

二価鉄の培養3T3細胞の生存率に及ぼす影響

山本剛禧

要 約

細胞培養レベルでの二価鉄の影響をマウス3T3細胞を用いてコロニー法でみた結果は、細胞播種直後の二価鉄添加（濃度0.5mMで0.75%の生存率）と培地に二価鉄添加後の細胞播種（濃度0.5mMで55%の生存率）で異なった細胞生存率が得られたことから、いずれも単細胞処理後の浮遊細胞に対する影響と考慮して、ディッシュ面への接着後の培養細胞に対する二価鉄の影響を検討した。細胞播種1日後の二価鉄添加では濃度0.5mMで73%の生存率が得られ、上記条件下よりも高率の生存率が認められた。さらに生存の細胞コロニーの径は処理群で短縮がみられ、増殖阻害が明らかに認められた。細胞播種直後の二価鉄添加の生存率曲線から得られた損傷回復が影響されない最低濃度0.25mMでの二価鉄の時間的処理では、1時間処理では統計的に有意差は認められなかったが、3時間、6時間処理で有意差の増殖阻害が認められた。

キーワード：二価鉄，細胞生存率

はじめに

前報で¹⁾、培養細胞のコロニー形成法を用いて、二価鉄 (Fe^{2+}) の殺細胞効果を Fe^{2+} 濃度応答生存率曲線で追求した結果を報告した。細胞を播種直後の Fe^{2+} 添加と Fe^{2+} 添加後の播種で異なった結果が得られ、前者で著しい殺細胞効果が認められた。培地に添加された Fe^{2+} は速やかに酸化され¹⁾、この反応過程に細胞が存在することがより著しい影響を受けることが示唆された。本報では、播種1日後のディッシュに接着した細胞に Fe^{2+} を添加し、その生存率効果を更に検討したので報告する。

実験材料及び方法

細胞はマウス繊維芽細胞由来のNIH3T3細胞を用い、培養は10%仔牛血清加ダルベッコ変法イーグル培地 5 ml, 60mmφ ディッシュで行い、前報¹⁾の培養条件に従った。播種細胞は、 10^5 個播種後2日目の細胞を単細胞化²⁾、使用した。

生存率の測定は細胞数100個を分散播種、1日後ディッシュに接着した細胞に、 Fe^{2+} (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mM)を添加し、培養液を交換せず培養、8日目に固定、染色して行った¹⁾。一群3ディッシュで実験した。染色後のコロニー径をスケールルーペで計測し、統計処理を行った。

Fe^{2+} は硫酸第一鉄アンモニウムを使用直前に溶解し使用した¹⁾。

時間的 Fe^{2+} (0.25mM) 処理は上記同様細胞播種後1日間目に開始し、1, 3, 6時間処理後、2回培養液で洗浄し、培養液を加え培養し、8日目に固定染色し、計測した。

結 果

細胞を播種1日後、ディッシュ面に接着した細胞群に各濃度の Fe^{2+} を添加し、コロニー法による細胞生存率（コロニー数）を判定した結果、その生存率曲線は、図1に示すように、前報¹⁾で報告した Fe^{2+} 添加後の細胞播種でみられた生存率曲線に

類似し、播種直後の Fe²⁺添加で認められた(図1) 生存率に及ぼす Fe²⁺の著しい効果はみられなかった。Fe²⁺0.5mM では72.9%の生存率が示された。

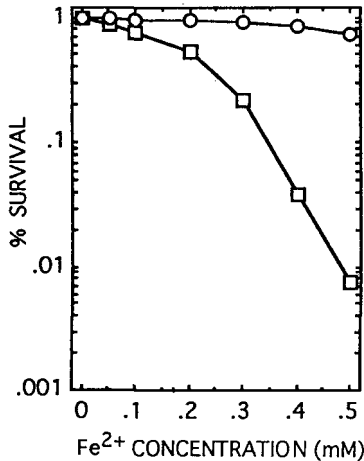


Fig. 1. Effects of various concentrations of Fe²⁺ on the survival of 3T3-cells. ○; Fe²⁺ was added 1 day after cell seeding, □; Fe²⁺ was added immediately after cell seeding.

