

動物培養細胞の増殖に影響を及ぼす因子に関する研究(I) : 増殖測定簡便法の開発とその応用

山田, 耕路
九州大学農学部食糧化学教室

村上, 浩紀
九州大学農学部食糧化学教室

西口, 尚志
九州大学農学部食糧化学教室

宗, 正康
九州大学農学部食糧化学教室

他

<https://doi.org/10.15017/23288>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 34 (1/2), pp.1-6, 1979-12. Faculty of Agriculture, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :

動物培養細胞の増殖に影響を及ぼす因子に関する研究

I. 増殖測定簡便法の開発とその応用

山田 耕路・村上 浩紀・西口 尚志
宗 正康・横山 文彦・白畑 実隆
篠原 和毅・大村 浩久

九州大学農学部食糧化学教室

(1979年4月23日受理)

Study of Factors Affecting Growth of Cultured Mammalian Cells

I. Development of a Simplified Method of Cell Growth Measurement and Its Application

KOJI YAMADA, HIROKI MURAKAMI, HISASHI NISHIGUCHI,
MASAYASU SOH, FUMIHIKO YOKOYAMA, SANETAKA SHIRAHATA,
KAZUKI SHINOHARA and HIROHISA OMURA

Institute of Food Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, 46-09, Fukuoka, 812

培養した組織および細胞の増殖においては、細胞数の増加だけでなく、細胞容積の増大や種々の化学的組成の変化等が認められており、これらの変化を定量的に測定するために種々の方法が用いられてきた (Evans *et al.*, 1951; Oyama and Eagle, 1956; Katsuta *et al.*, 1957; Kuroda, 1964). 近年では細胞増殖率の測定には主として Evans *et al.* (1951) により開発された重複培養法を用いた細胞数あるいは核数算定法が用いられている。この方法では細胞を培養器壁より遊離させ細胞懸濁液を調製し、血球計算板あるいは電気式細胞数算定器を用いて細胞数を測定しているが、1本の培養瓶が1回の測定に用いられるため、細胞数の継時的変化を追跡するためには多数の培養を行う必要がある。また、細胞懸濁液の調製法および細胞数測定法に由来する測定誤差が生じやすいことから、十分な精度を得るためには各測定点についても複数の培養が必要とされる。

われわれはこのような操作上の繁雑さを除去し、測定誤差を少なくすることを目的として、培養器壁に附着している細胞の増殖を継時的に測定する方法を考案した。本法は同一の細胞の増殖を継続して観察することができ、方法が簡便であるばかりでなく、他の実験

との複合が容易であるという利点を有している。

ここでは本法を用いてまず細胞の増殖に及ぼす細胞濃度の影響について調べ、細胞まき込み濃度を決定した。ついで、培養液成分による影響を明らかにするため、無血清培地および平衡塩類溶液中での細胞の増殖あるいは生存を調べた。さらに、脂溶性化合物添加の際の溶剤となりうる両性溶媒の検索を目的として、細胞凍結保護剤として用いられているジメチルスルホキシド (DMSO) の細胞毒性について調べ、その添加条件について検討した。

実験材料および方法

細胞の培養: Rat fetal lung (RFL) 細胞は10% 仔牛血清 (千葉血清研究所製) および0.029% L-グルタミンを添加した Eagle MEM 培地 (日水製薬, No. 1) を用いて継代した。細胞の洗浄には Dulbecco の平衡塩類溶液 (Dulbecco and Vogt, 1954) から CaCl_2 を除いたりん酸緩衝液 (PBS, 1/ 中に NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g, Na_2HPO_4 1.15 g および KH_2PO_4 0.20 g を含む; pH 7.4) を用いた。細胞の剥離には結晶トリプシン (持田製薬製) を 200 HUM (Hemoglobin Unit of Mochida) 1 ml の濃度に

PBS に溶解したものをを用いた。他の試薬はすべて和光特級を用いた。

細胞増殖曲線の作製：トリプシン処理により集めた細胞を培地に懸濁し、血球計算板を用いて細胞数を測定して必要とする濃度の細胞懸濁液を調製した。この懸濁液を MA-30 角型培養瓶にまき込み、一夜培養して細胞を附着させたのち培地交換を行い、浮遊細胞および細胞の破片等を除去した。次に培養瓶の細胞附着面の外側に内径 1 mm の円を貼り付け、位相差顕微鏡を用いて円内の細胞数を継続的に測定した。

