原 著

フッ素添加培養液で長期間連続的に培養されたヒト急性
リンパ芽球性白血病由来 T 細胞株の増殖, DNA 合成,
たんぱく質合成と膜抗原について

Studies of Their Growth, DNA Synthesis, Protein Synthesis and Surface
Antigens on Human Acute Lymphocytic Leukemia T Cell line Cultured
for Long Periods in the Fluoride-Containing Medium

佐 藤 勉* 岩 崎 孝 之* 弥 郡 彰 彦*
市 川 み ゆ き* 市 川 信 一* 小 林 充 明*
丹 羽 源 男*

Tsutomu SATO*, Takayuki IWASAKI*, Akihiko YAGORI*,
Miyuki ICHIKAWA*, Shinichi ICHIKAWA*, Mitsuaki KOBAYASHI*
and Motō NIWA*

Received April 16, 1990 ; accepted May 22, 1990

Abstracts: A T cell line (CCRF-CEM cells) derived from human acute lymphocytic leukemia was cultured in a medium containing 0.26 mM fluoride for 125 (CEM-5F-25 cells), 250 (CEM-5F-50 cells) or 375 (CEM-5F-75 cells) days serially.

The growth, DNA synthesis, protein synthesis and surface antigens of the cells were measured.

- 1) There were not any differences in growth pattern between CEM cells and fluoride treated cells.
- 2) The 24 hr treatment with 0.26 mM fluoride enhanced DNA synthesis and protein synthesis to 122 % and 110 % of the control, respectively. However, these potentials of cells were not affected by treatment of fluoride with 125, 250 and 375 days.
- 3) Surface antigens on cells determined in this study were not affected by treatment with fluoride for 125, 250 and 375 days.

In conclusion, the results suggested that the long-term treatment (375 days) with 0.26 mM fluoride did not inhibit the function of CCRF-CEM cells.

索引用語: フッ化物, T 細胞株, DNA 合成, たんぱく質合成, リンパ球表面抗原

Key words: Fluoride, T cell line, DNA synthesis, Protein synthesis, Lymphocyte surface antigens

* 日本歯科大学歯学部衛生学教室 (主任: 丹羽源男)

* *Department of Preventive and Community Dentistry, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University*

緒 言

歯科領域でう蝕予防の目的に広く応用されているフッ素の生体に対する作用は多くの疫学的、実験的研究などからかなり明らかになってきた¹⁾。その一方で、フッ素の為害作用を懸念する者もいる。今後フッ化物応用をより円滑に推進させていくには、従来のフッ素の生体作用に関する数多くの知見の正当な評価を徹底すると同時にその未知なる生体作用を明らかにしていくことが重要と考えられる。特にフッ素と生体防御機構との関連性についてはほとんど知られていないようである。そこで我々は生体防御機構で重要な役割を担っている免疫担当細胞に注目し、フッ素の影響を検討している²⁻⁵⁾。免疫担当細胞のうちT細胞については急性リンパ芽球性白血病由来のT細胞株を用いた実験を行っており、0.026 mM~2.63mM フッ素濃度の培養液で24時間培養した時の細胞のDNA合成、たんぱく質合成と膜抗原の変化を明らかにした⁶⁾。

水道水へのフッ素の添加、定期的な洗口、歯面塗布といったう蝕予防のためのフッ素応用法を考慮した場合、フッ素に長期間暴露された細胞の変化を観察することが重要と思われる。本実験では、先の実験で細胞の増殖に全く影響をおよぼさなかったフッ素濃度、即ち、0.26 mM (5 ppm) のフッ素を含む培養液で最長375日間連続培養したT細胞株のDNA合成、たんぱく質合成および膜抗原を検討した。

