

# 細胞増殖抑制物質の検定系の検討 及びL細胞に及ぼす肝コルニンの効果

岡山大学医学部第一生理学教室

土 井 昭 孚 ， 稲 葉 耕 三，西 田 勇

(昭和50年12月16日受稿)

## 緒 論

我々の教室では各種動物組織から、細胞分裂抑制物質コルニン等を抽出し、その精製に努力を払っているが、精製の各段階における精製度の検定を、ウニ受精卵の分裂抑制や、哺乳動物細胞の重複培養による細胞数の増加抑制を指標にしている<sup>1)</sup>。精製過程にある細胞増殖抑制物質の検定には、ミンスケールの系が時間的にも経済的にも有効であることは自明であり、この系を確立させるため、通常用いられている重複培養法を検討し、かなり再現性の高い結果を得る培養方法を開発することができた。この方法を用いて調べた肝コルニンの増殖抑制効果の成績を併せて報告する。

## 実験材料及び方法

ラット肝臓コルニンの抽出；若い成体のラットより肝臓を摘出後、直ちに冷凍庫（-20℃）に保存し、数ヶ月以内に解氷し、ホモゲナイザー（ガラス及びテフロン）で細分解した後、細胞分画法により核及びミトコンドリア分画を除いた上清を、コルニン分画法<sup>2)</sup>により70~90%のエタノールで沈殿する沈渣をアセトン粉末にし、低温室のデシケーター中に保存した。このコルニンをラット肝臓上清コルニン（RLSC）と名称した。

細胞及び培養方法；L 929 細胞は、岡山大学医学部付属癌源研究施設病理部門（佐藤二郎教授）より入手し、約2ヶ月我々の教室で継代培養した後実験に用いた。この細胞の対数増殖期での doubling time は18~24時間（平均20時間）であった。

細胞はあらかじめ角瓶に100~150万/10ml 植え込んでおき、3~4日後に confluent になった細胞にTEP（トリプシン0.05%，EDTA 0.02%を含むリン酸緩衝塩類溶液）を37℃、10分間処理して細胞をはがし、GM（MEMに10%牛血清を加えた培養液）を

等量加えてトリプシン活性を停止させ、1,000回転、3分の遠沈操作で細胞を集め、GMに再浮遊させ、培養試験管に重複培養した。重複培養は実験成績や考察においても述べるように、培地1mlの簡便な直立静置培養法を用いて行った。

Cell counting；細胞数はCoulter counter（Model D改良型）を用いて計測した。培養液は捨て、充分量のPBS（-）（リン酸緩衝塩類溶液よりMg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>を除いた溶液）で洗った後、cold-TEPを加え氷水中に静置し、細胞数計測の度毎に、3~6本を37℃、5分間静置して細胞を浮遊させ、更にラバーで温和に強く付着している細胞をはがした。トリプシン処理により細胞塊が生じることはよく知られているが、この方法に従うとそれを防ぐことが可能である。

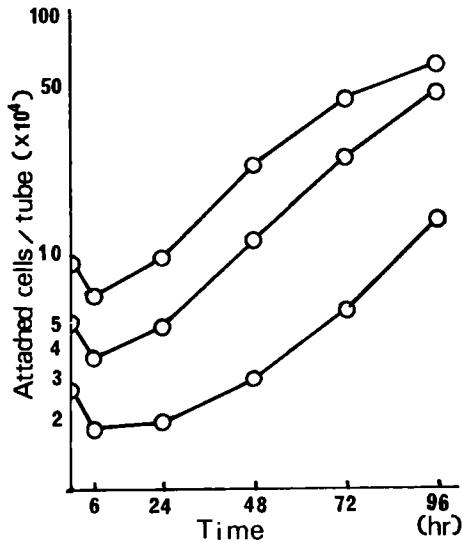
Size distribution；TEP処理により浮遊させた細胞を接眼マイクロメーターで、位相差顕微鏡の下で視野に入る200個の細胞の直径を測定した。更にCoulter counter Model Zを用いて体積分布を調べた。

