自然形質転換したL細胞(L-N)の増殖制御機構について

岡山大学医学部第一生理学教室（主任：堀　泰雄教授）

松　井　秀　樹

（昭和56年12月5日受稿）

Key words：無血清，細胞増殖制御，
L細胞，形質転換，
DNA合成

緒　　言

動物細胞を生体外で培養する場合，細胞の生存に必要なPH，浸透圧のような物理化学的条件の設定はもちろん，細胞自身が合成できないアミノ酸，炭化水素，ビタミンなどの栄養素をすべて外部から供給しなければならない．さらに，細胞を増殖させるためには，これらの栄養素以外に，未解析の成分を含む血清の添加が必要である．この血清の存在のゆえに，培養系における細胞機能の生化学的，免疫学的解析が複雑で不明確となる．この問題を解決するため，化学的に組成の明らかな合成培地を作成する努力が多くの研究者によりなされてきた[1~5]．しかし，これらの合成培地においても，細胞を増殖させるためには5～10%程度の血清添加を必要とし，さもなければ多種類，多量のホルモン，蛋白成分の添加を必要とする[2,3,7]．

L細胞は，1940年，Earleにより，マウス皮下組織より樹立された線維芽細胞株であり，試験管内で自然発癌した細胞株として有名である[8]．NCTC 929株（L929）は，SanfordらによりL細胞よりクローン分離されて確立された細胞株である[9]．この株はその条件化培地（Conditioned Medium）からのコロニー形成促進因子の精製[26]，細胞増殖制御因子の検定[24]，などに用いられており，また薬剤耐性株，放射線耐性株，温度感受性株，などの変異株が分離され利用されている[16]．L_{929}はよく増殖する細胞株であるが，Eagle's Minimum Essential Medium（以下Eagle's MEM）中で増殖継代するためには，5%程度の血清添加が必要である[3]．

我々は，このL_{929}線維芽細胞を血清存在下で，350代の長期継代をおこなった．その結果，増殖に対する血清依存性を消失し，Eagle's MEM以外に一切の添加物が存在しない状態でも短い平均世代時間で増殖しうる性質を獲得した[25]．

この細胞は，Eagle's MEMのみで増殖しうるため，その細胞機能の解析が非常に容易である．さらに親株との比較により，分裂増殖機構の解析に利用しうる．また，Conditioned Medium中からの物質の精製が非常に容易である等，有用な細胞と考えられる．

この新しい細胞（L-N）の増殖制御における性質を，親株（L-O）と比較しつつ報告する．

材料及び方法

I　細胞

マウス由来線維芽細胞L_{929}株は，1976年5月，岡山大学医学部癌研究施設病理部門，佐藤二郎教授より供与された．この細胞は以下に述べる方法で，350代継代の後実験に供した．（この長期継代後の細胞をL-Nと呼称する）一方，供与されたものと同一の株は，10% Dimethyl Sulfoxide，10%ウシ血清を含有するEagle's MEM（日水）にて，液体窒素下に，岡山大学医学部癌研究施設病理部門において保存された．そして，1981年2月，融解後供与され，3～10代継代後，実験に供した．

II　細胞の継代方法

静置培養した細胞を，0.05％トリプシン(DIFCO)，0.02％EDTA（和光純薬）を含有するPhosphate Buffered Saline（以下TEP液）5mℓで37℃，3分間処理した．ついで，2％Tryptose-Phosphate Broth（以下TPB)，5％仔牛血清（半井化学）を含有する，Eagle's MEMを5mℓ加え，温和に振盪し，細胞を遊離させた．これを1,000rpm 5分遠沈後，上清をとりのぞき，細胞を回収した．培養面積66cm²のガラス製培養瓶（池本理化工業）に，5％仔牛血清，2％TPBを含有するEagle's MEM 10mℓを使用し，80×10^5コの細胞を植込み，一週間ごとに継代を繰り返した．培養は閉鎖系でおこない，37±1℃に保った培養用恒温器を使用した．

III 細胞増殖曲線の測定法

細胞を植込み培養液（Seeding Medium)，すなわち2％TPB，1％仔牛血清を含有するEagle's MEMに浮遊させ，培養用プラスチックシャーレ（面積7.55cm²，豊島製作所)に3×10^4個/シャーレの割合で植込んだ．24時間後，血清を含有しない培養液（Resting Medium以下R.M.)にて3回細胞表面を洗滌し，血清の残存を除いた後，目的の培養液に交換した．その後培地交換はせず，約24時間ごとにTEP液で細胞を浮遊化し，Coulter Counter（Coulter Electronics INC. USA）で細胞数を計測した．

