

# in vivo 角膜上皮細胞のフローサイトメトリーを用いた 細胞周期分析法の研究

根津 永津, 大橋 裕一, 木下 茂  
大阪大学医学部眼科学教室

## 要 約

in vivo における角膜上皮細胞の細胞分裂頻度を調べるには, bromodeoxyuridine や<sup>3</sup>H-thymidine の細胞取り込みから S 期細胞数を数える方法, 組織伸展標本作成後に分裂細胞数を数える方法などが一般的である。しかし, これらの方法では角膜上皮細胞周期の全体像をとらえたい場合, その定量性に欠けるとい難点がある。今回, 我々はフローサイトメトリーを用いて propidium iodide で染色した細胞内 DNA 量を測定することにより, in vivo 家兎角膜上皮細胞の分裂頻度を算出する方法を試み, 培養上皮細胞と比較検討した。この方法では, 角膜上皮細胞を完全に単離細胞化する必要があり, これには低濃度ディスペース処理が最も適していた。結果は, in vivo 角膜上皮細胞では G0/G1 期 97%, S 期 2%, G2/M 期 1%, 培養細胞では G0/G1 期 71%, S 期 14%, G2/M 期 15% であった。しかし, 上皮細胞は集塊しやすいため各ステップを敏速に行うことが必要と考えられた。(日眼会誌 96:283-287, 1992)

キーワード: フローサイトメトリー, 細胞周期分析, 角膜上皮細胞, ディスペース, ヨウ化プロビジウム

## Flow Cytometry Cell-cycle Analysis for in vivo Corneal Epithelium

Etsu Nezu, Yuichi Ohashi and Shigeru Kinoshita

Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

### Abstract

To investigate the cell-cycle kinetics of in vivo corneal epithelium, S phase cell analysis using either bromodeoxyuridine or <sup>3</sup>H-thymidine incorporation and mitotic counts on flat preparations have been used extensively. This type of analysis represents S-phase cells, but not G0, G1, or M-phase cells. In this study, in vivo and in vitro rabbit corneal epithelial cells, in which the nuclei were stained with propidium iodide, were analyzed by flow cytometry to observe the overall distribution of each cell cycle. The method requires single cell suspensions from corneal epithelium. For this, an intact sheet of corneal epithelium obtained using low concentration of neutral protease, dispase II, was treated with trypsin and EDTA. The present results indicated that in in vivo corneal epithelium 97% of total cells were in the G0/G1 phase, 2% in the S phase and 1% in the G2/M phases; while in the in vitro epithelium 71% of cells were in the G0/G1 phase, 14% in the S phase and 15% in the G2/M phase. Although the present method can be applied to observe the cell-cycle in in vivo epithelium if used properly, methodologies to maintain single cell suspensions are required for future studies. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:283-287, 1992)

Key words: Flow cytometry, Cell cycle analysis, Corneal epithelium, Dispace, Propidium iodide

別刷請求先: 553 大阪市福島区福島 1-1-50 大阪大学医学部眼科学教室 根津 永津

(平成3年4月26日受付, 平成3年7月18日改訂受理)

Reprint requests to: Etsu Nezu, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School,

1-1-50 Fukushima, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

(Received April 26, 1991 and accepted in revised form July 18, 1991)

## I 緒 言

in vivo 角膜上皮細胞の細胞分裂頻度を調べる方法としては、組織伸展標本作成後に分裂細胞数を数えたり<sup>1)2)</sup>、bromodeoxyuridine (BrdU)<sup>3)</sup>や<sup>3</sup>H-thymidineを短時間取り込ませてS期細胞を標識し<sup>4)</sup>、組織切片を作成して免疫組織染色法やオートラジオグラフィでS期細胞数を調べる方法がよく使用されている。実際、これらの方法は、どの細胞がどの時点で分裂したかを知るには優れた方法である。しかし、角膜上皮細胞の分裂頻度を全体像として捕らえたい場合には、その定量性に欠けるという難点がある。

このため、我々は細胞内DNA量から角膜上皮の細胞分裂頻度を測定する方法をin vivo角膜上皮細胞に試みた。この方法では、細胞内DNAの2重鎖を490 nmで励起し610 nmの蛍光波長を発するpropidium iodideで染色し、個々の細胞の蛍光強度をフローサイトメーターで測定し、DNA Cell-Cycle Analysisを用いてG0/G1, S, G2/M期の細胞数を算出する<sup>5)</sup>。眼科領域ではブラッシュサイトロジーで得た結膜上皮細胞をこの方法で解析したり<sup>6)</sup>、リンパ球などの浮遊細胞ではこのDNA染色にBrdU染色を重ねて(2重染色)、より確実に分裂中の細胞数を測定する方法も行われている<sup>7)</sup>が、そのためには測定する細胞を単離細胞にしなければならない。このため、in vivo角膜上皮細胞や皮膚表皮細胞のような細胞間結合の強い細胞を用いた報告は少なく、方法論も必ずしも確立しているとは言いがたい。そこで、今回我々は、in vivo角膜上皮細胞を数種類の 방법으로単離細胞化したものと、角膜上皮培養細胞の細胞周期をこの方法で比較検討したので、若干の考察を加え報告する。

