

N-acetoxy-methylaminoazobenzene のクローン化 されたラット肝細胞株に対する影響

岡山大学医学部癌研病理部（主任：佐藤二郎教授）

西山正一・常盤孝義・佐藤二郎

（昭和56年11月26日受稿）

Key words: Ac2F 細胞

ラット肝単個培養株

in vitro 化学発癌

AcMAB

DAB 代謝活性体

結 言

著者らは、アゾ色素によるラット肝細胞癌化機構の解明を目的とした研究¹⁻¹⁴⁾の一環として、すでに肝マイクロゾーム分画¹⁵⁻²³⁾ (S 15 mixture) により代謝活性化された 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) が、3'-Me-DAB 単独投与に比し in vitro で有意に細胞の悪性度を増強させることを報告^{24,25)}した。本研究において我々は、アゾ色素による発癌と代謝との関連を知ることを目的として、DAB の ultimate 型とされている、N-acetyl-methylazobenzene (N-AcMAB) の正 2 倍体単個クローン、Ac2F に対する種々の効果（癌化実験をふくめた）を検討した。

材 料 と 方 法

- (1)細胞：Ac2F 細胞。すなわち 5 ヶ月令の呑竜系のラット肝細胞株 RAL-5²⁶⁾を 1 ヶ釣培養（1 ヶ釣時の培養日数は Primary culture 以後 370 日目）して正 2 倍体性クローンとしたものである。
- (2)培養方法：標準培地としては Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) に、56°C、30 日間非動化した Bovine Serum (BS) を 20% になるように加えた培地を用いた。培地には 100 units/ml のペニシリンGカリウム(明治製薬株式会社)と 100 μg/ml の硫酸ストレプトマイシン

明治(明治製薬株式会社)を添加した。継代は 7 日目ごととし、継代時細胞播種は 60mm のプラスチックシャーレ (Falcon 社)に細胞数が 30 万ヶ/シャーレ になるように調整した。培養は開放系 (37°C, CO₂ 5%, Air 95%) でおこなった。

(3)発癌剤とその濃度

(a)DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma 社) 濃度 0.4%

(b)3'-Me-DAB (3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, 東京化成工業株式会社) 濃度 4 × 10⁻⁴M (80 μg/ml)

(c)AcMAB (N-acetyl-methylazobenzene, 東北大学橋本嘉幸教授恵与)

濃度 { 1 × 10⁻⁴M (低濃度処理の場合)
5 × 10⁻⁴M (高濃度処理の場合)

発癌剤の Ac2F 細胞への処理は Fig. 1. の通り。

(4)実験法

(i)3'-Me-DAB (4 × 10⁻⁴M) と AcMAB (1 × 10⁻⁴M) の Ac2F 細胞の増殖におよぼす効果; Ac2F 細胞を 6 万ヶ/ml の濃度で 35mm のプラスチックシャーレ (Falcon 社)に 1 ml ずつ播種した。3'-Me-DAB ないしは AcMAB を含む培地で培養後、1, 3, 5 日目に培地交換を行ない 7 日目における細胞数をカウントした。

(ii)血清濃度を変えた場合の 3'-Me-DAB (4 × 10⁻⁴M) と AcMAB (1 × 10⁻⁴M) の細胞増殖阻害;