## 実験成績

図1は通常のリピド培養法（試験管の長さ19cm、培地2ml、5°の斜位静置培養）を用い、異なる植え込み細胞数によるL929細胞の増殖曲線の一例である。図2は培地1mlの直立静置培養による増殖曲線の一例である。増殖曲線は殆んど酷似しているが、直立培養の方が低細胞数で対数増殖期に入る。更に、試験管の長さ（6、11及び19cm）や培地量（0.5、1及び2ml）を変化させても、殆んど同様の増殖曲線が得られる。また、付加法や培地交換法においても殆んど差異は認められない。このことは、0.5~2mlの範囲内では細胞の増殖は培地量にも空気量にも依存しないことを示している。

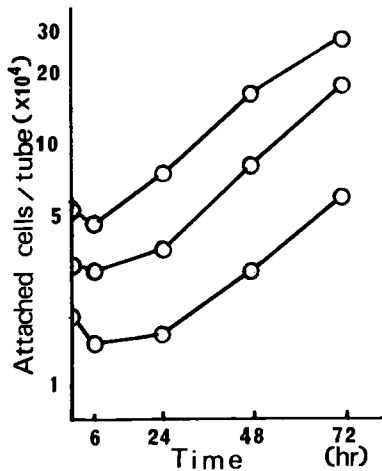
次に、直立培養法を用いてRLSCの付加時期による増殖抑制効果を調べた。0.5%のRLSCを、細胞

図1 通常の重複培養法によるL929細胞の増殖曲線



培養条件：試験管の長さ19cm，培地量2ml，培養角度5°．ほぼ5万の細胞数で対数増殖期に入る．細胞数はCoulter counterで計測した．

図2 直立静置培養法によるL929細胞の増殖曲線



培養条件：試験管の長さ19cm，培地量1ml，培養角度90°．ほぼ3万の細胞数で対数増殖期に入る．細胞数はCoulter counterで計測した．

の植え込みと同時に付加した場合には，細胞の付着率が通常75～80%を示す6時間後においても，約13%程度で0.5% RLSCは細胞の付着を強く阻害し，その後の増殖も阻害した(図3 aの1)．細胞の植込み6

時間後に与えた場合には，細胞数は大巾に減少した(図3 aの2)．24時間後及び48時間後に与えた場合にも同様であった(図3 aの3, 4)．このことは，0.5%のRLSCは，細胞の付着率を低下させるだけでなく，付着細胞に対しても遊離作用を引き起こすことを示している．0.05%の低濃度のRLSCの付加においても，細胞の植え込み6時間後の付着率は僅かに低下する(図3 bの1)．6時間後(図3 bの2)及び24時間後(図3 bの3)に与えてから1日後の0.05% RLSCの増殖抑制率は，夫々45%，53%で，殆んど同じ効果を示した．しかし48時間後の作用では，抑制率は18%に低下した(図3 bの4)．このことは，0.05% RLSCの細胞増殖抑制効果が，増殖誘導期の細胞に対しても，対数増殖初期の細胞に対しても同様であることを示している．

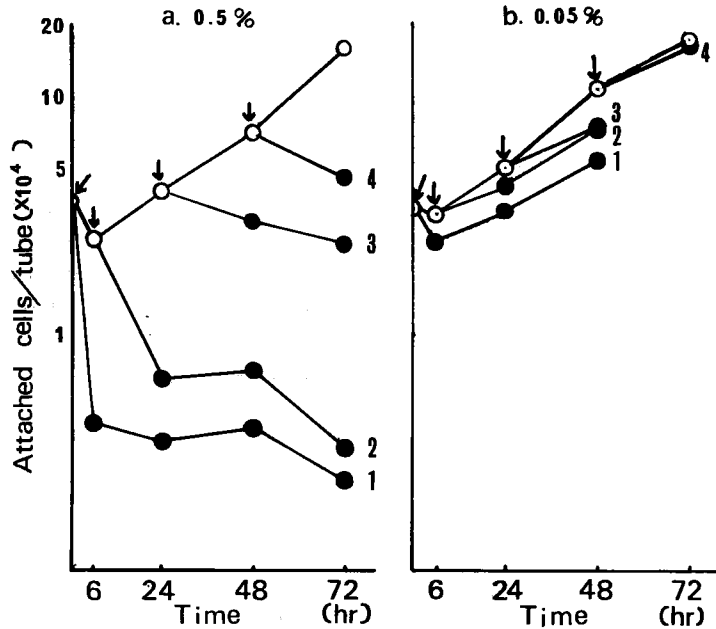
更に，直立静置培養法を用いて，異なる細胞数に対するRLSC 0.05%の増殖抑制効果を調べた．低細胞数(2万)に対して作用させると100%の抑制率を示したが，細胞数を増加させるに従って抑制率は低下した(図4 a)．細胞数と抑制率との関係を片対数グラフにとると直線上に載った(図4 b)．従ってRLSCの増殖抑制効果は細胞数に依存していることを示している．