致死には至らないものの Fe²⁺添加群のコロニーの大きさに著しい差が観察されたことから、コロニー径を計測、比較検討した。コロニー径 1 mm 以上のものを計測、統計処理したが、1 mm 以上のものは培養液交換により、その後の回復増殖が認められた。その結果は図2に示すように、Fe²⁺濃度に依存してコロニー径の短縮が計測された。

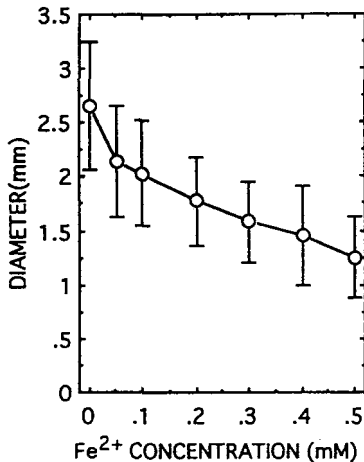


Fig. 2. Colony diameter of cells affected various concentrations of Fe²⁺.

Fe²⁺0.05mM 添加群で明らかな増殖阻害が認められた。Fe²⁺0.5mM 添加群ではその平均径は対照のそれに比し、約50%が示された。

これらの Fe²⁺効果をさらに究明する目的で、細胞を播種後1日目、ディッシュ面に接着した細胞に Fe²⁺ (0.25mM) の時間的処理 (1, 3, 6 時間処理) を試みた。その結果、表1、図3に示すように、コロニー数では処理時間に依存して若干の致死効果の増加が認められた。コロニー径でも差がみられ、計測した結果、その径の平均値は処理時間に依存して短縮がみられ、増殖阻害が認められた。1時間処理群では対照群との間に統計的に有意差はみられなかったが、3, 6時間処理群では明かな有意差が認められた。

Table 1. Effect of Fe²⁺ (0.25mM) treated for various times, in 1 day after cell seeding, on the cell proliferation.

Group	Colony ratio	Diameter of colony (mm)		Prob.: Compare with cont.
		Mean	Std. dev.	
Control	1.000(n=153)	2.708	0.601	
1 hr	0.975	2.665	0.528	0.4766
3 hrs	0.915	2.430	0.561	0.0001
6 hrs	0.882	2.337	0.553	0.0001

Measurement was done on 8 days after cell seeding.

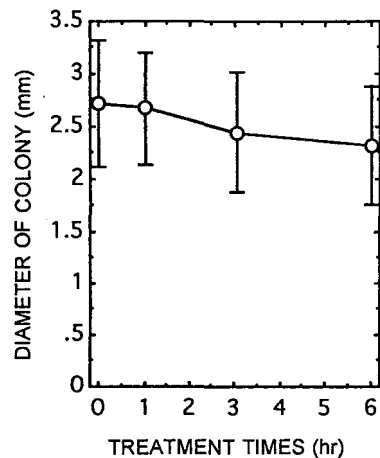


Fig. 3. Diameter of cell colony after the treatment with Fe²⁺ for 1, 3 and 6 hrs in 1 day after cell seeding.

