に検出した結果、BrdU 5回 (Fig.5) では4～5層の細

胞核に、BrdU 9回 (Fig.6) では最表層の細胞にBrdUでラベルされた核が認められ、基底層から分裂により移動した細胞で、細胞周期のturn-overが速いことを示唆する所見と思われる。

今回、われわれが示したように、発癌剤DMBAの短期間塗布のみでもS期細胞の増加の著しいことにより、頬嚢あるいは他部位を用いてBrdUの免疫組織化学的方法により、S期細胞を同定し、種々の薬剤の細胞動態におよぼす効果を検討するのに有用な方法と考えられる。

結 語

1. 発癌剤DMBAを塗布することにより、基底細胞層の核のBrdUの取り込みは正常頬嚢粘膜上皮に比し、著しい増加が認められた。すなわち、S期細胞の増加が認められた。
2. BrdUのラベルする回数が増えるに従い、DMBA塗布群では基底層より上層の細胞にBrdUによるラベルが認められ、cell cycleのturn overの速いことを示していた。
3. 頬嚢粘膜上皮は4～6層の細胞層よりなり、発癌剤DMBAの短期間塗布でS期細胞の著しい増加が認められることは頬嚢癌形成の容易さを示唆する所見と思われる。

(本実験の一部は博友会の援助によった。)

文 献

1. Gratzner, H. G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication, *Science* 218; 474-475, 1982.
2. Szybalski, W.: X-ray sensitization by halopyrimidines, *Cancer Chemother. Rep.*, 58: 539-557, 1974.
3. Goz, B.: The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA eukaryotic cells, *Pharmacol. Rev.*, 29: 249-272, 1978.
4. Hoshino, T. and Sano, K.: Radiosensitization of malignant brain tumors with bromouridine

- (thymidine analogue), *Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.*, 8: 15-21, 1969.
5. Sano, K., Hoshino, T. and Nagai, M.: Radiosensitization of brain tumor cells with a thymidine analogue (bromouridine), *J. Neurosurg.*, 28: 530-538, 1968.
 6. Bagshaw, M. A., Doggett, R. L. S., Smith, K. C., Kaplan, H. S. and Nelson, T. S.: Intraarterial 5-bromodeoxy uridine and X-ray therapy, *Am. J. Roentgenol.*, 99: 886-894, 1967.
 7. Morstyn, G., Hsu, S-M., Gratzner, H., Russo, A. and Mitchell, J. B.: Bromo-deoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody, *J. Clin. Invest.*, 72: 1844-1850, 1983.
 8. Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallovicini, M. G., and Gray, J. W.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine, *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)* 80: 5573-5577, 1983.
 9. 佐々木功典, 村上知之, 荻野哲朗, 高橋 学: モノクロナル抗 Brd Urd 抗体を用いた人白血病細胞の FCM2パラメータ解析, 癌の臨床, 31:549-551, 1985.
 10. Hoshino, T., Nagashima, T., Murovic, J. A., Wilson, C. B., and Davis, R. L.: Proliferative potential of human meningiomas of the brain. A cell kinetics study with bromodeoxyuridine, *Cancer*, 58: 1466-1472, 1986.
 11. Harms, G., van Goor, H., Koudstaar, J., deLey, L., and Hardonk, M.: Immunohistochemical demonstration of DNA-incorporated 5-bromodeoxyuridine in frozen and plastic embedded sections, *Histochemistry*, 85: 139-143, 1986.
 12. Morstyn, G., Pyke, K., Gardner, J., Ashcroft, R., de Fazio, A. and Bhathal, P: Immunohistochemical identification of proliferating cells in organ culture using bromodeoxyuridine and a monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 697-701, 1986.
 13. 立松正衛, 増井恒夫, 小木曾 正, 柴田雅朗, 伊東信行: ラット BBN 膀胱癌発癌過程における細胞増殖と細胞周期. 日病会誌 75: 456-457, 1986.
 14. 佐貫和俊, 沖田極, 村上不二夫, 安永 満, 村田誠, 竹本忠良, 佐々木功典: 抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた新しい S 期肝細胞の同定法. 医学のあゆみ 126: 1632, 1986.
 15. Craddock, V. M., and Driver, H. E.: Sequential histological studies of rat oesophagus during the rapid initiation of cancer by repeated injection of N-methyl-N-benzyl nitrosamine. *Carcinogenesis*, 8: 1129-1132, 1987.
 16. Harms, G., van Goor, H., deLey, L., and Hardonk, M. J.: Simultaneous immunohistochemical demonstration of antigen expression and 5-bromodeoxyuridine incorporation in plastic embedded sections. *Histochemistry*, 86: 393-395, 1987.
 17. de Fazio, A., Leary, J. A., Hedley, D. W., and Tattersall, M. H. N.: Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J. Histochem. Cytochem.*, 35: 571-577, 1987.
 18. 呉 耀晨, 源河 茂, 設楽信行, 和田照美, 高倉公朋: ヒト脳腫瘍細胞に対する vincristine の効果—BrdU/DNA 二次元標示法による解析—医学のあゆみ 142: 777-778, 1987.
 19. Hsu, S-M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 577-580, 1981.
 20. Graham, R. C. Jr., and Karnovsky, M. T.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14: 291-302, 1966.
 21. Fujita, K., Kaku, T., Sasaki, M., and Onoé, T.: Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene. *J. Dent. Res.*, 52: 327-332, 1973.
 22. Fujita, K., Kaku, T., Sasaki, M., and Onoé, T.: Experimental production of lingual carcinomas in hamsters: Tumor characteristics and site of formation. *J. Dent. Res.*, 52: 1176-1185, 1973.
 23. 藤田浄秀, 賀来 亨, 五十嵐稔明, 佐々木元賢: 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene の塗布による歯肉癌の実験的形成. 日口外誌 19: 266-270, 1973.
 24. 賀来 亨, 藤田浄秀, 小田島哲世, 五十嵐稔明, 佐々木元賢: 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene の塗布による口蓋粘膜癌の実験的形成. 日口外誌 19: 435-440, 1973.
 25. 賀来 亨, 藤田浄秀, 小田島哲世, 佐々木元賢: 4-Nitroquinoline N oxide の塗布による口腔粘膜癌の実験的形成. 日口外誌 19: 116-1121, 1973.