また，RLSCの細胞体積に及ぼす影響について調べた．図5は，L929細胞のsize distributionである．接眼マイクロメーターを用いて調べた場合，細胞の直径は15 $\mu$ をpeakとして，12.5～17.5 $\mu$ に98%存在した(図5のヒストグラム)．Coulter counterを用いた場合は，体積分布からの換算から，12.5 $\mu$ をpeakとした正規分布が得られる(図5の1)．接眼マイクロメーターを用いた場合には少し大きく測定されている．細胞を球形とみなした場合には，Coulter counterの方が正確な値を示すと考えられるため，L929細胞の直径はほぼ12.5 $\mu$ であり，体積は1,000 $\mu^3$ 前後と考えられる．対数増殖期にある細胞に対して，0.1%及び0.5%のRLSCを作用させた30時間及び48時間後の付着細胞のsize distributionは対照と殆んど差が認められなかった(分布図は省略)が，ガラス面より遊離していた細胞は，かなり小さい細胞であった(図5の2)．

## 考 察

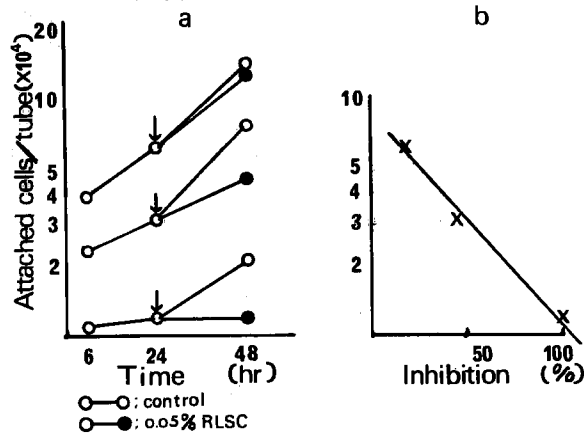
コルニンやカローン等のように，まだ精製の段階にある細胞分裂抑制物質の精製度の判定には，標品の効果をより確実に再現できる検定系の確立が必要

図3 RLSCの付加時期による増殖抑制効果



図中の1, 2, 3及び4は、夫々、細胞の植え込み0, 6, 24及び48時間後に付加したRLSCの増殖抑制効果を示す。(矢印はRLSCの付加を示す) 細胞数はCoulter counterで計測した。

図4 異なる細胞数に対するRLSCの増殖抑制効果



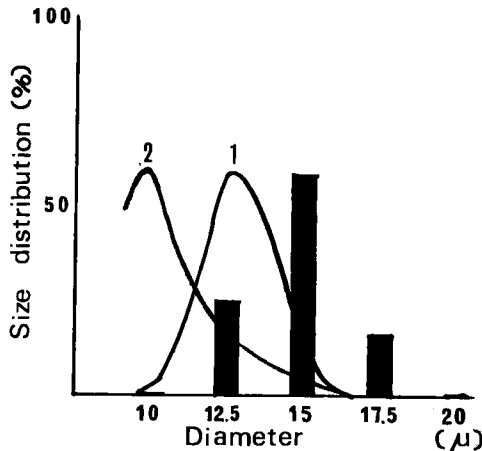
抑制率は低細胞数になるに従って高くなっている。(矢印はRLSCの付加を示す)

であり、できる限りミニスケールの検定系を用いることが、時間的にも経済的にも有効である。

重複培養を試験管を用いて行う場合、通常、培地1.5~2mlに対し細胞数1~10万の植え込みで、5°の傾斜を保って静置培養する方法がとられている。

しかしこの方法では増殖期を長くとれる利点はあるが、色々の悪条件を伴うことが多い。著者等の行った直立静置培養法では、個々の試験管の条件が一定になり、再現性のある結果が得られやすいが、これは通常の方法では起りやすい培地交換の際の試験管

