

E - スクリーンアッセイにおける播種細胞数の影響

大山 謙一*, 濱岡 あずさ**, 山本 晃代**,
竹内 正博*, 土屋 悦輝*

Effects of Initial Cell Concentration on E-SCREEN Assay

KEN-ICHI OHYAMA*, AZUSA HAMAOKA**, TERUYO YAMAMOTO**,
MASAHIRO TAKEUCHI* and YOSHITERU TSUCHIYA*

The purpose of our study was to find out the optimal experimental condition on E-SCREEN assay using 24-well plates. We comparatively investigated the proliferation patterns of MCF-7 cells plated at different initial cell concentrations. The cells were pre-incubated for 11 days, then plated in 24-well plates at initial concentrations of 10,000, 20,000, 40,000 and 60,000 cells per well, and slightly modified E-SCREEN assay was performed about 17 β -Estradiol and Bisphenol A. The cell proliferative activity and the ratio of cell proliferation to hormone-free control involving no test compound were the highest at initial cell concentrations of 40,000 cells per well. The present study suggested that MCF-7 cells should be plated at an initial concentration of 40,000 cells per well on the E-SCREEN assay with 24-well plates.

Keywords : E - スクリーンアッセイ : E - SCREEN assay , MCF - 7細胞 : MCF - 7 cells , 播種細胞数 : initial cell concentration , 17 β - エストラジオール : 17 β - Estradiol , ビスフェノールA : Bisphenol A

はじめに

ヒト乳癌細胞MCF - 7細胞の増殖を指標としたE - スクリーンアッセイはエストロゲン作用物質の低濃度域での検出に有用な試験法である¹⁾。しかし、エストロゲン作用物質による量作用曲線が他の研究者のものとは必ずしも一致していないことを経験している。このような原因として、継代細胞数、継代日数、前培養日数や播種細胞数等の詳細なプロトコールが明確にされていないということが考えられる。そこで、最適な実験条件を見出す目的で播種細胞数によるMCF - 7細胞のエストロゲン作用物質に対する増殖パターンを比較検討した。

材料及び方法

1. 細胞及び細胞培養条件 :

Tufts 大学 Ana.M. Soto から分与された MCF - 7細胞を使用した。細胞の日常維持には、5%牛胎児血清 (FBS ; Hyclone, Utah), 4 mMグルタミン, 2.24g/L炭

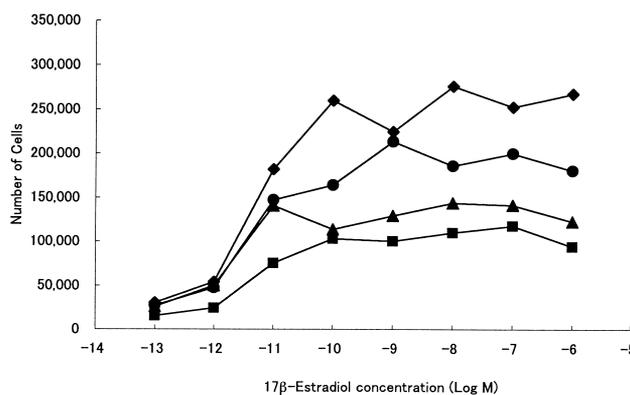


Fig. 1 . Effect of preculture term on proliferation of MCF-7 cells induced by 17 β -estradiol.

The cells were precultured for 7 (○), 11 (●), 14 (△), and 21 days (■).

酸水素ナトリウム, 80 mg/Lカナマイシン, 50 mg/Lゲンタマイシンを加えた FBS 5% DMEM (Dulbecco's

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 東京家政大学家政学部環境情報学科

modification of Eagle medium ; ニッスイ)を使用した .
 5 × 10⁴ 個の細胞を4 mlのFBS 5 % DMEM を入れた25 cm²
 細胞培養用フラスコ (Corning) に入れ , 5 % CO₂ / 95
 %空気 , 37 飽和水蒸気下で培養した . 細胞継代は14日
 毎に行った .

2 . 試験物質 :

試験物質はエストロゲン作用が確認されている17
 - エストラジオール (Sigma, St. Louis) 及びビスフェ
 ノールA標準品 (和光純薬) とし , 全てエタノール
 (99.5%残留農薬用) 溶液とした . 濃度は17 - エスト
 ラジオールでは 1 mM , ビスフェノールAでは培地で希

釈する際析出しない範囲の最高濃度としたために10mM
 とした . 試験物質の希釈及び細胞への添加には , プラス
 チック製器具からのエストロゲン作用物質溶出を防ぐ
 ために , ガラス製のパスツールピペットを使用した .