各試験区ともに 5 点測定し、測定開始時の細胞数に対する倍加率を各点について計算し、その平均値および標準偏差を求めた。

結果および考察

1. 細胞の増殖に及ぼす細胞濃度の影響

0.4~4.0×10⁴ 個/ml の細胞懸濁液を調製し、その 5 ml を MA-30 型培養瓶にまき込み、一夜培養して細胞を附着させた。測定開始時における円内細胞数の平均値 および 標準偏差を Table 1 に示したが、まき込み濃度 2.4×10⁴ 個/ml 以上では標準偏差は平均値の 20% 以内であったのに対し、その割合は細胞濃度の減少とともに増大し、0.4×10⁴ 個/ml では 50% 以上の値を示した。このような部域差は主として培養瓶の底面が完全な平面でないため、中央部の細胞濃度がやや高くなることに起因している。細胞塊の存在もまたこのようなばらつきの原因となるため、細胞の分散は十分に行う必要があった。この結果は細胞濃度が高い程均一な細胞分布が得られることを示すものであった。

Table 1. Cell numbers in circles at the beginning of cell counting.

Cellular concentration at inoculation (×10 ⁴ cells/ml)	Cell numbers in circles at the beginning of cell counting
0.4	9.2 ± 4.8
0.8	13.8 ± 4.9
1.6	28.8 ± 6.5
2.4	40.6 ± 7.6
3.2	58.2 ± 10.7
4.0	81.6 ± 11.4

この円内細胞数を継続的に測定し、測定開始時の細胞数に対する倍加率を各測定点について求め、その平均値および標準偏差を計算した。Fig. 1 に示した様

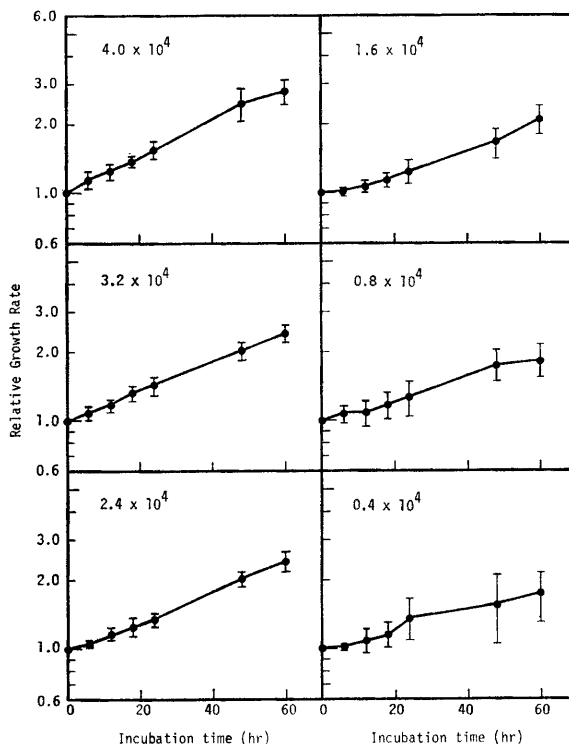


Fig. 1. Effect of cellular concentration on propagation of RFL cells. Trypsinized cells were resuspended in Eagle MEM medium supplemented with 10% calf serum and 0.029% glutamine at various concentrations, then seeded in MA-30 culture flasks and incubated overnight. After a medium change, 5 circles which had an 1mm inner diameter were attached under the flat bottom of flasks and cell numbers in these circles were counted periodically. Cellular concentrations at inoculation were shown at upper side of each figures. Data were treated statistically to calculate average propagation rate and its standard error.

に各時間における細胞倍加率の標準偏差は測定開始時の円内細胞数の標準偏差と同一の傾向を示し、細胞濃度が高い程小さな値を示した。この細胞倍加率の標準偏差は 2.4~4.0×10⁴ 個/ml では平均値の 10% 以内の値を与え、部域差による影響は大きいものではなかった。しかしながら 0.4×10⁴ 個/ml では標準偏差は最大で平均値の 35% に達した。

また、まき込み濃度が高い場合の増殖曲線は良好な直線性を示し、これらの細胞が対数増殖期にあることが明らかであるが、濃度の減少とともに直線性が失われる傾向を示した。培養細胞はまきかえ後数時間で完全に培養瓶の底に附着し、通常約 6 時間後より分

裂像を観察しうるようになる。この間増殖は起こらないが、この分裂開始までの時間は細胞まき込み濃度の減少とともに長くなる。これは細胞分裂を行うためにはトリプシン処理により生じた損傷 (Snow and Allen, 1970) を修復する必要がある、また細胞増殖には細胞自身が分泌する物質が十分な濃度で存在する必要があること (Puck and Marcus, 1955) などによるものと思われる。このような増殖遅延期の存在は低濃度での平均的細胞倍加時間の増大をもたらした。Fig. 2 に示した様に細胞数の増加にともない倍加時間は直線的に減少し、 0.4×10^4 個/ml の 30 時間に対し、 4.0×10^4 個/ml では 19.5 時間であった。

