歯周疾患と抵抗因子

第5編 (1) 種々の培養条件による L 細胞の fibronectin 産生の免疫組織学的検討

竹 内 宏 堀 泰 典 兼 松 宣 武* 阿 部 公 生**

岐阜歯科大学口腔病理学講座

(主任：寺崎太郎教授)

*岐阜歯科大学口腔外科第二講座

(主任：柴田寛一教授)

**岐阜歯科大学学生化学講座

(主任：横田 豊教授)

(昭和 57 年 8 月 24 日受付)

Periodontal Disease and Resistance Factor.

V-1. Immunohistological Study of L-cell's Fibronectin cultured under various Conditions

Hiroshi TAKEUCHI, Yasunori HORI, Nobutake KANEMATSU * and Kimio ABE **

Department of Oral Pathology, College of Dentistry

(Director: Prof. Taro TERASAKI)

*Department of Oral Surgery, Gifu College of Dentistry

(Director: Prof. Kanichi SIBATA)

**Department of Oral Biochemistry, Gifu College of Dentistry

(Director: Prof. Yutaka YOKOTA)

It is well known that the fibronectin composed of cell surface and plasma fibronectin plays a role of promoting cell proliferation and then regeneration of injured tissue by its biological function. We reported that the fibronectin localized in various components of human inflamed gingiva, and gave suggestion that the substance was correlated to local resistance factor to periodontal disease¹⁾.

This study was made to clarify the formation of fibronectin in L-cells which cultured under several conditions. While L-cells cultured under very poor

condition which disappeared during culture for five days were not demonstrated the fibronectin in their cytoplasm, others included groups which cultured under poor condition were observed the formation. The fluorescence was categorized into three groups of diffuse, granular, and fibrillar pattern.

From above, it was suggested that the fibroblasts in periodontal tissue with inflammatory destruction formed fibronectin, promoted to proliferate themselves, and then led to regeneration of the injured periodontal tissue.

緒 言

fibronectin は各種生体細胞に分布する cell surface fibronectin と、血漿に存在する plasma fibronectin とから成り、生体の恒常性維持機構の1つとして種々の機能を発揮している。筆者らは第4編において、炎症歯肉の上皮、基底膜、膠原線維、線維細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症性滲出物中のいずれかに両者が局在することを報告した¹⁾が、fibronectin は fibroblast を始め種々の細胞の増殖や成熟を促す物質でもあること^{2,3)}から、歯肉炎の病巣部の fibronectin は炎症反応本来の機構の一環としての再生・修復に役を担っているものと考えることができる。

筆者らは、このような fibronectin の機能上、歯周疾患の抵抗因子の一つとみなし、種々検索中であるが、今回、fibroblast の一種であるL細胞を用い、その培養条件による fibronectin の産生量の相違を免疫組織学的に観察し半定量的に測定し、抵抗因子とのつながりを考究した所、若干の知見を得たので報告する。

実験材料と方法

L細胞を種々の条件で培養し、その増殖数と増殖細胞が保有する fibronectin を検討した。

1. L細胞の培養

L細胞の培養に際して、次の2つの培養条件を設定した。その1つは、培地の血清濃度を変え、他の1つは培養温度を変えたものである。血清濃度を変えた group は、Eagle の MEM 培地を base とし、血清 0%, 2%, 5%, 10%, 20% の5群を設け、培養温度を変えた group は 10% 血清加 MEM 培地を用いて 32°C, 37°C, 39°C, 41°C の4群を準備した。

上記の如き培養に先立って、250 ml 角型培養瓶にてL細胞を4日間培養し、PBS で洗滌後、0.25% trypsin を作用させることによって浮遊細胞とし、出発材料を 1×10^5 order に調製した。

なお、実験群の培養には plastic シャーレを用い、medium はいずれも 10 ml とし各群3検体を設けて5日間培養した。

2. 細胞算定

5日間の培養の後に、各シャーレの medium を除去し、PBS で2回洗滌をおこない、0.25% trypsin を 10~15 分間処理して遠心 (1000 r.p.m. 10 分間) をおこなっ