IV DNA合成の測定

DNA合成は，Rudlandの方法[10]によって測定した．Seeding Mediumに浮遊させた細胞を，28cm²プラスチックシャーレに4×10^5個/シャーレの割合で植込み，細胞が互いに接触するまで増殖させた後，培養液をRMに交換し，72時間保ち休止状態にし，細胞周期を準同調させた．その後目的の培養液に交換しS期を誘導した．一定時間ごとに^{3}H－Thymidine（New England Nuclear)による20分間のパルスラベルをおこない，酸不溶性画分への放射活性のとり込みを，シンチレーションカウンター（Aloka)にて測定した．

実験はすべてtriplicateにて行い，その平均値をグラフ上に記した．

結 果

I．増殖速度

L_{929}細胞2～10代継代株（L-O）の増殖速度は培養液に添加する血清濃度に強い依存性がみられた（Fig. 1）．その平均世代時間を算定する

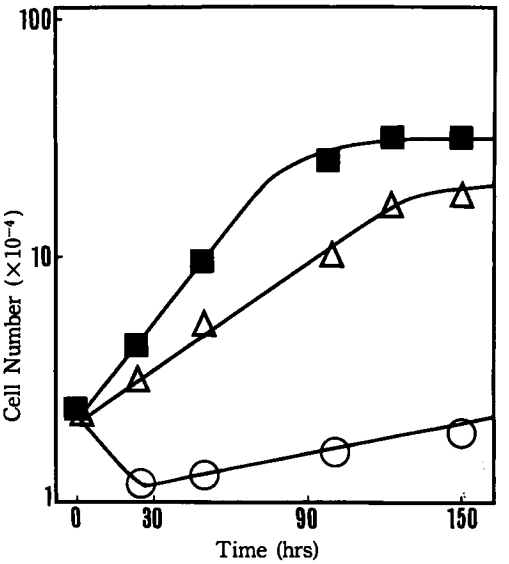

Fig 1. Growth curve of L-O cell:
The experimental conditions in Fig 1 and 2 are described in Materials and Methods. Medium change were done at O time. Data are expressed as total cell number in 30mm plastic dish.
(■—■) Eagle's MEM supplemented with 5% calf serum
(△—△) 1% calf serum
(○—○) serum free
All medium were supplemented with 2% tryptose phosphate broth.

と，仔牛血清濃度5％で22時間，1％で35時間（いずれもTPBを2％含有)，無血清でTPBのみ含有させた場合，180時間と延長した．(Table 1）そして，添加物を一切加えないEagle's MEMのみの場合，細胞は球形化し全く増殖しなかった．一方，L_{929} 350代継代細胞（L-N）の場合，血清依存性が非常に低かった(Fig. 2)．その平均世代時間は，5％，1％いずれの血清濃度でも，17時間であり，L-Oに比べ非常に短縮していた（Table 1）．さらに，無血清でTPB 2％のみ添加時にも平均世代時間は20時間，Eagle's MEMのみの場合にも23時間と，制限された栄養状態でも非常に良い増殖を示した

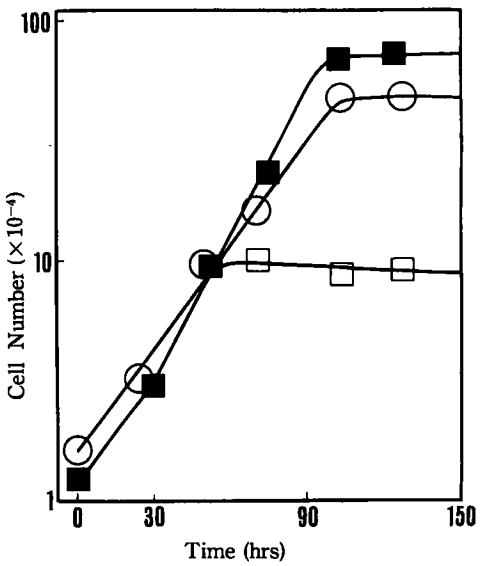

Fig. 2. Growth curve of L-N cell:
The experimental conditions are same as in Fig. 1.
(■—■) Eagle's MEM supplemented with 5% calf serum
(○—○) serum free
(□—□) serum and TPB free
The data in serum and TPB free system were same as serum free system from 0 time until 50 hours, so they were omitted.