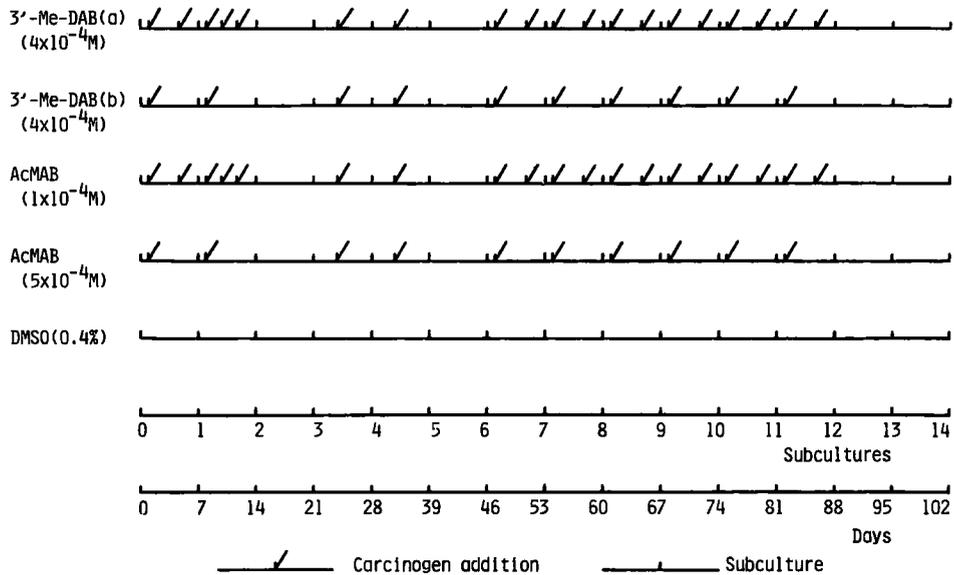


Fig. 1. Treatment of Ac2F cells with 3'-Me-DAB and AcMAB (N-acetoxy-MAB)

Ac2F 細胞を 6 万ヶ/ml の濃度で含む標準培地を 35mm プラスチックシャーレ (Falcon 社) に 1 ml ずつ播種した。血清濃度を 0%, 5%, 10%, 20% と変えた培地に, 3'-Me-DAB ないしは AcMAB を含む実験液で培地交換した 3 日後 (Total 5 日目) における細胞数をカウントした。対照として用いた DMSO (0.4%) 処理の細胞数を 100 とした時の処理群の細胞数の割合 (%) を求めた。

(iii) 動物復元実験 (Back-transplantation) の検討;

生後 24 時間以内の新生児呑竜系ラットを使用し細胞数 100 万ヶ又は 150 万ヶを皮下移植し, 腫瘍形成の有無について 7 ヶ月~10 ヶ月間観察した。

(iv) 細胞形態観察; Fig. 1. 参照

継代後 2~3 日目にコントロールならびに実験群の細胞を位相差顕微鏡を用いて観察し細胞形態の経時的な変化を追求した。

(v) 軟寒天内におけるコロニー形成能の検討;

コントロールならびに実験群の細胞を 0.5% の濃度の軟寒天 (Special agar-noble, Difco) に重層された 0.33% の濃度の軟寒天内に生細胞数 33 万ヶ (High inoculum size) 又は 3.3 万ヶ (Low inoculum size) を播種し 2~3 週間程観察しコロニー形成の有無を調べた。

(vi) 細胞飽和密度 (Saturation density) の検討;

コントロールならびに実験群の細胞を 35mm プラスチックシャーレに 10 万ヶ播種した。2 日ごとに培地を更新しながら細胞数をカウントし増殖曲線を描いて, 細胞が定常状態に達した時点の細胞飽和密度を算出した。

(vii) コロニー形成率 (Plating efficiency) の検討;

コントロールならびに実験群の細胞を 60mm プラスチックシャーレに 200 ヶ播種した。播種後 4 日目に培地更新し, 8 日間培養した後メタノールで固定, ギムザ染色しコロニー数をカウントした。

結 果

(1) 3'-Me-DAB ($4 \times 10^{-4} M$) と AcMAB ($1 \times 10^{-4} M$) の Ac2F 細胞の増殖におよぼす効果。 (Fig. 2.)

本実験に使用された濃度の 3'-Me-DAB ならびに AcMAB では DMSO に対して比較した時, 細胞増殖率は 50% 以下であり, 少なくとも 4 日間以上の添加が可能であることが判明した。

(2) 血清濃度を変えた場合の 3'-Me-DAB と AcMAB の細胞増殖阻害。 (Fig. 3.)

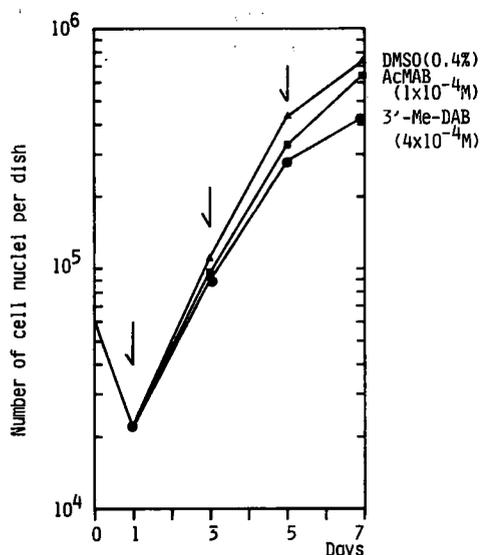


Fig. 2. Effect of 3'-Me-DAB and AcMAB on the proliferation of Ac2F, untreated rat liver cells