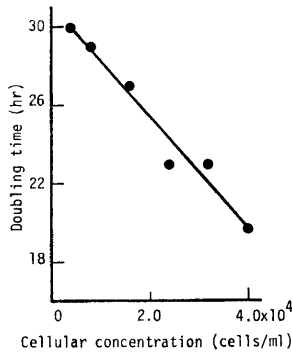


Fig. 2. Effect of cellular concentration on doubling time.

以上の結果はまき込み細胞濃度が高い程測定精度および増殖が良好であることを示している。しかしながら本法では円内細胞数が 200 個をこえると測定困難となるため、測定開始時の円内細胞数は 50 個前後であることが望ましい。この条件に合致するまき込み濃度は 2.4 および 3.2×10^4 個/ml であったが、この濃度領域では測定精度および増殖のいずれにおいても良好な結果を与えた。そこで以後の実験では細胞まき込み濃度は 3.2×10^4 個/ml で行つた。

2. 無血清培地中および PBS 中での細胞の増殖

細胞の増殖には血清をはじめとする天然成分の添加が必要であり、通常 10 ないし 20 名の血清を添加した合成培地を用いて細胞の培養を行っている。しかしながら血清は多くの未知物質を含んでおり、種々の物質の細胞への作用を調べる場合には血清を除去することが望ましい。特に近年では血清は細胞へのホルモンの給源として重要視されはじめており (Hutchings and Sato, 1978)、細胞に対するホルモン作用の研究においては血清の除去は不可欠であるといえる。そこで無血清培地中での RFL 細胞の増殖について検討した。

前述の濃度に細胞をまき、一夜培養後細胞を PBS で 2 回洗浄して血清成分を除去した。ついで無血清培地中で一定時間培養した後、血清を含む通常培地と交換してさらに培養を続けた。Fig. 3 に示した様に、細胞は無血清培地中でも増殖したが、増殖速度は通常培地中の 3 分の 1 に低下し、倍加時間は約 65 時間であつた。この増殖も約 50 時間後には停止し、以後細胞数は減少した。したがって細胞は無血清培地中でも 1 回分裂することは可能であるが、それ以上の分裂には血清成分を必要とするものと思われる。

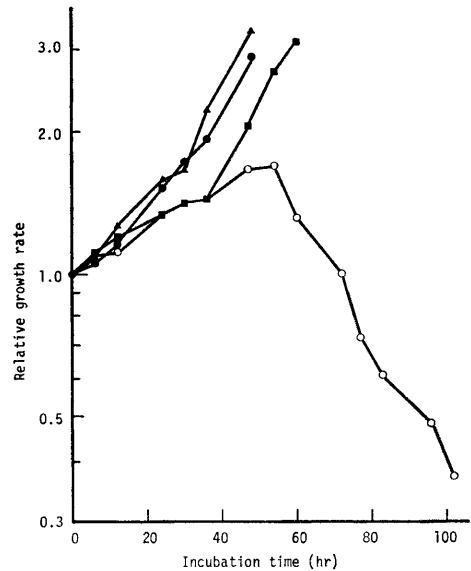


Fig. 3. Cellular propagation in the serum-free synthesized medium. Cells were incubated with the serum-free synthesized medium for 0 hr (●-●), 6 hr (▲-▲) and 24 hr (■-■), or continuously (○-○). Then, the medium was changed with the normal one containing calf serum, and further incubated to count cell numbers. In this figure, standard errors were omitted.

つぎに、24 時間無血清培地中で培養後通常培地と交換して培養を続けると、細胞は培地交換後 12 時間目までは無血清培地中と同様に遅い増殖を示し、その後は通常培地中とほぼ等速度で増殖した。このことは無血清培地中で 24 時間培養を行つた場合でも、細胞増殖能には損傷は生じていないことを示している。また、ここで見られた増殖速度回復における遅れは 12 時間および 6 時間無血清培地中で培養された細胞においても認められており、増殖速度の回復には単に血清成分の取り込みだけでなく、細胞成分の合成が必要で