Table 1. Mean generation time (M.G.T.) and saturation density (S.D.) of L-O and L-N in different culture medium

Supplementation Serm(%)	TPB	M.G.T.[h] L-O	L-N	S.D./dish [x10⁵] L-O	L-N
5	+	22	17	3.0	7.2
1	+	35	17	2.0	6.4
0	+	180	20	0.2	5.0
0	−	NG	23	NG	1.0

The experimental conditions are described in Materials and Methods.
NG: no growth

(Table 1).

II. 飽和密度

一般に，細胞が形質転換し，高い増殖能を有するようになると，飽和密度が高くなり，重層して増殖する傾向を示す[13]．L−Oの飽和密度は血清濃度に強く依存した（Table 1）．また，2％TPBのみでは高い飽和密度に到らず，5％血清存在時の1/20に低下した（Table 1）．一方，L−NはL−Oに対して2.5〜3倍の高い飽和密度を有し，しかも血清依存性が低く，血清濃度を1％に下げても5％血清添加時の90％の飽和密度を有した．さらに無血清にしても70％の飽和密度を保った．しかし，TPBも無添加にすると，飽和密度は添加時の1/5になった(Table 1)．

以上の結果から，L−NはL−Oに比べて明らかに高い増殖性を有し，その増殖性を維持するための血清依存性が低いことが示された．

III. 細胞植込み時の培地による影響

静置培養において，植込まれた細胞はまず基質に付着する過程を経る．この過程は植込み後6〜7時間程度で完了し，この時期に付着しなかった細胞は増殖できず死滅する．したがって，植込み時の諸条件に対する細胞の反応を検討することは重要である．このために以下の実験をおこなった．すなわち，L−N細胞を1％，0.1％，0％の血清濃度で3×10⁴/シャーレの細胞を植込み，24時間後細胞表面を3回洗滌の後，無血清培養液に交換した．Fig. 3に示したごとく，無血清培養液に交換した時点での細胞数(初期密度：Initial density）は植込み時の血清濃度に依存した．さらに培養液交換後の増殖速度も植込み時の血清濃度に依存した（Fig 3）．

IV. 植込み細胞密度による影響

無血清培地への培地交換後のL−Nの増殖速度が，植込み時の血清濃度の影響を受ける現象について，次の2つの原因が考えられる．①植込み培養液に含有させた血清の何らかの因子が無血清培養液に交換した時点ですでに細胞表面に付着するか，細胞内にとり込まれており，その効果があらわれた．②血清の存在により細胞の生殖率（plating efficiency)が上昇し，したがってinitial densityが高くなり，その結果増殖速度が速くなった．この問題を解決するためには，まったく同一の植込み培養液を使用し，植込む細胞数のみを変化させた場合，増殖速度がどのように変化するかを測定すればよい．そこで，次の実験をおこなった．すなわち，植込み培養液をEagle's MEMのみとし，細胞数を変化させて，生着率，初期密度，平均世代時間を測定した．Table 2のように，3×10⁴個/シャ

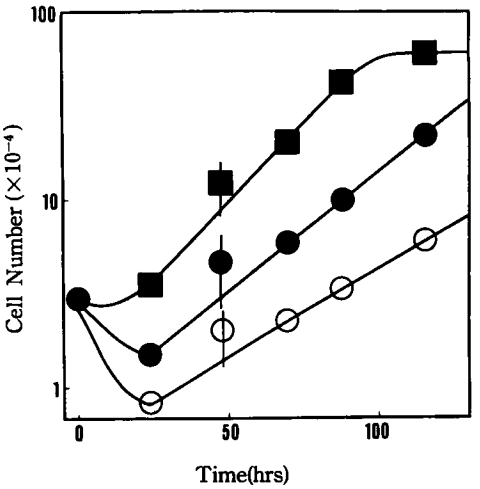

Fig. 3. Effect of seeding condition on the growth of L−N cell after medium change:
Cells were seeded with various medium at 0 time. 24hours after seeding, cells were rinsed three times and medium was replaced with serum free one.
(■—■) seeded with 1% calf serum
(●—●) 0.1% calf serum
(○—○) serum free
Mediums were supplemented with TPB.