## II 実験方法

### 1. in vivo 角膜上皮細胞の採取方法

白色家兎をペントバルビタールナトリウムの静脈注射で殺戮し、角膜表面を生理食塩水で洗浄した。その後、以下の3種類の 방법으로角膜上皮細胞層を採取した。(1)角膜表層切除により角膜中央部組織を採取し、ディスペース (dispase II: Boehringer Mannheim: 2.4 U/ml) で37°C, 30~60分間インキュベートした。その後、Gipsonら<sup>8)</sup>の方法に準じて角膜上皮層をシートとして剥離した。(2) Beurmanら<sup>9)</sup>の方法に従い、500 mg/mlあるいは250 mg/ml濃度のウレタンを30  $\mu$ l点眼し、その後角膜実質と接着不良になった上皮層

をシート状に剥離し、採取した。(3) 100%エタノールをしみこませた綿棒を角膜上皮最表層に接触し、角膜実質と接着不良になった上皮層を剥離し、採取した。これら3種類の 방법으로採取した角膜上皮細胞層を、0.01%EDTA-0.125%トリプシン混合液と室温で約10分間反応させ、ピペットにて単離細胞化した。その後牛胎児血清で中和し、200 gで5分間遠心した。

### 2. 培養角膜上皮細胞の採取方法

白色家兎の強角膜片作成後、内皮細胞をデスメ膜から剥離し、3×3 mmの角膜片を作成した。角膜片は上皮層を上にして、35 mmディッシュ上に静置して培養した。培養液にはSupplemented Hormonal Epithelial Medium (SHEM)<sup>9)</sup>を使用し、培養2日後に培養液を交換し、4日後に角膜片を摘出した。その後は3日ごとに培養液を交換した。2週間後に培養細胞をリン酸緩衝液(10 mM, pH 7.5)で2回洗浄後、0.01%EDTA-0.125%トリプシン混合液を入れ、室温で10分間放置した。その後ピペットで単離細胞化し、牛胎児血清で中和し、200 gで5分間遠心した。

### 3. DNA染色とFluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

単離細胞になった角膜上皮細胞に $2.5 \times 10^5$  cell/ml濃度以上になるようにクエン酸緩衝液(250 mMショ糖, 40 mMクエン酸ナトリウム, pH 7.6: Becton Dickinson)を加え、次に0.003%トリプシンを加え10分間反応させた。その後、1.5 mlの0.05%トリプシン阻害剤で中和すると同時に、1.5 mlの0.01%ribonuclease A (Becton Dickinson)を加え、再度10分間反応させた。最後にpropidium iodide (Becton Dickinson)を加えて、暗所で10分間反応させた。この細胞浮遊液をフローサイトメーターで測定する直前に再度ピペットでよく単離細胞化して、50  $\mu$ mのナイロンメッシュ(第一理科)を通し、フローサイトメーター(FACScan: Becton Dickinson)で測定した<sup>10)</sup>。ソフトウェアとしてはCONSORT 30 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 米国)を用い、564~606 nmの蛍光波長に感度を持つFluorescence 2 (FL 2)を使用し、1回の測定につき10,000個の上皮細胞を流した。FACScan使用時の条件はForward Scatter (Linear, DETECTOR E 000, AMPLIFIER 8.30), Side Scatter (Linear, DETECTOR 480, AMPLIFIER 1.00), FL 2 (Linear, DETECTOR 470, AMPLIFIER 1.00)に設定した。

#### 4. DNA Cell-Cycle Analysis

FACScan により得られた結果を, コンピューターを用いて, DNA Cell-Cycle Analysis Software-Ver C, Sum of Broadened Rectangles Model (SOBR) で Gaussian curve に乗せて解析した<sup>11)</sup>.