表 1 5日間培養後の各群のL細胞の細胞数

た。この上清を捨て、PBS 2 ml を加えピペッティングの後にビルケルチュルフ血球算定盤を用いて細胞数の算定をおこなった。

3. 細胞中の fibronectin の同定

培養を終えたL細胞中の fibronectin の検出には fibronectin を抗原とする monoclonal 抗体を1次抗体とする蛍光抗体間接法を応用した。すなわち、trypsin 処理後の PBS 2 ml の細胞浮遊液をピペットにて採取し、これを無蛍光スライドグラスに滴下し、自然乾燥を待って 95% cold ethanol で固定し、ここに1次抗体を30分間反応させ、さらに蛍光色素標識2次抗体を30分間反応させた。用いた1次および2次抗体、ならびに染色方法は前報¹⁾の通りである。

実験結果

1. 培養条件による細胞増殖数

表1は各種培養条件による5日後のL細胞の算定数をまとめたものである。出発時に比べて多少なりとも増殖の傾向を示した group は、5% 血清加 37°C, 10% 血清加 37°C, 20% 血清加 37°C, 10% 血清加 32°C, 10% 血清加 39°C の条件下で培養した5 group であり、37°C で無血清培地および2% 血清加培地を用いた群や、10%

図 1 培養終了時のL細胞の顕微鏡所見

- a 10% 血清加 39°C 培養
- b 10% 血清加 37°C 培養
- c 20% 血清加 37°C 培養

血清加培地で 41°C で培養した群の 3 群は細胞数減少をきたした。最も著しい増殖を示したのは 10% 血清加培地にて 39°C で培養した group であり、逆に培養途中で死滅し増殖の全くみられなかったのは 41°C で培養した group であった。また、血清無添加 37°C 培養もこれと同様にほぼ死滅の状態を示した。

因みに図 1 a, 図 1 b, 図 1 c は培養終了時の 10% 血清加 39°C, 10% 血清加 37°C, 2% 血清加 37°C の 3 種の L 細胞を示したものである。

2. 蛍光抗体法による胞体内 fibronectin

fibronectin の産生を示す特異蛍光は、血清無添加 37°C 培養群および 10% 血清添加 41°C 培養群の 2 群以外は、すべての群にわたって認めることができた。その蛍光の形態は種々ではあったが、類別すると、diffuse pat-

図 2 fibronectin の産生を示す胞体内の蛍光所見

- a diffuse pattern
- b granular pattern
- c fibrillar pattern

tern, granular pattern, fibrillar pattern の 3 種に大別でき、それぞれにおいて、細胞膜上に蛍光を認める例、細胞質の一端にそれを認める例および細胞質全体に認める例に細分化された。一般に、diffuse pattern を示す例は細胞膜上に局在し、granular および fibrillar pattern のものは細胞質の一端に扁在するか、細胞質全体に存在する傾向を示し、とくに、fibrillar pattern では網状構造をとるものが多かった (図 2 a, b, c)。また、時に、細胞質全体に diffuse pattern を示すものや、granular pattern と fibrillar pattern を同一細胞内に認める例も散見された。

このような蛍光陽性 L 細胞の出現比率を概算し描記すると表 2 の如くであった。本比率のとり方は厳密なものではなく、100 倍の総合倍率下で、全細胞中 80% 程度

表 2 fibronectin 産生 L 細胞の比率

※ A～H 群のグループ分けは表 1 と同様

以上の細胞が蛍光陽性を示したものを卍, 80% 以下 50% 以上を示したものを卍, 50% 以下のものを+とし評価した結果である。これを見ると分るように, 卍を示したものは 10% 血清加 37°C 培養の 1 例のみで, 他はすべて卍あるいは+を示した。これを今少し詳細に述べると, 血清無添加 37°C 培養群および 10% 血清加 41°C 培養群は 0.2% 血清加 37°C 培養群は+, 他の培養群はすべて卍で, 10% 血清加 37°C 培養群の 1 例のみが卍を示した。

以上を小括すると, 培養条件によって細胞増殖の差はあったものの, fibronectin の産生を示す蛍光陽性細胞の占める割合は極めて劣悪な条件の 2 群を除くとほぼ同様であることがうかがえた。

考 察

cell surface fibronectin あるいは plasma fibronectin はその生物学的意義に起因して, 近年各方面において注目されつつある。筆者らも, fibronectin が fibroblast を始め種々の細胞の増殖や成熟を促す等の性状と, 前報に報告した如く炎症歯肉にも存在する事実などから, 歯周疾患にも関与し, しかもそれが組織修復性に機能するとみなし得た。

歯周疾患の病巣歯肉の環境は程度の差はあるものの概して劣悪である。かかる条件下において, 果して fibronectin が十分に産生されしかもその機能を発揮し得るか否かは現在不明である。このような現状から今後, in vitro あるいは in vivo において詳細な検討を要すが, 今回はその一端を解明すべく, 種々の条件で培養した L 細胞の fibronectin の産生の程度を免疫病理学的に観察