3 . 血清の活性炭・デキストラン処理による性ステロイ
 ド除去 :

Soto らの方法に準じて実施した²⁾ . すなわち , 使用直
 前に滅菌冷水で2回洗浄した活性炭 (Hydrochloric acid
 washed ; Sigma, St. Louis) で5 %活性炭・0.5 %デキスト
 ラン (Dextran T70 ; Amersham pharmacia biotech,
 Sweden) 浮遊液を作成し , 2,000gで20分間遠沈した .

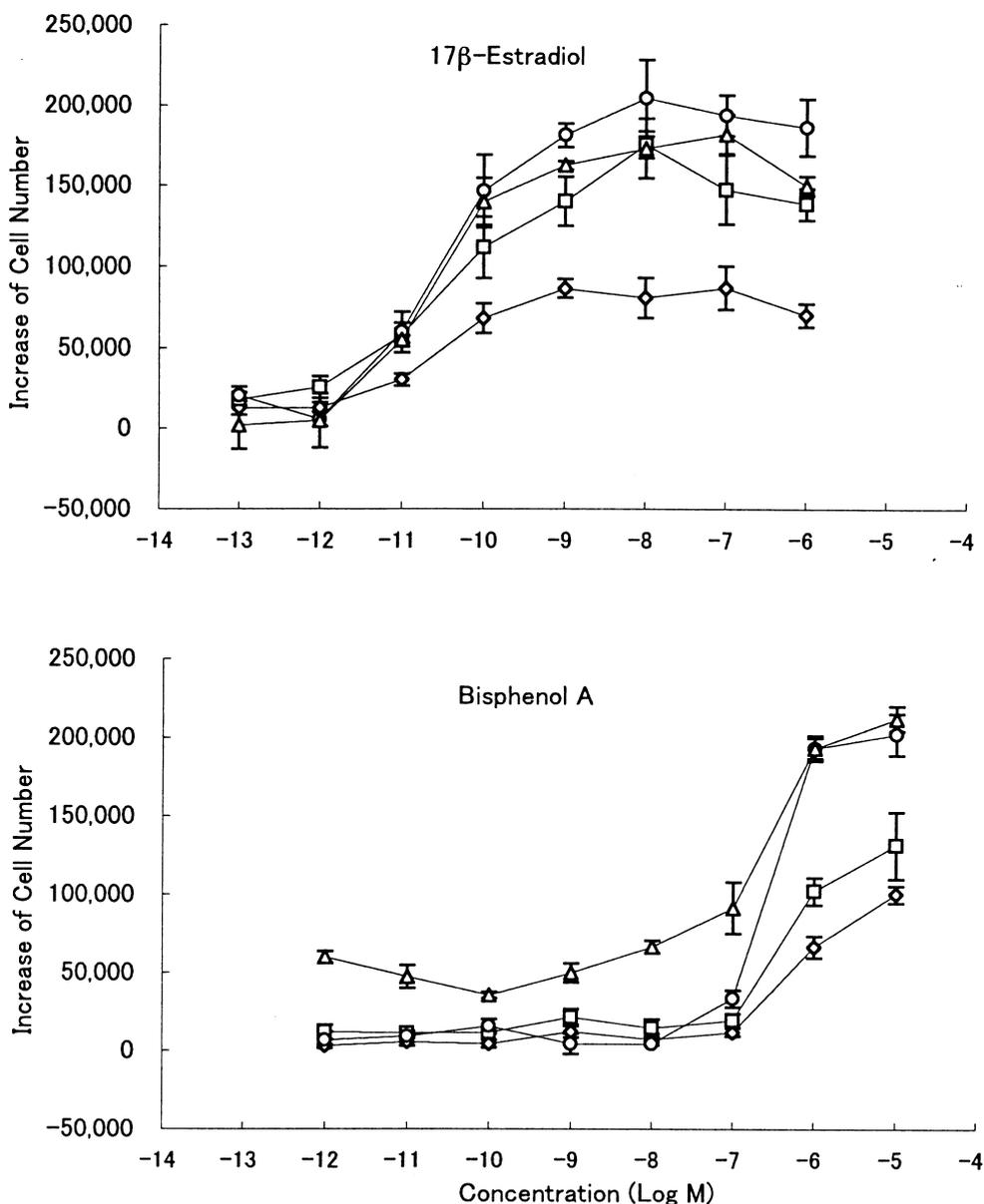


Fig. 2 . Proliferation of MCF-7 cells induced by compounds at each initial cell concentration. Ordinate shows the number of cells subtracted hormone-free control. The cells were plated at initial concentrations of 10,000 (), 20,000(), 40,000(), and 60,000() cells per 24-well. Each point is mean ± SD.