### III 実験結果

in vivo 角膜上皮細胞のディスペース処理 5 例, ウレタン処理 3 例, エタノール処理 2 例, および培養角膜上皮細胞 5 例について細胞周期測定を行った. ディスペース処理した角膜上皮細胞の DNA 染色施行直前の状態を顕微鏡下で観察すると, 丸く均質な細胞を認めたが, 繰り返しピペットで単離細胞化していたにもかかわらず, 全体の 10~20% は 5~20 個の細胞集塊を形成していた. 一方, ウレタン, エタノール処理の場合, 細胞は完全に単離されていたが, その細胞形態, サイズはともに不均一であった.

図 1 a, 2 は in vivo 角膜上皮細胞のフローサイトメトリーの結果であり, 上皮層剝離にディスペース処理 (図 1 a), 100%ウレタン処理 (図 2) を行った場合である. ディスペースを用いて上皮剝離した場合, 図の上方の粗な点の集合の蛍光強度は, 下方の密な点の集

合の蛍光強度の約 2 倍量であり, 下方は G 0/G 1 期, 上方は G 2/M 期の細胞を示し, 大多数の細胞は G 0/G 1 期に含まれていた. ウレタンを使用した場合, このような典型的な蛍光パターンは見られず, DNA 解析は不能であった. 100%エタノールによる上皮剝離でもウレタン処理と同様な結果を得た. 全検体測定終了後, 無作為に数検体を抽出し, 再度メッシュに通し測定したところ, 全例で初回と同様の結果が得られた. 図 3 a は培養角膜上皮細胞のフローサイトメトリーの結果であり, ディスペース処理の in vivo 角膜上皮細胞と同様な蛍光パターンを示した. しかし, G 2/M 期の細胞数は in vivo 上皮に比べて圧倒的に多かった.

図 1 b はディスペース処理した in vivo 角膜上皮細胞, 図 3 b は培養角膜上皮細胞のフローサイトメトリーの結果を, DNA Cell-Cycle Analysis したヒストグラムの 1 例を提示した. in vivo 角膜上皮細胞の G 0/G 1 期は 96~97%, S 期は 2~3%, G 2/M 期は 0~1% であるのに対して, 培養細胞の G 0/G 1 期は 68~72%, S 期は 11~17%, G 2/M 期は 12~17% と, 明らかに培養細胞の方が分裂細胞数が多かった. 両者のヒストグラムの Gaussian curve に対する C.V. 値に, 統計的な差異を認めなかった (表 1).

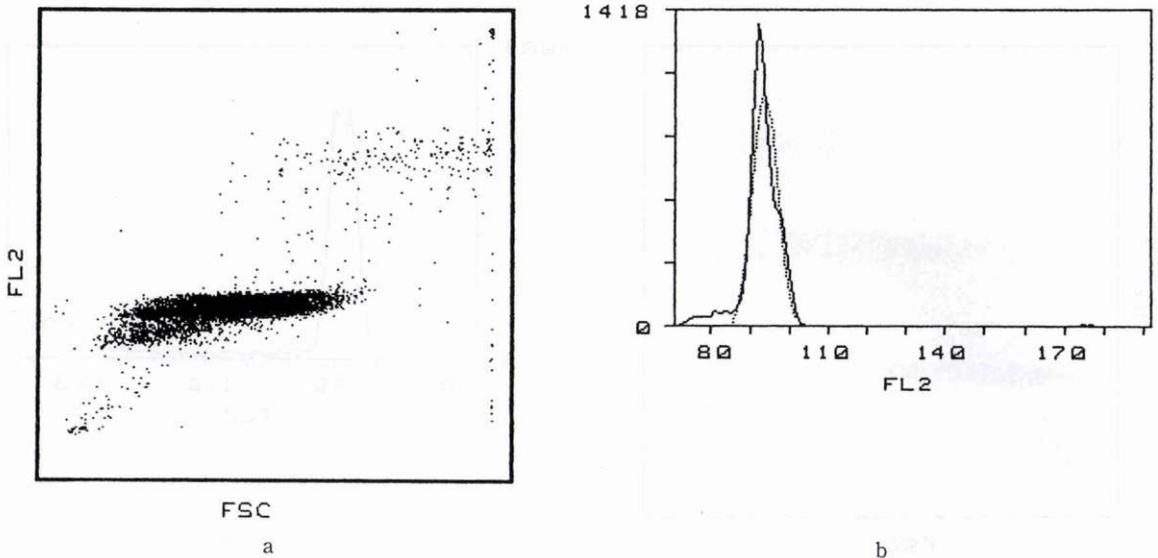


図 1 in vivo 角膜上皮細胞のディスペース処理例. a: propidium iodide 染色によるフローサイトメトリーの結果. b: a を, SOBR 解析してヒストグラムにしたもの. 図 a の上方の粗な点の集合は G 2/M 期の細胞を示し, 下方の密な点の集合は G 0/G 1 期の細胞を示す. 大多数の細胞は G 0/G 1 期に含まれている縦軸 (FL 2) は蛍光強度, 横軸 (FSC) は Forward Scatter 強度を示す. 図 b の破線は Gaussian curve を示す. G 0/G 1 期: 97%, S 期: 2%, S 2/M 期: 1% であった (CV: 4.2%).