Table 2. Effect of cell number seeded on plating efficiency (P.E.), initial density (I.D.) and mean generation time (M.G.T.)

Cell Number ($\times 10^4$)	P.E. (%)	I.D. ($\times 10^3$)	M.G.T. (h)
3.0	2.3	0.7	34
15	9.6	15	19

I.D. (Initial Density) was counted 24hrs after seeding.
Seeding medium was Eagle's Minimum Essential Medium only.
Plating efficiency (P.E.) = Initial density (I.D.)/ Cell number seeded.

ーレの少数植込み時には，初期密度が非常に低く，この時平均世代時間は34時間で，Table 1 における MEM のみの培養液中での23時間に比して1.5倍に延長していた．しかし，15×10^4個/シャーレに植込み，初期密度を増加させると，平均世代時間は19時間と約1/2に短縮した．このことから②の考えが支持された．

V．DNA 合成の速度論的解析

次に，L−N と L−O の S 期 DNA 合成の誘導が血清によりどのように影響を受けるかを検討した．Assay は材料と方法の項で述べた方法によっておこなった．Fig. 4 のように，L−O で

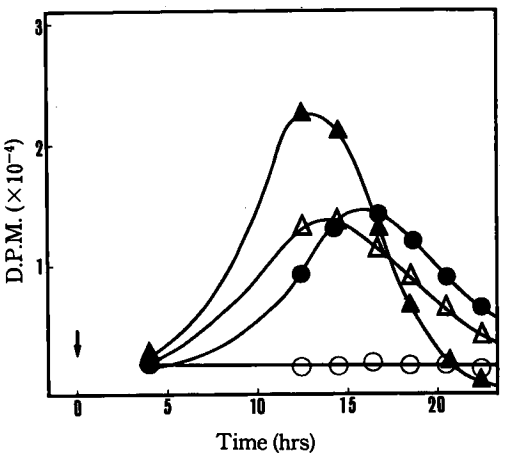

Fig. 4. Kinetical analysis of DNA synthesis of L−N and L−O cells:
The experimental conditions are described in materials and methods.
Medium change after 72hours resting was done at 0 time.
(▲—▲) L−N in calf serum supplemented medium.
(△—△) L−N in serum free medium
(●—●) L−O in calf serum supplemented medium
(○—○) L−O in serum free medium

は，同調後5%血清添加培養液に交換することにより，15～19時間後に DNA 合成が誘導された．しかし，無血清培養液では DNA 合成はおこらなかった．一方 L−N では，血清非依存性に DNA 合成が誘導された．DNA 合成は，培養液交換後11～15時間におこり，L−O に比べ約4時間短縮していた．その最大値は，血清添加系の方が，非添加系より高かった．

考　　察

L_{929} 線維芽細胞株を長期継代培養し，形質転換した細胞（L−N）の増殖制御における性質を，対数増殖期における増殖速度，飽和密度，植込み時の条件，細胞周期における G_1 期から S 期への誘導について，親株（L−O）と比較しつつ研究した．

哺乳動物細胞の細胞培養液には，L 細胞を検

体として開発されたものが多い[2,14,22]．Eagle's MEMは，透析血清を添加することを前提として開発された培地であり，L細胞でも最大限の増殖を得るためには，5％以上の血清の添加が必要であるとされている[3]．このことは，今回我々の実験でもL−Oについて確認された（Fig. 1）．一方L−Nでは，20〜23時間の平均世代時間で増殖させるためには，血清もTPBも要しないことがわかった（Fig. 2）．MerchantとHellmanはL_{929}の亜株で，無血清培養液で増殖するL−M株を報告している[18]．しかし，この株は無血清培地では増殖が極めて遅く，平均世代時間56時間である[18]．また，Katsutaらが報告している$L-P_3$でも世代時間は40時間以上である[19]．しかし，L−Nはこれらに比して，無血清状態での増殖速度が2倍近く速く，平均世代時間は20〜23時間であった．したがって，L−NはL−Mや$L-P_3$より強い増殖力を有しているといえる．