あることを示唆した。なお6時間処理細胞の48時間後における細胞倍加率は通常培地中で培養したものよりやや低い値を示したが、有意差は認められなかった。

つぎに、同様な方法で PBS 中における細胞の増殖を調べ、Fig. 4 にその結果を示した。PBS は主として細胞の洗浄に用いられる平衡塩類溶液であるが、この溶液中では細胞は生存できず、60時間後には付着細胞数は測定開始時の10%以下に減少した。Fig. 4 には PBS 中で24時間培養後通常培地中で培養した細胞の生存曲線を示したが、この場合も PBS 中で継続して培養した場合と全く同様な細胞数の減少を示し、細胞は修復不能の損傷をうけたものと思われる。一方、PBS 中で12時間培養した細胞は測定開始時の57%まで減少した後増殖能を回復し、6時間培養した細胞は培地交換後6時間の増殖停止のち正常な増殖を行った。したがって糖、アミノ酸、ビタミン等の栄養成分を全く含まない PBS 中では6時間以上の培養を行うと決定的損傷をうけ死滅する細胞が出現することが明らかとなった。

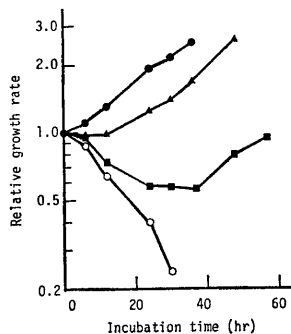


Fig. 4. Cellular propagation in a balanced salts solution, PBS. Cells were incubated with PBS for 0 hr (●—●), 6 hr (▲—▲), 12 hr (■—■) and 24 hr (○—○), and then incubated with the normal medium to count cell numbers.

これらの結果は PBS 中では6時間以内の培養であれば、細胞は生存するが細胞がうける損傷も大きいと考えられ、短時間の処理にのみ有効であることを示唆した。一方、無血清培地中で増殖速度は低下するものの、50時間以内の処理では増殖が可能であり、通常培地と交換することにより再び正常な増殖を行えた。このことは PBS の場合とくらべかなりの長時間にわたり種々の栄養物質が細胞増殖に及ぼす影響について無血清培地中で調べることを示唆している。

3. 細胞の増殖に及ぼす DMSO の影響

われわれは種々の生体成分が細胞に及ぼす影響について検討を行ってきたが (Murakami *et al.*, 1975, 1978 a, b; Yamada *et al.*, 1979), これらの化合物には水溶性のものばかりではなく脂溶性化合物もまた存在しており、細胞毒性の低い両性溶媒が必要であった。DMSO は細胞の凍結における傷害保護剤として用いられており、グリセリンを使用した場合とくらべ、より高い細胞生存率が得られている (Dougherty, 1962)。また DMSO は種々の化合物に対し良好な溶剤であり、細胞への添加用溶剤としてすぐれていると考えられたので、細胞増殖に及ぼす DMSO 濃度および処理時間による影響を調べた。細胞の培養はすべて10%仔牛血清添加培地中で行った。

まず DMSO 処理時間は6時間とし、DMSO 濃度を変えて細胞の増殖を調べた。Fig. 5 に示した様に処理濃度1%では細胞の増殖はやや抑制されたが、非処理細胞との間に有意差は認められなかった。一方、処理濃度2%では明らかに抑制効果が認められ、4%ではわずかながら細胞数の減少が観察され、いずれの場合も明らかに細胞毒性を示した。しかしながら両試験区ともに DMSO 除去後は非処理細胞と同様に増殖したことは細胞増殖能がこの処理により恒久的な傷害をうけていないことを示唆している。

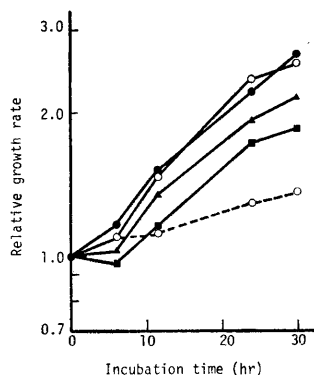


Fig. 5. Effect of dimethyl sulfoxide, DMSO, on cellular propagation. Cells were treated with the medium containing 0% (●—●), 1% (○—○), 2% (▲—▲) and 4% DMSO (■—■) for 6 hr, or 1% DMSO continuously (○··○).