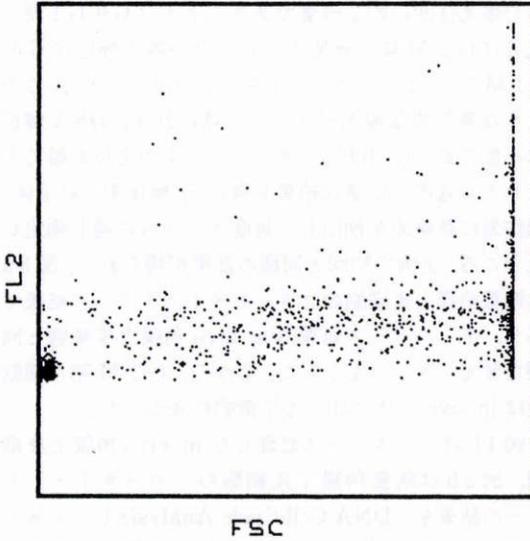
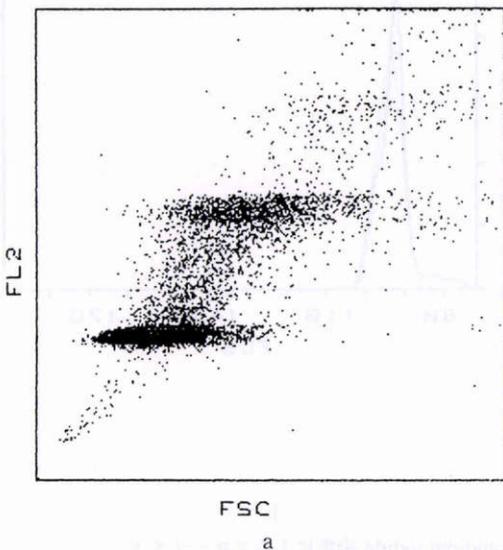


図2 in vivo 角膜上皮細胞のウレタン処理例での propidium iodide 染色によるフローサイトメトリーの結果, ディススペース処理例(図1a)のような蛍光パターンは見られなかった。

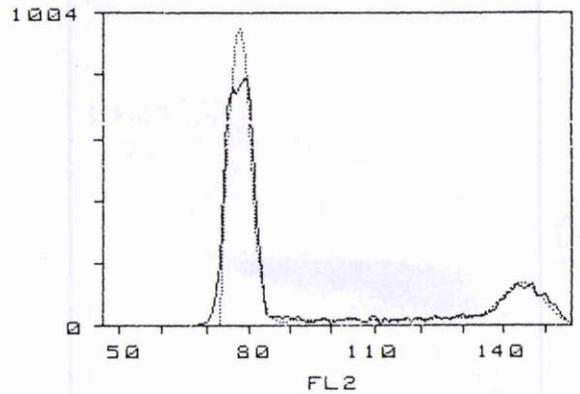
#### IV 考 按

in vivo における角膜上皮細胞の細胞周期を, フロー

サイトメトリーを用いた DNA Cell-Cycle Analysis により算出する方法を検討した。この方法によると、瞬時に1万個以上の細胞の細胞周期を解析することができるため信頼度が高いと思われる。今回の結果から、in vivo の上皮細胞を単離細胞にする方法として、低濃度のディススペースを用いる方法が最も適していると考えられた。ウレタンや、100%エタノールを使用した場合、細胞膜に対する障害が強いため、その後のトリプシン処理で完全にDNAが粉碎されたのではないかと考えられる。事実、DNA染色を行う直前の細胞を顕微鏡下で観察すると、ディススペース処理した場合は丸い均一な細胞が見られるのに対して、ウレタン処理群では細胞形態、サイズとも不均一であった。低濃度のディススペースを用いて角膜上皮層をシート状に剥離する方法は、Gipsonら<sup>9)</sup>が1982年に報告したものであり、細胞膜障害の少ない上皮細胞を採取することが可能である。しかし、この方法を用いても安定した結果を得るには、トリプシン処理した直後は単離細胞化した上皮細胞がその後のDNA染色でかなりの細胞集塊を作るので、フローサイトメーターで測定する直前に再度念入りにピペットで単離細胞化し、その後細かなメッシュに通して敏速に測定する必要がある。実際同一サンプルを10分後に再測定してみたが、メッシュに



a



b

図3 培養角膜上皮細胞例。a: propidium iodide 染色によるフローサイトメトリーの結果。b: aを、SOBR解析してヒストグラムにしたもの。図1のin vivo 角膜上皮細胞を低濃度ディススペース処理したものに比べ、図aではG0/G1期の細胞のみならずG2/M期の細胞も多く認められる。図bの破線はGaussian curveを示す。G0/G1期: 68%, S期: 15%, G2/M期: 17%であった(CV: 2.9%)。