Table 1のように，飽和密度はL−Oに比してL−Nが2.4〜3.2倍高値を示した．しかも，2％TPBを添加することにより無血清でも，血清添加時に近い高い密度を得ることができた．しかし，Eagle's MEMのみでは飽和密度が1/5になった．これは，培地成分の栄養素のいずれかが消費されたために増殖が止ったと考えられる．この成分は血清，TPB中には豊富に含まれており，したがって高い密度に到るまで細胞が増殖しうると考えられる．

植込み時の条件については，無血清培養液で植込むと，L−N細胞の生着率が低いことがわかった（Fig. 3）．植込み時の血清の効果はTPBでは置換できなかった（Fig. 3）．細胞植込み時の血清の役割については，①細胞分散に用いたトリプシンが細胞表面に付着して細胞の生着を防げているが，血清中のトリプシンインヒビターがこの作用を阻止する[21]，②血清中のフィブロネクチン，フェトインらの因子が直接細胞の生着伸展をうながす[21)26]，等が考えられている．しかし，今回の実験からは，L−Nの植込み時に血清がどのような作用をおこなっているかについて，明確な結果を得ることはできなかった．

Table 2により，細胞の増殖速度は細胞密度の影響を受けることが示された．これは，無血清培地で植込んでも，植込み細胞数を増加させ初期密度を高くすれば，血清添加時と同様の増殖速度を得ることができるという結果によって示された．この結果は，L−Nを無血清培養液で継代する場合，植込み細胞数を増すことによって効率よく増殖させうることを示唆している．

細胞の増殖速度は主にG_1からS期への誘導過程（G_1−S変換期）において制御されている[27]．Fig. 4に示されたように，G_1期からS期への導入がL−NではL−Oに比べ4時間速い．すなわち，細胞周期においてこの部分の回転速度が速くなっている．これがL−Nの増殖速度がL−Oに比べて早い理由の一つだと考えられる．

現存までに，Eagle's MEM以外の他の培地を用いて，無血清でL細胞を増殖させたといういくつかの報告がある[14,22,17]．しかし，この場合の培地にはEagle's MEMに比べて，多種多量のアミノ酸，蛋白，ビタミン類が添加されていた．さらに長期間をかけて除々に血清濃度を下げ，適応させてゆく操作が必要であった[15,17]．L−N細胞では，350代以上5％仔牛血清存在下で継代培養しており，適応（Adaptation）ではなく，長期継代による，自然形質転換（Spontaneous transformation）をおこしたと考えられる[23]．

今後，L−N細胞からのクローン分離による均一な細胞株の樹立と，染色体分析による変異の同定が必要と思われる．

結　　語

1）L−Oの増殖速度は血清濃度に依在した．一方L−Nの増殖速度は血清非依存性であり，L−Oの速度より速かった．

2）L−Nでは，2％TPB添加により，血清添加時と同様の高い飽和密度を得た．

3）無血清培地中でのL−Nの増殖速度は，初期細胞密度の影響を受けた．

4）L−Nでは，G_1期からS期への細胞周期の回転に要する時間が，L−Oに比べ4時間短縮していた．これが，L−Nの増殖速度の早い原因の1つと考えられた．

謝 辞

稿を終わるに当り，御指導いただいた堀 泰雄教授ならびに香川医科大学生理学講座畠瀬 修教授に深く感謝致します．種々御協力を頂いた第一生理学教室教室員各位，ならびに香川医科大学生理学講座各位に感謝いたします．