3'-Me-DAB は血清濃度の高い所で比較的強く細胞増殖阻害を示したが AcMAB では逆の現象が見られた。この意義は必ずしも明確ではないが本実験で AcMAB で形態変化が著しく、又 3'-Me-DAB ではほとんど変化がみられなかったこととなんらかの関連があるのかも知れない。

(3)動物復元実験の結果。(Table 1)

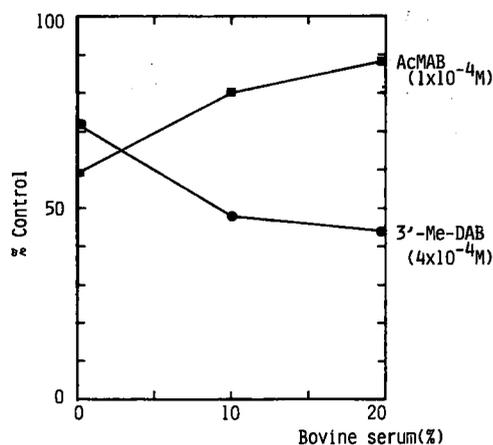


Fig. 3. Effect of concentration of bovine serum on the proliferation of a rat liver strain, Ac2F cells after treatment with AcMAB and 3'-Me-DAB

実験開始後、16日目に復元接種された結果では AcMAB の高濃度処理細胞において 1/2 の腫瘍形成を認めたのみであり、コントロールならびに 3'-Me-DAB 処理細胞においてはすべて陰性であった。実験開始後、99日目の結果では、AcMAB の高濃度処理ならびに 3'-Me-DAB 処理細胞においてそれぞれ 1/3 の腫瘍形成を認めた他に、コントロールの腫瘍形成 (1/3) を認めた。(4)位相差顕微鏡による細胞形態の経時的観察。

Table 1. Back-transplantation test of Ac2F cells treated with or without AcMAB or 3'-Me-DAB

Cells (Treatment)	16 days after experiment		99 days after experiment	
	No. of cells injected (x10 ⁶)	No. of rats with tumors/No. of rats injected	No. of cells injected (x10 ⁶)	No. of rats with tumors/No. of rats injected
DMSO	1.0	0/2	1.5	1/3
3'-Me-DAB (a) (4x10 ⁻⁴ M)	1.0	0/3	1.5	0/3
3'-Me-DAB (b) (4x10 ⁻⁴ M)	1.0	0/3	1.5	1/3
AcMAB (1x10 ⁻⁴ M)	1.0	0/3	1.5	0/3
AcMAB (5x10 ⁻⁴ M)	1.0	1/2	1.5	1/3

(a)コントロール (DMSO), 写真1, 2: 実験経過中上皮様細胞の形態を維持した。コロニーの辺縁部は規則正しい配列を示した。(×100)

(b)3'-Me-DAB(a), 写真3, 4: 実験経過中上皮様細胞の形態を維持しコロニー辺縁部も大体規則正しい。実験の経過中, 細胞質の若干増大しているものが散見された。(×100)

(c)3'-Me-DAB(b), 写真5, 6: (b)の場合とほぼ同様で上皮様形態を維持し辺縁部も大体規則正しい配列を示した。しかしながら実験の後半では細胞の大きさが所々において不均一であった。(×100)

(d)AcMAB ($1 \times 10^{-4}M$), 写真7, 8: 実験経過中, 大きな変化はみられなかった。上皮様細胞の形態を維持しコロニーの辺縁部は規則正しい配列を示した。(×100)

(e)AcMAB ($5 \times 10^{-4}M$), 写真9, 10: 実験の経過にともない細胞形態に変化が出現した。すなわち実験の後半では細胞質の増大が著明で細胞の大小不同もみとめられた。細胞密度の高い部分には Piling-up が見られ多核細胞も存在し核分裂像も多見された。細胞質内には著明に空胞がみられコロニーの周辺部は不規則であった。(×100)