実験材料および方法

実験材料

1) 細胞および培養細胞

細胞は急性リンパ芽球性白血病由来のT細胞株であるCCRF-CEM細胞（以後CEM細胞と略す）を使用し

た⁷⁾。培養は37°C, 5% CO₂, 100%湿度環境下で行った。

2) 培養液

RPMI 1640培地 (Gibco 社, 米国) に56°C, 30分間処理した非働化牛胎児血清 (Gibco 社) を10%加えたものにさらにカナマイシン (明治製菓社) 20μg/ml を加えて使用した。

3) 試薬および放射性同位元素

- ・フッ化ナトリウム溶液：フッ化ナトリウム粉末 (和光純薬工業社) を蒸留水に溶かした後、ミリポアフィルター (孔径0.45μm ミリポア社, 米国) で濾過滅菌した。
- ・³H-チミジン：³H-Thymidine 比放射能3.07 TBq/m mol (Amersham 社, 米国)
- ・¹⁴C-ロイシン：¹⁴C-leucine 比放射能10.4 GBq/m mol (Amersham 社)
- ・モノクローナル抗体：Leu シリーズモノクローナル抗体 (Becton Dickinson 社, 米国)

4) 実験器具

- ・プラスチック製マルチディッシュ：24穴、径1.7cm (Nunc 社, デンマーク)
- ・ガラスマイクロファイバー濾紙：GF/A フィルター (Whatman 社, 米国)

Table 1 Combination of monoclonal antibodies used in two-color staining

FITC conjugate MoAb		PE conjugate MoAb
Anti-Leu-4	+	Anti-HLA-DR
Anti-Leu-3a	+	Anti-Leu-2a
Anti-Leu-18	+	Anti-Leu-3a
Anti-Trns	+	Anti-Leu-2a
Anti-IL-2R	+	Anti-T-11

Table 2 Cell growth of CEM cells and fluoride treated cells

Cells \ Culture days	Number of cells (X 10 ⁴)						
	0	1	2	3	4	5	6
CEM cells	3	5	10	22	45	102	103
CEM-5F-25 cells	3	5	10	21	45	99	101
CEM-5F-50 cells	3	5	10	21	44	99	104
CEM-5F-75 cells	3	5	10	21	46	100	98

Fig. 1 Growth curves of CEM cells and CEM-5F-75 cells

Table 3 Incorporation of ³H-thymidine into CEM cells and fluoride treated cells

Cells	Radioactivity
	CPM/dish × 10 ⁻² (% control)
CEM cells(control)	103 (100)
CEM cells + 0.26mM F	126 (122)
CEM-5F-25 cells	105 (102)
CEM-5F-50 cells	106 (103)
CEM-5F-75 cells	105 (102)

- ・真空濾過吸着装置：バキュームフィルター VF-10 (サンブラテック社製, 大阪)
- ・液体シンチレーションカウンター：LSC-900型 (アロカ社, 東京)
- ・ファクス：FACS Fluorescence Activated Cell Sorter (Becton Dickinson 社)

・ファスク解析ソフト：Two color analysis program-CONSORT 30 (Becton Dickinson 社)

実験方法

1) フッ素添加培養液での細胞の継代培養フッ素濃度が0.26mM (5 ppm) になるようにフッ化ナトリウムを添加した培養液で CEM 細胞 (以後フッ素処理細胞と

Table 4 Incorporation of ^{14}C -leucine into CEM cells and fluoride treated cells

Cells	Radioactivity
	CPM/dish $\times 10^{-2}$ (% control)
CEM cells (control)	147 (100)
CEM cells + 0.26mM F	162 (110)
CEM-5F-25 cells	144 (98)
CEM-5F-50 cells	151 (103)
CEM-5F-75 cells	148 (101)

Table 5 Expression of surface antigens of CEM cells and fluoride treated cells

(%)

