

8. In vitroにおける歯肉由来線維芽細胞のTitanium上でのFibronectin局在に関する免疫電子顕微鏡的観察

安彦善裕, 賀来 亨
(口腔病理)

歯科インプラント, 特にOsseointegrationを期待したTitanium (Ti) を材料としたものでは, その組織界面は主に骨組織ならびに上皮と結合組織の粘膜組織からなっている。この線維芽細胞の付着には接着蛋白のひとつであるFibronectin (FN) の関与が広く知られているが, 実際にその減少をとらえた報告は未だみられない。

今回われわれは, in vitroでTi上での線維芽細胞のFNの局在を免疫電顕的にとらえることを試みたので, その概要について報告する。

【材料および方法】 細胞はBrunetteの方法に従いヒト歯肉より単離した線維芽細胞を用い, 5% calf serumを含んだ α -MEMにより, 50nm以下の厚さで表面をTiで覆った表面滑沢なエポキシ上で通法に従い培養した。固定の後, FNを1次抗体とし, 1nm金コロイドを標識した血清を2次抗体としてpre-embedding methodによる免疫染色を行った。その後, 銀増感を行いエボン812にて包埋し細胞付着に対して縦断面方向にエポテック, Tiと共

に超薄切片を作成して透過電顕により観察した。さらに, 細胞の一部は同様の培養液と, 血清からFNを除去した培養液にて, Tiで表面を覆った滑沢なものと規則正しい平行な溝を付与したシリコン上で培養された。固定の後, 同様にFNを1次抗体とし免疫染色を行った。銀増感を施し, 通法に従い脱水, 乾燥の後, 走査電顕により観察した。

【結果および考察】 透過電顕で観察するとFNは高電子密度の銀粒子の集族としてTiと細胞の間に観察され, これらの接着にFNが関与していることが確認できた。FNを除いた血清で培養したと思われるFNを除いた血清で培養したものを走査電顕で観察すると, 細胞が分泌したと思われるFNが顆粒状, あるいは線状を呈し細胞の動きに沿ってTi上に存在しており, 他の細胞の接着に影響をおよぼす可能性が示唆された。また, これらの溝により制御され, 種々の細胞のcontact guidanceを助けうるものと思われた。

9. 自然発症肝炎・肝癌ラット (LECラット) における着色歯の検索 第2報: 実験的黄疸ラットとの比較

渡辺一史, 村瀬博文, 加藤元康
永易裕樹, 窪田正樹, 大森一幸
小田浩範, 柴田敏之, 有末 眞
(口腔外科2)

これまで, われわれは自然発症肝炎ラット (LECラット) に高度の黄疸を伴う肝炎発症後, 2~3週経過した時点で緑色を呈する切歯が萌出する現象を観察し, これが黄疸時のビリルビンによる着色である可能性を報告してきた。そこで今回, このLECラットの着色歯と正常LEAラットの胆管結紮後黄疸によって生じる着色歯との比較検討を行った。

LEラットのクローズドコロニーよりLECラットとともに分離独立された肝炎の自然発症を全く認めないLEAラット14匹の総胆管を結紮し, その後経日的に血清ビリルビン値を測定し, 結紮後3週間目に屠殺し, 下顎骨の摘出を行った。その結果, 血清ビリルビン値は結紮後3日目より著名な高値を示し, その後ゆるやかに上昇

し, 5日目に一定のピークに達した後, 下降した。また, 1匹だけ総ビリルビン値が15.37mg/dl, 直接ビリルビン値が12.58mg/dlと突出した値を示したラットがいた。歯の観察の結果, 着色歯はこのラットのみ認められた。着色は象牙質内に歯髄を取囲むように環状に認められ, その部位は血清ビリルビン値が高かった時期に形成された部位に一致していた。この着色環はLECラットで認められたものと同様のものと考えられた。しかし, LECラットで認められたような象牙細管の走行の乱れ等は, ほとんど観察されなかった。