本論文の要旨は，第40回日本癌学会総会において発表した．

文 献

1. Morgan, J.F., Campbell, M.E. and Morton, H.J.: The nutrition of animal tissues cultivated in vitro. I. A survey of natural materials as supplements to synthetic medium 199. *J. Natl. Cancer Inst.* **16**, 557−562, 1955.
2. Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* **122**, 501−504, 1955.
3. Eagle, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130**, 432−437, 1959.
4. Healy, G.M. and Parker, R.C.: An improved chemically defined basal medium (CMRL-1415) for newly explanted mouse embryo cells. *J. Cell Biol.* **30**, 531−538, 1966.
5. Morton, H.C.: A survey of commercially available tissue culture media. *In Vitro* **6**, 89−108, 1970.
6. Puck, T.T., Cieuciuria S.J. and Robinson, A.: Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**, 945−956, 1958.
7. Barnes, D. and Sato, G.: Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* **22**, 649−655, 1980.
8. Earle, W.R., Schilling, E.L., Stark, T.H., Straus, N.P., Brown, M.F. and Shelton, E.: Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **4**, 165−212, 1943.
9. Sanford, K.K., Earle, W.R. and Likely, G.D.: The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **9**, 229−246, 1948.
10. Rudland, P.S.: Control of translation in cultured cells; Continued synthesis and accumulation of messenger RNA in nondividing cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 750, 1974.
11. Temin, H.M.: Stimulation by serum of multiplication of stationary chicken cells. *J. Cell Physiol.* **78**, 161, 1971.
12. Aaronson, S.A. and Todaro, G.J.: Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. *Science* **162**, 1024−1026, 1968.
13. Wolstenholme, G.E.W. and Knight, J.: *Growth Control in Cell Cultures. A Ciba Foundation Symposium,* Churchill Livingstone, Edinburgh and London 1971.
14. Parker, R.C., Caster, L.N. and McClloch, E.A.: Altered cell strains in continuous culture. A general survey. *N. Y. Acad. Sci.* **5**, 303−309, 1957.
15. McQuilkin, W.T., Evans, V.J. and Earle, W.R.: The adaptation of additional lines of NCTC clone 929 (strain L) cells to chemically defined protein-free medium NCTC 199. *J. Natl. Cancer Inst.* **19**, 885−907, 1957.
16. 大野忠夫：L株，L cells: Its history and characteristics. 組織培養，**6**，85−91，1980.
17. Kuchler, R.J. and Merchant, D.J.: Rropagation of strain L (Earle) cells in agitated fluid suspension cultures. *Proc. Sco. Exp. Biol. Med.* **92**, 803−806, 1956.
18. Merchant, D.J. and Hellman, K.B.: Growth of L-M strain mouse cells in a chemically defined medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 194−198, 1962.
19. Katsuta, H. and Takaoka, T.: Amino acid requirements of a substrain of strain L cells (mouse

fibroblasts) in protein-free chemically defined synthetic media. *Jpn. J. Exp. Med.* **30**, 235−259, 1960.

20. Higuchi, K.: An improved chemically defined culture medium for strain L mouse cells based on growth responses to graded levels of nutrients including iron and zinc ions. *J. Cell Physiol.* **75**, 65. 1970.
21. Wallis, C., Ver, B. and Melnick, J.L. : The role of serum and fetuin in the growth of monkey kidney cells in culture. *Exp. Cell Res.* **58**. 271, 1969.
22. Evans, V.J., Bryant, J.C., Fioramonti, M.C., McQuilkin, W.T., Sanford, K.K. and Earle, W.R.: Studies of nutrient media for tissue cells in vitro. I. A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cells. *Cancer Res.* **16**, 77, 1956.
23. Sato, J., Namba, M., Usui, K. and Nagano, D.: Carcinogenesis in tisse culture, VIII. Spontaneous malignant transformation of rat liver cells in long-term culture. *Jpn. J. Exp. Med.* **38**, 105−118, 1968.
24. Kuramitsu, M., Matsui, H., Tokuda, M. and Hatase, O.: Factors inhibiting cell proliferation in rat liver cytoplasm. *Acta Med. Okayama* **36**, 1982 (in press).
25. Matsui, H., Tokuda, M., Itano, T. and Hatase, O.: Establishment and characterization of spontaneously transformed L_{929} cell line (L-new) and comparison with original one. *Proc. Jpn. Cancer Assoc.* **40**, 200, 1981.
26. Stanley, E.R. and Heard, P.M.: Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J. Biol. Chem.* **252**, 4305−4312, 1977.
27. Smith, J.A. and Martin, L.: Do cells cycle? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **70**, 1263, 1973.

On the proliferation regulatory mechanism of spontaneously transformed L cell(L-N)

Hideki MATSUI

First Department of Physiology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Y. Hori)

1) The L-0 cell absolutely required serum for proliferation, but L-N cell grew rapidly in serum free medium.

2) L-N cell cultured in MEM medium with TPB reached high saturation density as in serum containing medium.

3) The growth rate of L-N cell in serum free medium was dependent on initial density of cell population just before logarithmic growing phase.

4) L-N cell rounded cell cycle from G-1 phase to S phase 4 hours faster than L-0 cell.