Cells Antigens	CEM cells	CEM cells + 0.26mM F	CEM-5F -25-cells	CEM-5F -50-cells	CEM-5F -75-cells
Leu-4/HLA-DR					
Leu-4 (-) · HLA-DR (+)	0.06	0.07	0.04	0.08	0.03
Leu-4 (+) · HLA-DR (+)	1.10	1.23	1.17	1.32	1.68
Leu-4 (-) · HLA-DR (-)	83.61	82.60	82.27	82.90	82.07
Leu-4 (+) · HLA-DR (-)	15.23	16.10	16.52	15.70	16.22
Leu-3a/Leu-2a					
Leu-3a (-) · Leu-2a (+)	4.78	4.82	4.30	4.07	4.67
Leu-3a (+) · Leu-2a (+)	65.20	63.98	65.41	64.62	64.87
Leu-3a (-) · Leu-2a (-)	5.25	5.06	4.92	5.04	5.12
Leu-3a (+) · Leu-2a (-)	24.77	26.14	25.37	26.27	25.34
Leu-18/Leu-3a					
Leu-18 (-) · Leu-3a (+)	96.25	97.28	96.92	96.64	96.84
Leu-18 (+) · Leu-3a (+)	2.35	1.87	1.90	2.09	2.02
Leu-18 (-) · Leu-3a (-)	0.71	0.52	0.67	0.54	0.71
Leu-18 (+) · Leu-3a (-)	0.69	0.33	0.51	0.73	0.43
Trns/Leu-2a					
Trns (-) · Leu-2a (+)	4.07	4.24	4.75	4.12	4.62
Trns (+) · Leu-2a (+)	59.33	58.51	58.95	60.56	60.01
Trns (-) · Leu-2a (-)	1.02	1.53	1.23	1.70	1.45
Trns (+) · Leu-2a (-)	35.58	35.72	35.07	33.62	33.92
IL-2R/T-11					
IL-2R (-) · T-11 (+)	12.61	11.51	12.72	11.08	12.70
IL-2R (+) · T-11 (+)	2.34	1.93	2.07	1.72	2.58
IL-2R (-) · T-11 (-)	84.88	86.32	85.14	86.88	83.90
IL-2R (+) · T-11 (-)	0.17	0.23	0.07	0.32	0.82

よぶ)を継代培養した。具体的には5日ごとに継代を行い、実験には25回継代(125日間)した細胞(CCRF-CEM-5F-25細胞, 5F-25細胞と略す), 50回継代(250日間)した細胞(CCRF-CEM-5F-50細胞, 5F-50細胞と略す)と75回継代(375日間)した細胞(CCRF-CEM-5F-75細胞, 5F-75細胞と略す)を用いた。対照としてのCEM細胞の培養には通常の培養液に蒸留水を添加したものを同様に継代し, 使用した。

2) 細胞増殖の測定

細胞を24穴マルチディッシュの1穴あたり 3.0×10^4 個になるようにフッ素非添加あるいは添加培養液で調製し, 播種した。この時点培養0時間として以後24時間毎に生細胞数を算定することにより細胞増殖度を測定した。細胞の生死の鑑別はトリパンブルー染色により, 細胞数の算定は改良型 Neubauer 型血球計算盤を用いてそれぞれ行った。

Table 6 Monoclonal antibodies used in this experiment

MoAb	Antigen distribution (human)
Anti-Leu-2a (CD8)	T cytotoxic/suppressor cell antigen
Anti-Leu-3a (CD4)	T helper/inducer cell antigen
Anti-Leu-4 (CD3)	pan T
Anti-Leu-18	T suppressor/inducer subset, NK cell, B cell
Anti-HLA-DR	Activated T cell, B cell, Monocyte, Macrophage
Anti-Trns Receptor	Transferrin Receptor
Anti-T-11 (CD2)	E-rosette forming
Anti-IL-2R (CD25)	IL-2 Receptor