(5)軟寒天内におけるコロニー形成能 (Table 2)

AcMAB の高濃度 ($5 \times 10^{-4}M$) 処理細胞の場合に播種細胞数が多い時 (細胞数33万ヶ) に軟寒天内におけるコロニー数の増加がみられた。

Table 2. Growth properties of Ac2F cells treated with or without AcMAB or 3'-Me-DAB. Colony forming efficiency in soft Agar

Treatment	No. of cells inoculated per dish	No. of colonies per dish (Mean)	Plating efficiency (%)	Comparison to the control
Control	3.3×10^4	4.33	0.013	100
3'-Me-DAB(a) ($4 \times 10^{-4}M$, x11)	6.7×10^4	5.5	0.0082	80
3'-Me-DAB(b) ($4 \times 10^{-4}M$, x6)	3.3×10^4	5.0	0.015	120
AcMAB ($1 \times 10^{-4}M$, x11)	3.3×10^4	7.0	0.02	160
AcMAB ($5 \times 10^{-4}M$, x6)	3.3×10^4	11.0	0.03	250

又, 3'-Me-DAB 単独処理の場合も AcMAB の高濃度処理の時ほどではないが軟寒天内コロニー数の若干の増加が認められた。

(b)細胞飽和密度 (Saturation density) の検討 (Table 3)

コントロールにくらべ AcMAB の高濃度処理細胞の場合にのみ細胞飽和密度の有意な増加がみられた。(* $P < 0.05$)

(7)コロニー形成率 (Plating efficiency) の検討 (Table 4)

コントロールにくらべ AcMAB の高濃度処理細胞の場合にコロニー形成率の場加がみられた。他の処理条件ではコントロールとの間に有意な差はみられなかった。

考 察

今日発癌剤の代謝活性化は細胞における突然変異の誘導あるいは発癌に必須な条件とみなされている。哺乳動物細胞を用いたこの方面の研究も多数¹⁵⁻²³⁾みられるがそれらは種々の薬剤耐性コロニーの出現, ないしは急性の染色体異常をマーカーとした突然変異の立場からの追求が殆んどであり癌化との直接的な関連までに言及したものは少ない。ここでは, 3'-Me-DAB単独添加例と比較しつつ代謝活性体 (AcMAB) によるラット肝細胞の形態的変化などの諸性状の変化とともに癌化の可能性を追求した。

復元実験の結果は, 実験開始後16日目および

99日目において AcMAB 高濃度処理細胞の腫瘍形成を認めた。コントロールは99日目において自然発癌を認めた。16日目においてすでに腫瘍形成を認めた事実は AcMAB の強い突然変異原性 (微生物の系), あるいは以下にのべられる細胞生物学的変化との相関を示唆するものであるが, 99日目の結果は自然発癌の事実より, AcMABによる癌化の誘導か自然発癌の促進のいずれかを区別することはできないと考えられる。

Table 3. Growth properties of Ac2F cells treated with or without AcMAB or 3'-Me-DAB. Saturation density

Treatment	No. of cells per dish (Mean)	No. of cells per cm ²	Comparison to the control
Control	185.6x10 ⁴	20.4x10 ⁴	100
3'-Me-DAB(a) (4x10 ⁻⁴ M, x19)	152.0x10 ⁴	16.7x10 ⁴	81.9
3'-Me-DAB(b) (4x10 ⁻⁴ M, x10)	185.6x10 ⁴	19.0x10 ⁴	93.2
AcMAB (1x10 ⁻⁴ M, x19)	167.4x10 ⁴	20.2x10 ⁴	99.1
AcMAB (5x10 ⁻⁴ M, x10)	250.0x10 ⁴	27.5x10 ⁴	135.0

*p < 0.05

Table 4. Growth properties of Ac2F cells treated with or without AcMAB or 3'-Me-DAB. Plating efficiency on plastic dish

Treatment	No. of colonies per dish*	Mean±SD	Plating efficiency (%)
Control	215,187,165	189.0±25.0	63.0
3'-Me-DAB(a) (4x10 ⁻⁴ M, x19)	182,182,196	186.7±8.1	62.2
3'-Me-DAB(b) (4x10 ⁻⁴ M, x10)	153,140,214	169.0±39.5	56.3
AcMAB (1x10 ⁻⁴ M, x19)	118,212,160	163.3±47.0	54.4
AcMAB (5x10 ⁻⁴ M, x10)	199,315,280	264.7±59.5	88.2