表1 in vivo 角膜上皮細胞および in vitro 角膜上皮細胞の細胞周期

角膜上皮細胞	N	細胞周期 (%)			C.V.値 (%)
		G0/G1期	S期	G2/M期	
in vivo	5	97.0±0.6	2.2±0.4	0.6±0.5	3.3±0.4
in vitro	5	70.8±1.5	13.6±2.8	15.4±1.9	3.2±0.2

値は平均値±標準偏差として表した。

通さなければフローサイトメーターのノズルが詰まり測定は困難であった。

濱野ら<sup>2)</sup>の組織伸展標本の結果を用いて、我々が算出した in vivo における角膜上皮細胞の分裂頻度は約3%であり、今回の方法ではその値に近似した結果が得られた。DNA Cell-Cycle Analysis のソフトウェアには、polynomial model と Sum of Broadened Rectangles Model (SOBR) の2種類のプログラムがある。polynomial model は、言わば簡易型であり、ヒストグラムでの G0/G1 の蛍光強度が、かなり限られた範囲内に収まっている場合にしか用いることができず、またヒストグラムのピークから G0/G1 期、G2/M 期を設定して機械的に統計処理して細胞数を算出するため、今回のように G2/M 期が非常に少なくピークの定めにくい場合、不確実なものとなる。一方、SOBR は Gaussian curve に乗せて S 期を算出する方法であるが、G0/G1 および G2/M 期のピークを自分で設定することができるので信頼度は高く、特に今回のような分裂細胞頻度は少ない in vivo 細胞には適していると思われる。

今回試みた in vivo 角膜上皮細胞を単離細胞にして、フローサイトメーターを用いて DNA Cell-Cycle Analysis により個々の細胞周期における細胞数を算出する方法は、ある一時点の細胞の状態を瞬時に定量的に解析できるという点では優れている。実際、今回の結果から、in vivo 角膜上皮細胞でも適切な細胞処理方法を行えば、DNA 染色による細胞周期解析が可能であり、この方法を用いれば、今後角膜上皮層の創傷治癒過程における細胞分裂頻度の比較検討を定量的に行うことができる。しかし、上皮細胞はリンパ球のような浮遊細胞とは異なり集合し易い性質を持つため、一旦単離細胞化してもその後の操作中に細胞集塊を再度形成しやすいという基本的な問題点がある。手技を敏速に行うというだけでなく、集塊を阻止するような根本的な改良を行えば、さらに再現性の高い安定した

結果を得られる可能性がある。

この研究の一部は文部省科学研究補助金、一般研究(02454406)を用いて行われた。

#### 文 献

- 1) 三島 清一：家兎角膜上皮の細胞分裂に就いて。日眼会誌 58: 1678—1683, 1954.
- 2) Hamano H, Hori M, Hamano T, et al: Effect of contact lens wear on mitosis of corneal epithelium and lactate content in aqueous humor of rabbit. Jpn J Ophthalmol 27: 451—458, 1983.
- 3) Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, et al: The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1773—1778, 1990.
- 4) 原 二郎：Autoradiography による角膜上皮再生の研究。眼紀 13: 443—466, 1962.
- 5) Thompson HW, Malter JS, Beuerman RW, et al: Flow cytometry measurements of the DNA content of corneal epithelial cells during wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 433—436, 1991.
- 6) 坪田一男, 山田昌和, 山下達夫：フローサイトメトリによるヒト結膜上皮細胞核の DNA の解析。日眼会誌 94(抄録): 231, 1990.
- 7) Sasaki K, Murakami T, Ogino T, et al: Flow cytometric estimation of cell cycle parameters using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. Cytometry 7: 391—395, 1986.
- 8) Gipson IK, Grill SM: A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 23: 269—273, 1982.
- 9) Jumblatt MM, Neufeld AH:  $\beta$ -adrenergic and serotonergic responsiveness of rabbit corneal epithelial cells in culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1139—1143, 1983.
- 10) Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3: 323—327, 1983.
- 11) Dean PN, Grray JW, Dolbeare FA: The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. Cytometry 3: 188—195, 1982.