Fig. 2 Expression of Leu-4/HLA-DR of CEM cells and fluoride treated cells

3) 放射性同位元素による DNA 合成とたんぱく質合成の測定

DNA 合成の測定には ^3H -チミジンを、たんぱく質合成の測定には ^{14}C -ロイシンをそれぞれトレーサーとして、細胞の酸不溶性分画への取り込み量を求めることにより行った。細胞増殖の測定と同様に24穴マルチディッシュに細胞を播種し、24時間前培養した後、 ^3H -チミジンあるいは ^{14}C -ロイシンをそれぞれ37KBq/1 穴、15 KBq/1 穴になるように加えた。24時間培養後、1000rpm、10 分間の遠心分離で細胞を集め、さらに Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝液 (以後 PBS (-) と略す) で3 回遠心洗浄した。次に細胞を5%トリクロ酢酸(TCA) に懸濁し、水中で30分間放置した。TCA 処理より得ら

Fig. 3 Expression of Leu-3a/Leu-2a of CEM cells and fluoride treated cells

れた酸不溶性沈殿物をガラスマイクロファイバー濾紙を装着した真空濾過吸着装置で濾過した後、濾紙をアセトンで洗浄・乾燥させた。これをトルエン系シンチレーター (Toluen 100g, PPO 0.4g, POPOP 0.01g) を用い、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

4) モノクローナル抗体を用いた細胞表面抗原の解析
各細胞を PBS (-) で1000rpm、10分間の遠心洗浄を3 回行った。次に細胞と各モノクローナル抗体 (MoAb) を氷中で30 分間反応させた。反応方法は FITC (fluorecein isothiocyanate) または PE (phycoerythrin) のいずれかで標識させた2 種類の MoAb を同時に反応させる two color staining 法⁹⁾ によった。使用し

Fig. 4 Expression of Leu-18/Leu-3a of CEM cells and fluoride treated cells

Fig. 5 Expression of Trns/Leu-2a of CEM cells and fluoride treated cells

た8種類の MoAb とその組合せを Table 1 に示した。反応終了後、細胞溶液をファクスに流し、解析用プログラムソフトにてデータの解析を行った。

実験結果

1. CEM 細胞とフッ素処理細胞の細胞増殖

フッ素非添加培養液で継代培養されている CEM 細胞と0.26mM フッ素濃度になるように NaF を加えた培養液中で125, 250, 375日間継代培養された5F-25細胞, 5F-50細胞, 5F-75細胞の増殖の測定結果を Table 2

Fig. 6 Expression of IL-2R/T-11 of CEM cells and fluoride treated cells

に示した。さらに CEM 細胞と5F-75細胞の増殖パターンを Fig. 1 に示した。各細胞とも同様な増殖パターンが観察された。即ち、4種類の細胞とも培養開始後、5日目にかけて対数的に増殖し、プラトーに達した。

2. CEM 細胞とフッ素処理細胞の DNA 合成とたんぱく質合成

³H-チミジンあるいは ¹⁴C-ロイシンの各細胞の酸不溶性分画への取り込み量を測定することにより求めた DNA 合成とたんぱく質合成の結果を Table 3 と Table 4 に示した。DNA 合成はフッ素を添加していない培養液で培養した CEM 細胞(対照群)の ³H-チミジンの取り込み量を100%とした時、5F-25細胞では102%, 5F-50細胞では103%, 5F-75細胞では102%であった。また、フッ素を添加していない培養液で継代している CEM 細胞を新たに0.26mM フッ素濃度の培養液で培養したところ、対照群の約112%であった。たんぱく質合成は同様に CEM 細胞の ¹⁴C-ロイシンの取り込み量を100%とした時、5F-25細胞では98%, 5F-50細胞では103%, 5F-75細胞では101%であった。DNA 合成の場合と同様に対照群の細胞を新たに0.26mM フッ素濃度の培養液で培養したところ、対照群の約110%の取り込みであった。

3. CEM 細胞とフッ素処理細胞の細胞表面抗原

8種類の MoAb から2種類ずつ組合せた two color staining による CEM 細胞と各フッ素処理細胞の細胞表面抗原の解析結果を Table 5 と Fig. 2~Fig. 6 に示した。今回用いた MoAb の組合せは Leu-4+HLA-