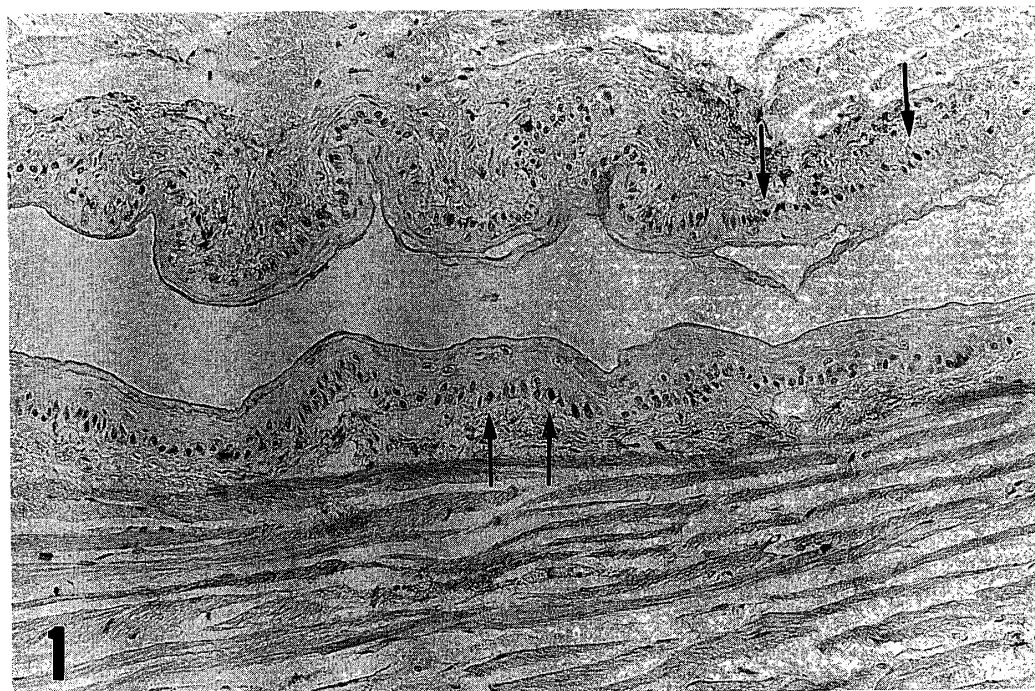


Fig. 1 Immunoperoxidase staining for BrdU. Non-DMBA-treated cheek pouch epithelium from a hamster 1 hour after BrdU injection. There are few cells labeled by BrdU (arrow). Magnification $\times 85$.