上清を除去後，除去した上清と同量の FBS を加えて 37 で 1 時間振盪攪拌し，浮遊液を 2,000g で 20 分間遠沈した．得られた上清を 0.22 μ m フィルターでろ過し，活性炭・デキストラン処理 FBS (CDFBS) を得た．CDFBS は使用するまで -20 で保管した．

4. E - スクリーンアッセイ :

E - スクリーンアッセイは Soto らが述べている方法²⁾に準拠して次のように実施した．前培養細胞を 0.05 % トリプシン・EDTA 液で剥離し 5 % FBS DMEM で細胞濃度を調整してから 24 ウェルプレートに播種し，20 時間培養して細胞を底面に接着させた．培養後，培地を除去し，フェノールレッド不含の DMEM (Cat. No. 23800-022, Gibco BRL, N. Y.) 8.3g, グルコース 1g, ピルビン酸ナトリウム 0.11g, カナマイシン 0.08g, ゲンタマイシン

0.05g 及び 1.5 M HEPES 8 ml を超純水に溶解して総量 1 L としフィルター除菌した培地 (プレーン DMEM) で 2 回細胞を洗浄し，プレーン DMEM に CDFBS を 5 % , 4 mM グルタミン及び炭酸水素ナトリウム 2.24 g を加えた CDFBS 5 % DMEM 0.9 ml に置換した．これにプレーン DMEM で各種濃度に希釈した試料 0.1 ml を 1 濃度毎 3 ウェルに添加し，6 日間培養した．次に培地を除去し，10 % トリクロル酢酸を加えて 4 で 30 分間静置して細胞を固定し，蒸留水で 5 回洗浄した後乾燥させた．ウェルに 0.4 % スルフォローダミン - B (SRB) 1 % 酢酸溶液 (0.5 ml) を入れて細胞を 10 分間染色した．1 % 酢酸で 2 回洗浄して余分な SRB を取り除いた後乾燥させた．ウェルに 10 mM トリスを加えて細胞に取り込まれた SRB を溶出させ，96 ウェルプレートに移し，マイクロプレー

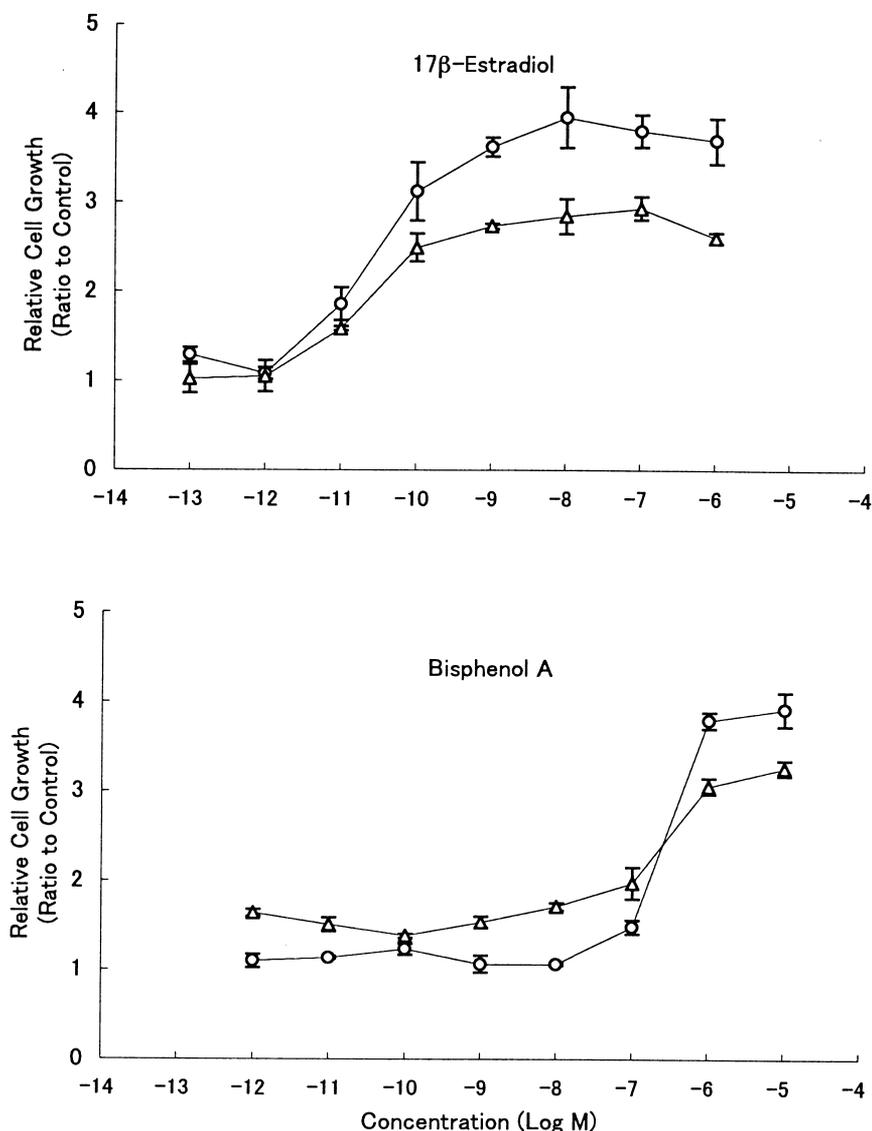


Fig. 3 . Effects of initial cell concentration on proliferation of MCF-7 cells. Control is the cell number above hormone-free control. The cells were plated at initial concentrations of 10,000 (), 20,000 (), 40,000 (), and 60,000 () cells per 24-well. Each point is mean \pm SD