DR (Fig. 2), Leu-3a+Leu-2a (Fig. 3), Leu-18+Leu-3a (Fig. 4), Trns+Leu-2a (Fig. 5), IL-2R+T-11 (Fig. 6) の5種類であるが、これらの細胞表面抗原の提示のパターンは CEM 細胞とフッ素添加培養液で連続125日 (CEM-5F-25細胞), 250日 (CEM-5F-50細胞), 375日 (CEM-5F-75細胞) 間、培養された細胞との間に明らかな違いは認められなかった。

考 察

フッ素と生体防御機構との関連性についてはほとんど知られていない。そこで我々はフッ素が免疫機構におよぼす影響を明らかにする目的で免疫担当細胞を用いた *in vitro* の研究を行っている。これらのうちヒト由来の T 細胞株による実験では、0.026~2.63mM フッ素濃度の培養液で24時間培養した時の細胞の変化を既に報告した⁹⁾。これによるとフッ素処理の時間が24時間の場合、フッ素濃度が0.26mM ではT細胞の機能と密接な関連があるとされている細胞表面抗原に影響が見られず、2.63mM 濃度で細胞機能の抑制が推察された。う蝕予防の為にフッ素の応用法を考慮した場合、長期間のフッ素処理による細胞影響を検討する必要がある。そこで今回は、24時間処理では細胞表面抗原に影響が認められなかった0.26mM フッ素濃度の培養液で125~375日間連続培養した時のT細胞株の増殖、DNA 合成、たんぱく質合成と細胞表面抗原を測定した。

いうまでもなく、細胞増殖の測定は種々の化学物質の生体影響を見るための重要な指標としてしばしば用いられる。CEM 細胞は1.05mM フッ素濃度で増殖が抑制されるが、0.26mM 濃度以下で4日間培養されても細胞増殖に変化は認められなかった。今回の0.26mM フッ素濃度で連続125日、250日および375日間培養された細胞の増殖も対照の細胞とほぼ同様であったことから、このフッ素濃度の CEM 細胞に対する毒性作用はほとんどないものと考えられた。

In vitro において高濃度のフッ素が種々の細胞の DNA 合成やたんぱく質合成を阻害することが知られている⁹⁻¹²⁾。さらに我々は0.53mM 以下のいわゆる低濃度フッ素の培養液で24時間培養されたヒト胎児肺由来の線維芽細胞はむしろたんぱく質合成が亢進することも見出した¹²⁾。CEM 細胞も1.05mM フッ素濃度以上で24時間培養された時、DNA 合成とたんぱく質合成が抑制されたが、0.26mM 以下では亢進した⁹⁾。しかし、0.26mM 濃度で125~375日間連続培養された CEM 細胞の DNA 合成とたんぱく質合成は対照の細胞とほぼ同様であった

ことから、24時間処理で見られたこれらの合成の亢進はフッ素による一時的な刺激の結果であることが考えられた。今後、0.26mM フッ素濃度で見られた DNA 合成やたんぱく質合成の亢進がどの位の期間まで継続するのか、明確にする必要があると思われる。

リンパ球表面抗原はリンパ球の分化や機能と密接な関連性があることが知られている¹³⁾。そこでフッ素添加培養液で培養した時の CEM 細胞の表面抗原を測定することにより、フッ素と細胞機能との関連を検討した。今回用いた MoAb のヒトでの主な分布を Table 6 に示した。

2.63mM フッ素濃度で24時間培養された CEM 細胞はその抗原提示の一部が抑制されることを報告しているが⁹⁾、今回は24時間処理では変化の認められなかった0.26mM フッ素濃度で長期間培養された場合の表面抗原を測定した。2種類の MoAb の組合せによる5通りの two color staining の結果は0.26mM フッ素処理による明らかな変化は見られなかった。即ち、0.26mM フッ素濃度の培養液で125日、250日および375日間連続培養された細胞の抗原提示のパターンは対照群と同様であったことから、このフッ素濃度では細胞の機能に影響が生じないことが推察された。