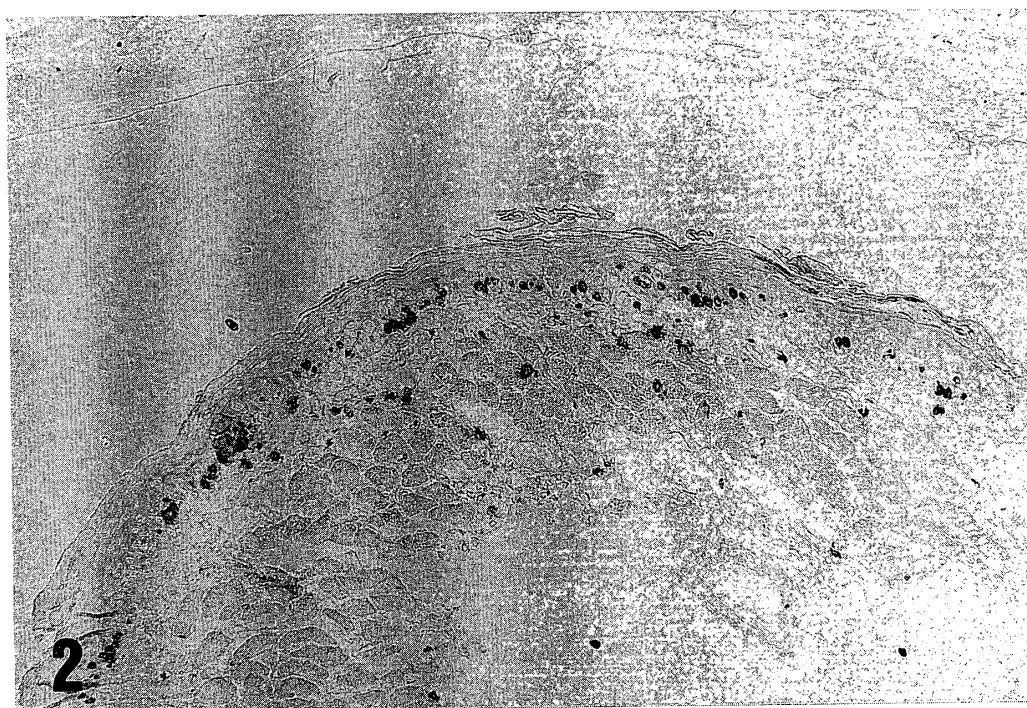


Fig. 2 Immunoperoxidase staining for BrdU. DMBA-treated cheek pouch epithelium from a hamster 1 hour after BrdU injection. A higher proportion of labeled cells are present in the DMBA-treated animal than in the non-DMBA-treated animal shown in Fig. 1. Some stromal cells show BrdU-incorporated nuclei. Magnification $\times 85$.