図5 L929 細胞の size distribution



ヒストグラムはマイクロメーターによる測定 (2 expts), 分布曲線はCoulter counter Z type による測定結果を示す。

1; control, 2; RLSC (0.1及び0.5%) の付加により遊離した細胞。

RLSC の付加による付着細胞の size distribution は control と殆んど差は見られなかった。

の回転及び角度のズレが除かれ、細胞密度も全体に均一化していること等によると考えられる。

Ryan 等<sup>4</sup>は、培養瓶を用いて WI 38 細胞の細胞密度と培地量との関係をしらべ、培地量を一定の範囲内で変化させても、対数増殖初期の2日間には影響がないことを報告している。直立培養法においても、内径13mmの試験管を用い、培地量を0.5~2mlの範囲内にとり、植え込み細胞数を3万とすると、定常期には平均40万となり、植え込み1日後から対数増殖期が2日間得られる。一般に哺乳動物細胞の分裂周期が24時間前後であるため、増殖期における標品

の抑制効果を調べる場合には充分である。更に定常期に対する標品の効果を検定する場合にも数日後に可能となり、細胞密度と増殖との関係を解析する場合にも簡便な方法として用いることができる。

この直立培養法を用いて、肝細胞質上清コルニン (RLSC) を作用させる時期の差異による細胞増殖抑制効果を調べたところ、細胞の植え込み6時間後及び24時間後の細胞に対する抑制効果はほぼ同じであった。しかし定常期に近い48時間後ではRLSCの抑制効果は低下した。更に細胞数を変えてRLSCの効果調べると、低細胞数では100%の抑制率を示したのに対し、細胞数を増加させるに従い抑制率は低下した。これらの結果は、RLSCの抑制効果は、細胞の代謝機能が旺盛で、増殖の盛んな時期に強くあらわれることが考えられる。一般に3T3細胞等では代謝が活発な時期に細胞表面に付着したタンパク性の物質は、pinocytosisにより、急速に細胞内に取り込まれる<sup>5</sup>ことが知られており、RLSCの場合もこのような時期によく取り込まれて抑制効果が高まることが示唆される。従って正常組織内に含まれているRLSCが組織内において活動の盛んな細胞に対してより強く作用する可能性を示している。

## 結 論

1. 著者等の確立した直立静置培養法では、低細胞数の植え込みでも正常の細胞増殖が得られ、少量の標品の場合にも抑制効果を検定することが可能である。
2. ラット肝臓細胞質上清コルニン (RLSC) の細胞増殖抑制効果と細胞密度には逆相関性がある。
3. 誘導期にある細胞でも、対数増殖初期にある細胞でも、RLSCの増殖抑制効果に差は認められない。

## 参 考 文 献

- 1) 西田勇, 村上哲英: 日本生理学雑誌, **34**, 131, 1972
- 2) Ohtsuki, H.: Acta Med. Okayama, **28**, 1, 1974
- 3) Nisida, I. and Murakami, T.: Acta Med. Okayama, **19**, 11, 1965.
- 4) Ryan, J. M., Sharf, B. B. and Cristofalo, V. J.: Expl. Cell Res., **91**, 389, 1975
- 5) Nicolson, G. L.: Nature, **251**, 628, 1974

**A convenient assay system for growth inhibitor  
and the effect of rat liver sap cornin on L cells**

**by**

**Akitaka DOI, Kozo INABA and Isamu NISIDA**

**Department of Physiology, Okayama University Medical School, Okayama**

**A convenient system for the assay of the cell growth inhibitor was established, and the inhibitory effect of rat liver sap cornin (RLSC) was examined by this system.**

- 1. In this new stand culture method, normal cell growth is obtained in low cell population and the assay system is useful to examine inhibitor activity in the case of small amount of test materials.**
- 2. The inhibitory effect of RLSC is dependent on cell density.**
- 3. There is no difference in the inhibitory effect of RLSC on the cell growth between lag phase and early log phase.**