*300 cells were inoculated

in vitro における種々の性状の変化については、AcMAB の高濃度 (5 × 10⁻⁴ M) 処理により調べられた種々の性状において著明な変化が認められた。AcMAB は矢作ら²⁷⁾によって、微生物の系において DAB あるいは 3'-Me-DAB などの、前駆物質に比較して強い突然変異原性を示すことが報告されている。本実験で認められた AcMAB の肝細胞に対する効果はこのような、AcMAB の変異原性によるものと思われる。

現在、本研究のうち復元実験に関して16日目の結果の追試確認中であるが当面の問題として

は培地、培養法などの改良により、コントロールの安定な実験系の開発が早急に望まれる。

結 語

クローン化された培養ラット肝細胞株に対し 3'-Me-DAB あるいは究極型発癌物質とみなされている AcMAB を添加し、腫瘍形成能とともに種々の性状の変化を検討した。その結果、細胞生物学的変化としては、対照群の細胞にくらべ実験群の細胞 (特に AcMAB の高濃度処理の細胞) では細胞形態の変化が著明であった。又、軟寒天内におけるコロニー形成能、液体培地におけるコロニー形成能 (Plating efficiency)、細胞飽和密度などについても AcMAB の高濃度処理の細胞では対照群の細胞にくらべ著明な差異が認められた。動物復元実験に関し

では、実験開始後、16日目および99日目において AcMAB 高濃度処理細胞に腫瘍形成を認めた。コントロールには99日目において自然発癌を認めた。

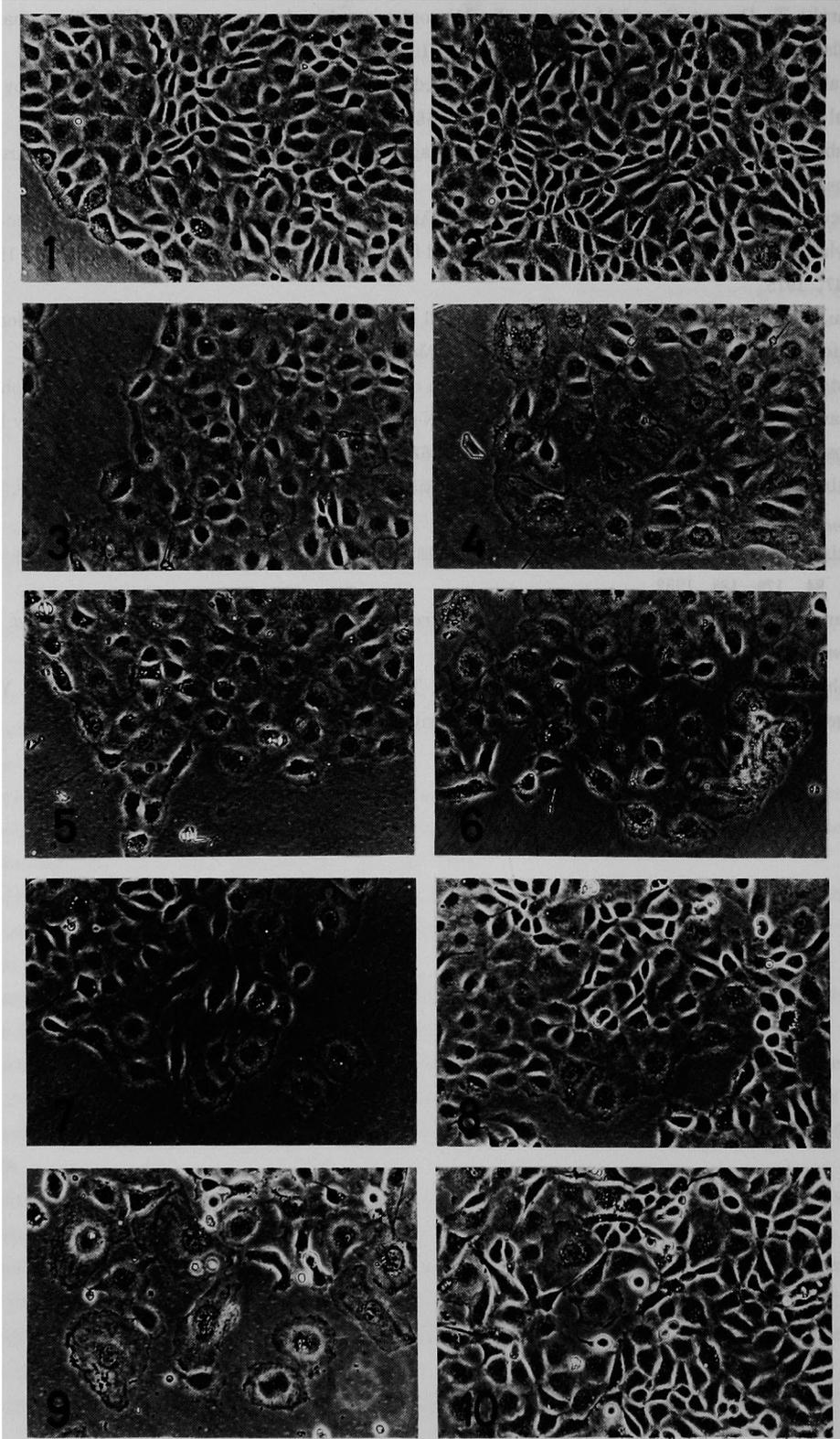
なお、本論文の要旨は昭和55年11月に開かれた第39回日本癌学会総会 (東京) において発表した。