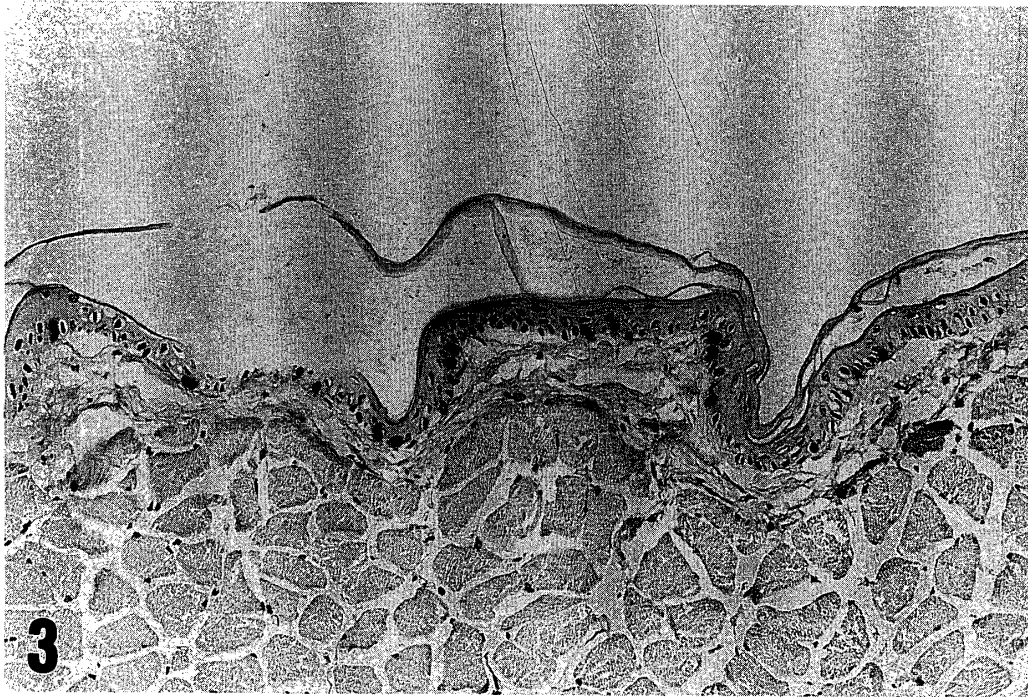


Fig. 3 Immunoperoxidase staining for BrdU. Non-DMBA-treated cheek pouch epithelium from a hamster 1 hour after the fifth BrdU injection. There are some stained nuclei in the basal cell layer of the epithelium. Magnification $\times 170$.

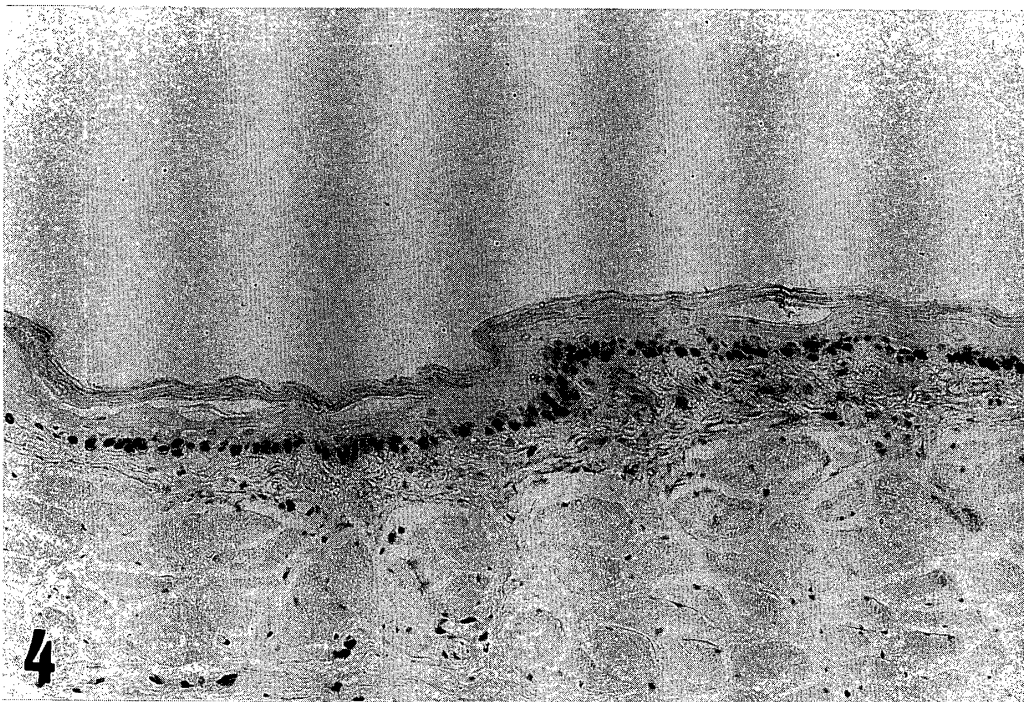


Fig. 4 Immunoperoxidase staining for BrdU. DMBA-treated cheek pouch epithelium from a hamster 1 hour after the fifth BrdU injection. There is a marked increase in the number of cells of the basal cell layer labeled by BrdU. A higher proportion of labeled cells are present in the DMBA-treated animal than in non-DMBA-treated animal shown in Fig. 3. Magnification $\times 170$.