以上をまとめると、T 細胞株 CCRF-CEM 細胞に対する *in vitro* での長期に渡るフッ素処理の影響を考えた場合、フッ素濃度が0.26mM では細胞機能に影響を受けないことが示唆された。

結 論

ヒト急性リンパ芽球性白血病由来のT細胞株 (CCRF-CEM 細胞) を0.26mM フッ素濃度の培養液で連続125日、250日および375日間培養した時の細胞の増殖、DNA 合成、たんぱく質合成と表面抗原を測定し、次のような結論を得た。

1) 0.26mM フッ素濃度の培養液で125日、250日および375日間連続培養された細胞と対照群の細胞との間に細胞増殖のパターンの違いは認められなかった。

2) 新たに0.26mM フッ素濃度の培養液で24時間培養された細胞では DNA 合成とたんぱく質合成が対照群の細胞に比べ、それぞれ22%、10% 亢進した。0.26mM フッ素濃度の培養液で125日、250日および375日間連続培養された細胞の DNA 合成とたんぱく質合成は対照群の細胞と同程度であった。

3) 0.26mM フッ素濃度の培養液で125日、250日および375日間連続培養された細胞と対照群の細胞との間

では細胞表面抗原の提示のパターンに違いは認められなかった。

文 献

- 1) Underwood, E. J.: 日本化学会訳編, 環境・防災ライブラリー微量元素—栄養と毒性—, 丸善株式会社, 東京, 1975, 369-404頁.
- 2) 佐藤 勉, 高月かすみ, 丹羽源男, 辻 達彦: マクロファージにおよぼすフッ素の影響 (第1報), 日衛誌, **38**(1); 563 (抄録), 1983.
- 3) 清野精文: モルモット腹腔マクロファージに及ぼすフッ素の影響, 歯学, **71**(5); 790-800, 1984.
- 4) 佐藤 勉, 高月かすみ, 丹羽源男, 辻 達彦: マクロファージにおよぼすフッ素の影響 (第2報), 日衛誌, **39**(1); 441 (抄録), 1984.
- 5) Sato, T., Niwa, M., Nishida, Y. and Tsuji, T.: The effects of fluoride on the activities of several enzymes and on cAMP levels in human lymphocytes *in vitro*, Fluoride Research 1985, Studies in Environmental Science, **27**; 257-261, 1986.
- 6) 佐藤 勉, 中倉忠男, 小山 徹, 西田良和, 西川良一, 根岸邦雄, 宇江城正和, 丹羽源男: 成人T白血病由来T細胞株の増殖, DNA 合成, たんぱく質合成および表面抗原におよぼすフッ素の影響, 歯学, **77**(6); 1972-1979, 1990.
- 7) Foley, G. E., Lazarus, H., Farber, S., Uzman, B. G., Boone, B. A. and McCarthy, R. E.: Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia Cancer, **18**; 522-529, 1965.
- 8) 奥村 康編: 今日の免疫学, 南江堂, 東京, 1985, 42-46頁.
- 9) Holland, R. I.: Fluoride inhibition of protein and DNA synthesis in cells *in vitro*, Acta pharmacol. et toxicol., **45**; 96-101, 1979.
- 10) Imai, T., Niwa, M. and Ueda, M.: The effects of fluoride on cell growth of two human cell lines and on DNA and protein synthesis in HeLa cells, **52**; 8-11, 1983.
- 11) 今井敏夫, 丹羽源男: HeLa 細胞の増殖とタンパク質合成に及ぼすフッ素の影響, 口腔衛生会誌, **35**(2); 247-259, 1985.
- 12) 佐藤 勉, 丹羽源男: 正常ヒト二倍体細胞におよぼすフッ素の影響—細胞増殖, たんぱく質合成, ALP 活性, cAMP 量および微細構造について—, 口腔衛生会誌, **37**(2); 172-184, 1987.
- 13) 上村伯人, 福井谷祐一: フロサイトメトリーによる細胞表面形質の解析—造血器悪性腫瘍を中心として, 細胞, **17**(8); 342-348, 1985.