考 察

前報¹⁾で、細胞培養レベルでの Fe²⁺の殺細胞効果を3T3細胞を用いて、コロニー法で生存率曲線

として検討した。その結果、細胞播種直後の Fe^{2+} 添加では著しい殺細胞効果が認められたのに対し、 Fe^{2+} 添加後 3 時間目に細胞を播種したとき、その殺細胞効果は著しく減少した。添加 Fe^{2+} の培地での酸化度合の計測の結果は速やかに 1 分以内でほとんど酸化される¹⁾ ことから、単細胞化処理された浮遊細胞が酸化反応に伴うラジカル反応²⁾ に遭遇することが重要な要件で、その結果損傷を受けた細胞のディッシュ面への接着に影響を及ぼし殺細胞効果が示されていると考えられた。細胞播種直後の Fe^{2+} 添加で $\text{Fe}^{2+} 0.5\text{mM}$ の生存率 0.75% が得られたのに対し (図 1)、ディッシュ面への接着後の Fe^{2+} の本添加実験の結果は $\text{Fe}^{2+} 0.5\text{mM}$ で 73% の生存率が示された。この率は Fe^{2+} 添加後細胞播種群 ($\text{Fe}^{2+} 0.5\text{mM}$ の生存率 55%) よりも大きかった。 $\text{Fe}^{2+} 0.05\text{mM}$ で明かな増殖阻害が認められたが、ちなみに培地には必須元素として $0.25\mu\text{M}$ の硝酸第二鉄が含まれており、添加値は 200 倍に相当する。これらのことは単細胞化処理後の細胞に対する Fe^{2+} の効果がより著しいことを示し、単細胞処理による細胞膜の変化が Fe^{2+} による細胞の致死損傷、例えば Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応による損傷²⁾、に関係していると考えられるとともに、播種 1 日後の細胞はすでに分裂増殖を開始しており、代謝による防御と障害回復機能が考慮される。図 1 にみられる細胞播種直後 Fe^{2+} 添加群の生存率曲線がシグモイド曲線を描くことからからも回復効果 (D_q)¹⁾ が考えられる。

Fe^{2+} 添加直後の速やかなラジカル反応の影響

をみる目的で、細胞接着後の Fe^{2+} (0.25mM , 細胞播種直後の生残率曲線から得られた D_q 値) の時間的処理効果を検討した結果 (表 1), 1 時間処理での生存率は若干の減少がみられたものの、成長コロニー径では有意差はみられず、3 時間処理で増殖阻害の有意差が得られた。このことは Fe^{2+} 添加直後の影響は接着細胞では浮遊細胞ほど著しくなく、その後の Fe^{2+} の影響、多量の Fe の存在で起こるだろう酸化還元に伴うラジカル反応³⁾ が増殖阻害の原因として考えられる。また、1 時間処理で差がみられなかったことは、短時間処理での損傷は回復が速やかであることを示唆する。本実験の $\text{Fe}^{2+} 0.5\text{mM}$ で示された生存率 73% は Fe^{3+} (0.5mM) 添加後の細胞生存率¹⁾ 89% より低率で若干の Fe^{2+} の即時酸化に伴う影響は考慮される。更に詳細な実験が要求される。

文 献

- 1) 山本剛禧：細胞培養における二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究：細胞生残率と血清脂質過酸化物に対する二価鉄と三価鉄の影響。岡大医短紀要 4：61-68, 1993.
- 2) 山本剛禧：細胞培養における二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究：基礎的検討。岡大医短紀要 3：49-53, 1992.
- 3) Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Formation of a thiobarbituric acid reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. The role of super oxide and hydroxy radicals. FEBS Lett. 128: 347-352, 1981.

Effect of ferrous iron on 3T3-cell survival in cell culture

Goki YAMAMOTO

Abstract

Previous reports demonstrated that adding ferrous iron into the culture medium immediately after seeding of cells showed significantly cell killing activity (0.75% survival by 0.5mM ferrous

iron) than the case of the cell seeding after adding ferrous iron. In this report, the effect of an addition of ferrous iron after the adhesion of cells onto the dish, in the condition 1 day after cell seeding, was investigated by the colony method. The dose responded survival curve obtained above condition showed nearly survival curve in the case of the cell seeding after addition of ferrous iron, and 72.9% survival by 0.5mM ferrou iron was estimated. But the colony diameter was shortened depending on the Fe^{2+} doses, the 0.5mM-affected colony showed a half of the diameter of control colony, namely proliferation of the cells was inhibited. The 1 hour treatment with ferrous iron (0.25mM) did not inhibited, but both the 3 and 6 hours treatments inhibited significantly a proliferation of the cells checked by the diameter of colony. The facts suggest that both the oxidation mechanism of ferrous iron, induced radicals, promptly ocured at the time of an addition of ferrous iron into the culture medium and the followed oxido-reductive reactions are concerned in the injury of cells.

Key Words : ferrous iron, cell survival

School of Health Sciences Okayama University