した運びである。

その結果, fibronectin は極めて劣悪な条件すなわち低栄養 (血清無添加培地) や高温 (10% 血清加 41°C 培養) を除けば, 今回のすべての培養条件下でその産生を行い得ることが判明した。この実験結果は, 細胞が死滅しない限り, その細胞の増殖の有無を問わず fibronectin の産生を行うことを示すもので, しかも fibronectin 産生細胞の占める割合は, 2% 血清加 37°C 培養群の+を除けばいずれも卍を示し, 類似した値であった。ただ異なる点は比率は同じであっても, 増殖にほぼ比例して fibronectin 産生細胞も増加するということである。

炎症性疾患においては, fibronectin の最も有力な産生細胞である fibroblast は増殖性炎の時期に旺盛に増殖する。この時期はいうまでもなく傷害組織の再生期に相当し, fibroblast はその主役を演じている。この際に, fibronectin は Orly, J. and Sato, G. (1979)⁴⁾ の述べる如く細胞分裂を促進するが, この fibronectin の供給は増殖しつつある fibroblast 自体が行うのか, あるいは透過性亢進をきたした新生血管から供給される plasma fibronectin かは不明である。恐らくこの両方であろう。歯周疾患を代表する歯肉炎や辺縁性歯周炎は典型的な慢性炎症性疾患であり, fibroblast の消長を反復しつつ長期に経過している。この際の fibroblast の増殖の程度は様々であるのは周知の事実であるが, その最大の要因は原因による傷害の波及の程度にある。しかし fibroblast は極めて増殖能ひいては再生能の旺盛な細胞である。換言すれば極めて劣悪な環境下においても生存し且つ増殖する能力を有しているといえる。このような fibroblast の再生能力を促す因子の重要なものが, 自らが産生しその細胞内のアクチン線維に結合する⁵⁾ fibronectin であろう。今回の L 細胞の培養実験において, かなり条件の悪い培養法でも細胞が生息している限り fibronectin を産生し得るという結果は, このような示唆を確証づけるものであるといえる。すなわち, 歯周疾患病巣部で産生される fibronectin は本疾患の抵抗因子の 1 つをなすものであると結論し得るものである。

なお, 今後, fibronectin と歯周疾患とのつながりを更に詳細に検討するために種々の研究を重ねて行く計画であるが, 次報ではその一部として生化学的検索の結果を報告する予定である。

結 論

1. 種々の条件で培養した L 細胞の fibronectin の産

生の様相を免疫組織学的手法で検索した。

2. その結果、極めて劣悪な条件下で培養し、途中で死滅した細胞には fibronectin は認められなかったが、それ以外の培養群、すなわち培養完了時に至るまで死に至らなかった群はすべてその産生を認めた。

3. この fibronectin 産生群には、増殖群は去ることながら、出発時の細胞数よりも減少した群も含まれていた。

4. fibronectin 産生細胞の占める割合は、どの群もほぼ同じであり、このことからかなりの悪条件にも耐えてこれを産生し得ることが判明した。

5. 以上から、歯周疾患の病巣の如き悪環境においても、fibroblast は fibronectin を産生し、これに機縁付けられて自己の細胞の増殖を促し、ひいては傷害組織の再生、修復を目指すものと考ええる。

文 献

1) 竹内 宏, 金久純也, 堀 泰典, 上田雅俊, 今津

智子, 今井久夫, 谷 明, 倉松 常 俊, 佐川 寛典: 歯周疾患と抵抗因子・第4編, Fibronectin の歯肉組織における局在と機能について, 日歯周誌, 24 : 113-118, 1982.

- 2) Ali, I.U., Mautner, V. and Lanza, R. : Restoration of normal morphology, adhesion and cytoskeleton in transformed cells by addition of a transformation-sensitive surface protein. *Cell*, 11 : 115-126, 1977.
- 3) Ali, I.U. and Hynes, R.O. : Effects of LETS glycoprotein on cell motility. *Cell*, 14 : 439-466, 1978.
- 4) Orly, J. and Sato, G. : Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium. *Cell*, 17 : 295-305, 1979.
- 5) Singer, I.I. : The fibronexus: a transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5 nm microfilaments in hamster and human fibroblasts. *Cell*, 16 : 675-685, 1979.