トリーダーで波長570 nmの OD 値を測定し、予め作成しておいた検量線に基づいて細胞数を算出した。

前培養日数：

エストロゲン作用が確認されている17 - エストラジオールについて前培養日数7日, 11日, 14日, 21日の4種類の日程でE - スクリーン アッセイ (播種細胞数20,000個) を実施した結果, Fig. 1 に示すように11日間培養が 10^{-10} M以上の濃度で最も細胞増殖が顕著であったので, 前培養日数を11日とした。

結 果

試験物質を含有しない溶媒のみで培養した時 (ホルモンフリーコントロール) 得られた細胞数は, 播種細胞数10,000 で $16,658 \pm 2613$ 個, 20,000 で $31,118 \pm 5,780$ 個, 40,000 で $69,214 \pm 6,180$, 60,000 で $93,854 \pm 8,270$ 個であった。各播種細胞数における陽性物質濃度と増殖細胞数の量作用曲線をFig. 2 に示した。細胞数はホルモンフリーコントロールで得られた細胞数を除いた数値である。

1. 17 - エストラジオール：

全ての播種細胞数において, 10^{-11} Mから細胞数は増加し始めた。 10^{-10} M以上の濃度では, 得られた細胞数は40,000細胞播種の場合が最も多く, 次いで60,000, 20,000, 10,000の順であった。20,000 及び10,000細胞播種の場合は最高細胞増殖を示す濃度域で40,000細胞播種の場合に比較して有意 ($p < 0.01$) に細胞数が少なかった。

2. ビスフェノールA：

60,000 細胞播種の場合, 10^{-8} Mより増殖傾向が見え始め, 10^{-6} Mで190,000個の最高増殖数に達した。40,000細胞播種の場合は 10^{-7} Mより増殖し始め 10^{-6} Mでは60,000個の場合とほぼ同様の最高増殖数になった, 20,000及び10,000細胞播種の場合は, 10^{-6} Mから増加し始め 10^{-5} Mでも増加傾向が見られ, 正確な最高細胞増殖数は得られなかった。

考 察

E - スクリーンアッセイは細胞増殖を指標にしたアッセイであるから¹⁾, 最高増殖細胞数が多いほうが高感度

であると考えられる。17 - エストラジオール及びビスフェノールAにおいて得られた最高細胞増殖数は40,000及び60,000細胞播種した場合が最も多く, 試験物質による増殖反応が明瞭に示されたと考えられる。ビスフェノールAでの量作用曲線は播種細胞数40,000及び60,000では Andersen ら⁴⁾と同様, 最高細胞増殖に必要な最低濃度が 10^{-6} Mであったのに対して, 播種細胞数10,000及び20,000では 10^{-5} Mまで調べた限りでは正確なエンドポイントを得ることができなかった。24ウェルプレートを使用した場合, 播種細胞数10,000及び20,000では, ビスフェノールAによる細胞増殖は6日間の培養期間では不十分であったと推察される。

播種細胞数40,000及び60,000において, 得られた細胞数のホルモンフリーコントロールでの細胞数に対する比をFig. 3 に示した。17 - エストラジオール及びビスフェノールAとも, 播種細胞数40,000の方が60,000よりも細胞増殖比が高かったことから, より高感度であると考えられる。

今回の実験結果から, 24ウェルプレートでE - スクリーンアッセイを実施するにあたって, 40,000細胞播種で最も適切な増殖パターンが得られることが示唆された。

文 献

- 1) Soto, A. M. : ホルモンアゴニストとアンタゴニストに関する in vitro アッセイ : E - スクリーンアッセイ, 環境庁, 環境ホルモン化学白書'99, 63-68, 1999, 公害対策技術同友会, 東京。
- 2) Soto, A. M., Sonnenschein, C. and Chung, K. L. *et al.* : *Environ. Health Perspect.*, **103** (Suppl 7), 113-122, 1995.
- 3) Villalobos, M., Olea, N. and Brotons, J. A. *et al.* : *Environ. Health Perspect.*, **103**, 844-850, 1995.
- 4) Andersen, H. R., Andersson, A. and Arnold, S. F. *et al.* *Environ. Health Perspect.*, **107** (Suppl 1), 89-108, 1999.