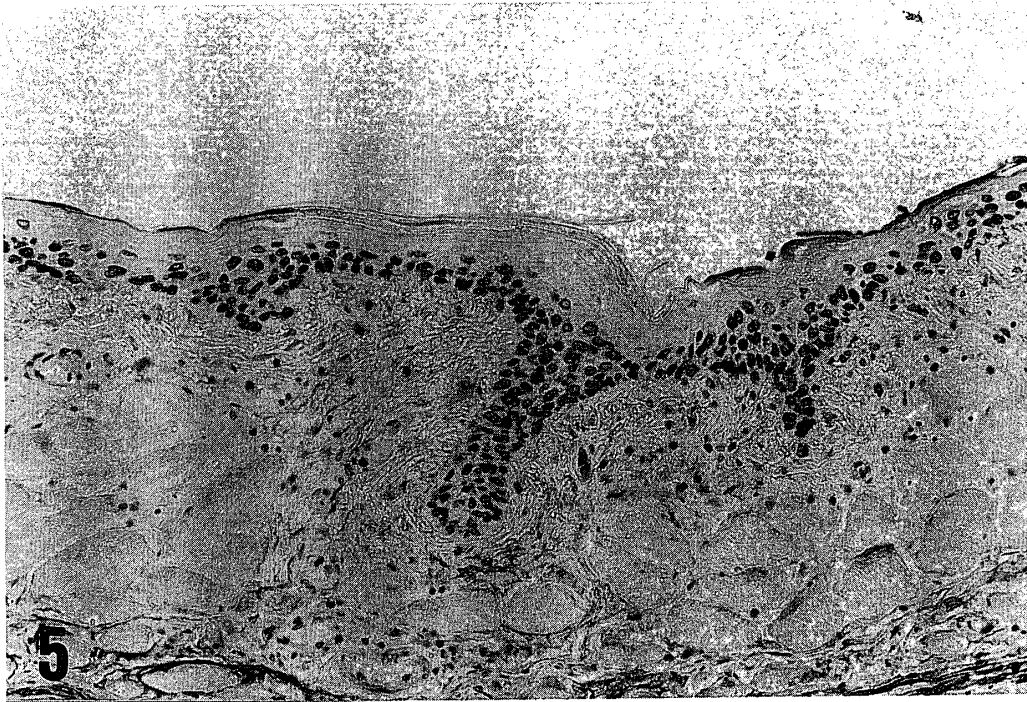


Fig. 5 Immunoperoxidase staining for BrdU. DMBA-treated cheek pouch epithelium from a hamster 1 hour after the fifth BrdU injection. BrdU-labeled cells were half way to the superficial surface of the epithelium. There is a marked increase in the number of cells labeled by BrdU. Magnification $\times 170$.

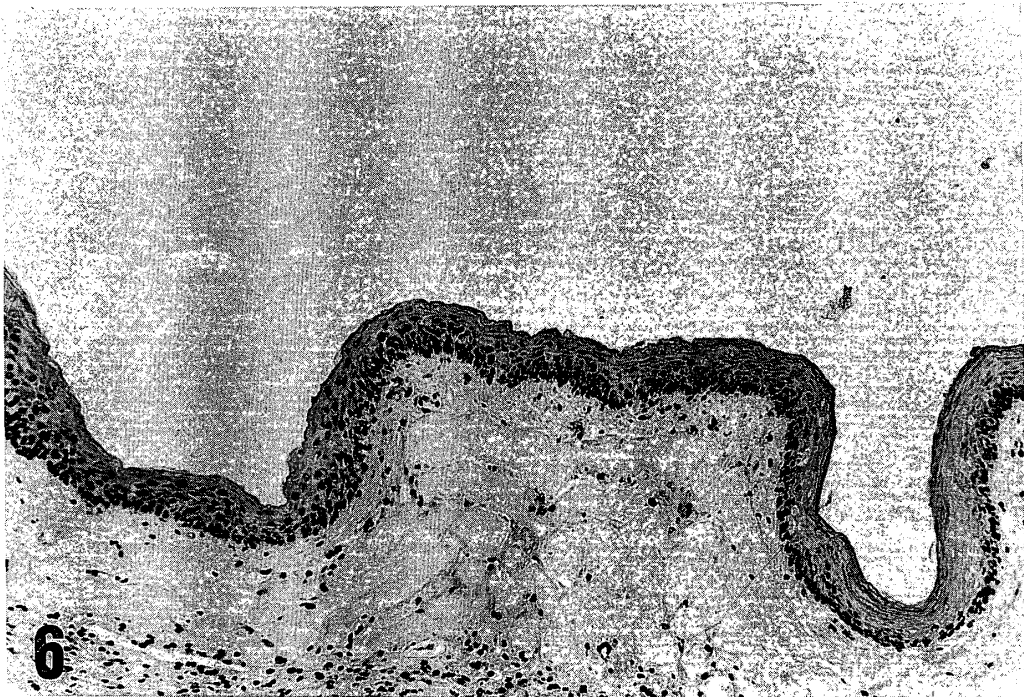


Fig. 6 Immunoperoxidase staining for BrdU. DMBA-treated cheek pouch epithelium from a hamster 1 hour after the ninth BrdU injection. There is a marked increase in the number of cells labeled by BrdU. Migrating cells, BrdU-labeled cells, covered the entire surface of the epithelium. Magnification $\times 170$.