文 献

1. 白石昌之：単個培養された二倍体性肝細胞の 3'-Me-DAB による試験管内癌化，岡医誌，**91**，407—414，1979.
2. 星加輝毅：アゾ色素短期飼育ラット肝から培養された 5 細胞株の性状について，岡医誌，**90**，1377—1391，1978.
3. Katsuta, H. and Takaoka, T.: Cytobiological transformation of normal rat liver cells by treatment with 4-dimethylaminoazobenzene after NAGISA culture. In *Cancer Cells in Culture*, ed. H. Katsuta, Tokyo, Univ. Tokyo press, pp. 321—334, 1968.
4. Katsuta, H. and Takaoka, T.: Carcinogenesis in tissue culture II. Proliferation-inducing effect of 4-dimethylaminoazobenzene on normal rat liver cells in culture. *Jpn. J. Exp. Med.* **35**, 209—230, 1965.
5. Katsuta, H. and Takaoka, T.: Carcinogenesis in tissue culture III. Effect of the second treatment on DAB-induced proliferating liver cells of normal rats in culture. *Jpn. J. Exp. Med.* **35**, 231—248, 1965.
6. Sato, J.: Carcinogenesis in tissue culture IV. Proliferation inducing effect on DAB and 3'-Me-DAB on liver cells from normal Donryu rats in culture. *Jpn. J. Exp. Med.* **35**, 433—444, 1965.
7. Sato, J. and Yabe, T.: Carcinogenesis in tissue culture V. Effects of long-term addition of 4-dimethylaminoazobenzene and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene on liver cells in culture. *Jpn. J. Exp. Med.* **35**, 445—462, 1965.
8. Sato, J. and Yabe, T.: Carcinogenesis in tissue culture VI. Tissue culture of liver cells from DAB-feeding rats. *Jpn. J. Exp. Med.* **35**, 491—511, 1965.
9. Sato, J.: Malignant transformation in culture of rat liver cells treated with and without 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. In *Cancer Cell in Culture*, ed. H. Katsuta, Tokyo, Univ. Tokyo press, pp. 335—350, 1968.
10. Miyahara, Y., Namba, M. and Sato, J.: Carcinogenesis in tissue culture 22. Malignant transformation of cloned rat liver cells treated in culture with 4-dimethylaminoazobenzene and properties of the transformed cells. *Acta Med. Okayama* **28**, 99—109, 1974.
11. Tokiwa, T., Nishi, M. and Sato, J.: Effects of 3'-methyl-4-dimethyl aminoazobenzene and 4-aminoazobenzene on plating efficiency, mitotic index, and macromolecular synthesis of cultured rat liver cells. *Acta Med. Okayama* **30**, 303—309, 1976.
12. Tokiwa, T. and Sato, J.: Effect of long-term administration of 4-dimethylaminoazobenzene on liver cell line derived from rat fed this chemical. *Gann* **67**, 879—883, 1976.
13. Tokiwa, T., Nishiyama, S., Yoshimoto, J. and Sato, J.: Cytological alteration of cultured rat liver cells by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobezene with special reference to chromosome changes, changes of growth patterns at a clony level and α -fetoprotein production. *Acta Med. Okayama* **34**, 161—168, 1980.
14. Williams, G.M.: The use of liver epithelial cultures for the study of chemical carcinogenesis. *Am. J. Pathology* **85**, 739—753, 1976.
15. Umeda, M. and Saito, M.: Mutagenicity of dimethylnitrosamine to mammalian cells as determined by the use of mouse liver microsomes. *Mut. Res.* **30**, 249—254, 1975.
16. Nishi, Y. and Inui, N.: Detection of mutagens required for metabolic activation in tissue culture. *Tissue culture* **5**, 148—161, 1979 (in Japanese).
17. Krahn, D.F. and Heidelberger, C.: Liver homogenate-mediated mutagenesis in Chinese hamster V79

- cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxines. *Mut. Res.* **46**, 27—44, 1977.
18. Kuroki, T., Drevon, C. and Montesano, R.: Microsome mediated mutagenesis in V79 Chinese hamster cells by various nitrosamines. *Cancer Res.* **37**, 1044—1050, 1977.
 19. Krahn, D.F., and Heidelberger, C: Microsome-mediated mutagenesis in Chinese hamster cells by chemical oncogens. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 74, 1975.
 20. Huberman, E., and Sacks, L.: Cell-mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens. *Int. J. Cancer* **13**, 326—333, 1974.
 21. Arcus, J.C., Bryant, G.M., Venkatesan, N., and Argus, M.F.: Repression of dimethylnitrosamine-demethylase by typical inducers of microsomal mixed-fraction oxidases. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1544—1547, 1975.
 22. Chu, E.H.Y., and Malling, M.V.: Mammalian cell genetics. II. Chemical induction of special locus mutations in Chinese hamster cells 'in vitro'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **61**, 1306—1312, 1968.
 23. Kato, R., Shoji, H., and Tanaka, A.: Metabolism of carcinogenic compounds. I. Effect of phenobarbital and methylcholanthrene on the activities of N-demethylation of carcinogenic compounds by liver microsomes of male and female rats. *Gann* **58**, 467—469, 1967.
 24. 西山正一：培養肝細胞の 3'-Me-DAB 処理による細胞悪性度の増強に関する研究。第一編。岡山医学会雑誌。 **94**, 151—163, 1982.
 25. 西山正一：培養肝細胞の 3'-Me-DAB 処理による細胞悪性度の増強に関する研究。第二編。岡山医学会雑誌。 **94**, 179—188, 1982.
 26. Tsutamune, T.: Establishment of five cell lines from normal adult rat livers *in vitro*. *Acta Med. Okayama* **29**, 137—145, 1975.
 27. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y.: Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Lett.* **1**, 91—96, 1975.

西山正一他2名論文附図



Effect of N-acetoxy-methylaminoazobenzene and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene on cloned rat liver cells with special reference to cellular morphology and growth capacity

Syoichi NISHIYAMA, Takayoshi TOKIWA and Jiro SATO

Division of Pathology, Cancer Institute

Okayama University Medical School

Cloned rat liver cells were treated with an ultimate carcinogen, N-acetoxy-methylaminoazobenzene(AcMAB) and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-Me-DAB) then various biological characters of the cells including tumorigenicity were examined. In regard to back-transplantation, after 11 days of experiments, a high concentration ($5 \times 10^{-4}M$) of AcMAB-treated cells formed tumors in one out of two rats. And a low concentration ($1 \times 10^{-4}M$) of AcMAB or 3'-Me-DAB-treated cells and untreated control cells did not form tumors. After 99 days of experiments, tumor formation was observed not only with the high concentration of AcMAB- or 3'-Me-DAB-treated cells but also with untreated control cells. AcMAB-treated cells had altered morphology and growth properties in vitro compared to 3'-Me-DAB-treated cells and untreated control cells. These results suggest an ultimate character of AcMAB, especially from the view point of tumor-forming capacity.