つぎに6時間の処理ではほとんど抑制効果が認められなかった1% DMSO 中で継続して培養を行ったところ、明らかに増殖速度の低下が認められた。このことは DMSO 濃度1%においても処理時間は最少限に

とどめるべきであることを示しているが、30時間の処理後も細胞数の減少は認められないので、細胞死とそれともなう耐性細胞の選択は起つていないものと思われる。したがって必要な場合は1% DMSO 中で30時間以内の処理を行ないうるものと思われる。

以上述べてきた様に本法では種々の条件下における細胞の増殖を簡便かつ高精度で測定することが可能であった。われわれは本法を用いて細胞が無血清培地中でも増殖しうることを明らかにし、さらに1% DMSO 添加培地中でも増殖可能であることを示したが、これらの系は培養細胞の栄養要求性および薬剤耐性の検討において有効であると考えられる。

要 約

従来の重複培養法とくらべ簡便かつ高精度の細胞増殖率測定法を考案し、実施条件について若干の検討を行った。まず細胞濃度の増殖に及ぼす影響について調べ、細胞まき込み濃度は MA-30 型培養瓶を用いる場合は 3.2×10^4 個/ml が適当であることを見出した。つぎに培養液成分の影響について調べ、細胞は無血清培地中でも50時間にわたり増殖能を維持しうることを明らかにした。一方 PBS 中では細胞数の減少が認められなかつたのは初期の6時間にすぎず、細胞の生存は比較的短時間しか可能でなかつた。また DMSO 添加による影響についても検討し、1%、6時間処理では細胞の増殖に殆んど影響を及ぼさなかつたことから、DMSO が脂溶性化合物添加試験において良好な溶剤となりうることを明らかにした。

文 献

- Dougherty, R. M. 1962 Use of dimethyl sulphoxide for preservation of tissue culture cells by freezing. *Nature*, **193**: 550-552
- Dulbecco, R. and M. Vogt 1954 Plaque formation and isolation of pure lines with polio myelitis viruses. *J. Exp. Med.*, **99**: 167-182
- Evans, V. J., W. R. Earle, K. K. Sanford, J. E. Shannon and H. K. Waltz 1951 The preparation and handling of replicate tissue cultures for quantitative studies. *J. Nat. Cancer Inst.*, **11**: 907-927
- Hutchings, S. E. and G. H. Sato 1978 Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **75**: 901-904
- Katsuta, H., H. Endo, T. Takaoka and Y. Oishi 1957 Studies on the growth-promoting substance for fibroblasts in the simplified replicate tissue culture. *Japan. J. Exp. Med.*, **27**: 343-365
- Kuroda, Y. 1964 Studies on cartilage cells *in vitro*. I. Morphology and growth of cartilage cells in monolayer cultures. *Exp. Cell Res.*, **35**: 326-336
- Murakami, H., T. Miyoshi, M. Koga, K. Yamada and H. Omura 1975 Breakage of chromosomal DNA with aromatic reductones. *Agric. Biol. Chem.*, **39**: 795-801
- Murakami, H., K. Yamada, S. Shirahata, K. Shinohara and H. Omura 1978a Intranuclear incorporation and binding to chromosomal DNA of epinephrine. *Agric. Biol. Chem.*, **42**: 45-48
- Murakami, H., K. Yamada, S. Shirahata, H. Nishiguchi, K. Shinohara and H. Omura 1978b Double strand breakage of chromatin DNA in cultured mammalian cells and DNA extracted from λ phage by aromatic reductones derived from adrenalone. *Agric. Biol. Chem.*, **42**: 1019-1023
- Oyama, V. I. and H. Eagle 1956 Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteu). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**: 305-307
- Puck, T. T. and P. I. Marcus 1955 A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **41**: 432-437
- Snow, C. and A. Allen 1970 The release of radioactive nucleic acid and mucoproteins by trypsin and ethylenediaminetetraacetate treatment of baby-hamster cells in tissue culture. *Biochem. J.*, **119**: 707-714
- Yamada, K., H. Murakami, H. Nishiguchi, S. Shirahata, K. Shinohara and H. Omura 1979 Varying responses of cultured mammalian cell lines to the cellular DNA breaking activity of epinephrine. *Agric. Biol. Chem.*, **43**: 901-906

Summary

We devised a new method for measurement of cell propagation rate which was more easy and accurate than the conventional "replicate culture method", and discussed on some experimental conditions. At first, the effect of cellular concentration on propagation was studied to determine the optimum concentration at seeding. When MA-30 culture flask was used, the optimum one was 3.2×10^4 cells/ml.

Then, the effect of medium components was studied and it became apparent that RFL cells could divide at least one time and propagate for 50 hours even in the serum-free synthesized medium. On the other hand, the cells could not propagate but begin to liberate from the glass wall of the culture flask after 6 hour-incubation in a balanced salts solution, PBS. Thus the period of PBS treatment should be restricted within 6 hours.

Furthermore, cellular toxicity of dimethyl sulfoxide, DMSO, was tested to know its permissible concentration. Since the treatment with 1% DMSO for 6 hours had little effect on the propagation of RFL cells, this reagent may be a good solvent in addition tests of water-insoluble substances.