今回の結果より着色歯は直接ビリルビンの上昇のみでも起こりうることを示され, この直接ビリルビン値はLECラットで着色歯の萌出がみられる場合の値とほぼ

一致している可能性が示唆された。また、血清総ビリルビン値が10mg/dl前後に達するものが3匹いたが、いずれも着色歯は認められなかったことより、歯の着色が生

じるには血清ビリルビン値に閾値が存在する可能性も示唆された。

10. ノードマウス可移植性ヒト骨肉腫細胞株における増殖能の比較

越智眞理, 中出 修, 齊藤正人
大内知之, 安彦善裕, 賀来 亨
(口腔病理)

【緒言】 骨肉腫細胞株は悪性腫瘍の研究や骨肉腫の治療の研究にかかせない細胞株であり、また、骨誘導や吸収因子などの骨代謝の研究にとって重要な細胞株で、実験的にも広く利用される。演者らは札幌医科大学、整形外科外科学講座の松山らによって樹立されたKiku(原発巣)とKikuM(肺転移巣)を用いて細胞株およびノードマウスへの戻し移植により得られた組織切片を用いて細胞の増殖能を検索した。

【方法】 細胞株については、(In vitro) 1×10^3 個NuncのChamber slideの各wellで培養し、抗BrdU、PCNAモノクロナール抗体を用いて染色し陽性細胞率を同様に組

織切片 (In vivo) も同様な方法にて算出した。

【結果】 細胞株および組織切片とも抗BrdU、PCNAモノクロナール両抗体での陽性細胞率はKikuMのほうがKikuよりも有意に高い値を示した。

【考察】 今回のBrdUおよびPCNAのレベリング・インデックスを比較すると先の癌学会で発表したアルカリ・フォスファターゼ活性の結果とほぼ同じ傾向が見られた。これから2種の細胞株は異なる性状を有し骨肉腫の増殖能および悪性度を解析する上で有用であると思われる。

11. 増殖因子による癌細胞の浸潤転移能の促進とその抑制に関する研究

永易裕樹, 加藤元康, 河野 峰
柴田敏之, 有末 眞, 村瀬博文
(口腔外科2)

これまで我々は、ラット乳癌細胞(SST-2)由来の退縮型癌細胞ER-1が、宿主反応細胞により増殖、浸潤型に変わることが報告してきた。今回、宿主反応細胞より産生される増殖因子のうちEGFに注目し、EGFがER-1細胞の増殖、浸潤、転移能獲得に及ぼす影響を検討した。また、肝炎治療剤Malotilateに転移抑制作用のあることを見出し、その機序解析も合わせて行なった。ラット肺由来内皮細胞(RLE)を用いたin vitro invasion assayでER-1細胞の浸潤能はEGFで24時間処理により有意に促進された。Transwellを用いたMigration assayでは、EGF処理ER-1細胞はRLEのconditioned mediaに対するchemoinvasivenessが促進された。次に、無処理ER-1細胞を同系SHRラットの腹腔内に移植すると全例自然退縮するが、EGF24時間処理ER-1は、全例致死的増殖を示した。しかし、24時間処理によるER-1のin vivoの造腫瘍性、in vitro浸潤能の促進は一過性であり4日後には元

の性格に戻っていた。一方、ER-1細胞をEGF存在下で1ヵ月間培養すると造腫瘍性、浸潤能はその後2ヵ月間安定していた。高転移株SST-2をi.v.する肺転移の系においてMalotilate経口投与は、その転移を有意に抑制した。また、in vitro invasion assayでもMalotilate処理RLEは、SST-2の浸潤を抑制した。Malotilate処理RLEを電顕的に観察すると、種々の細胞間結合装置の発達が促進されていた。以上のことから、ER-1細胞はEGFによりRLEに対する浸潤能、chemoinvasivenessを促進し、造腫瘍性肺転移能も獲得することが示され、長期間EGF処理によりこの形質が固定化される可能性を示した。以上より宿主反応細胞から産生されるEGFが癌細胞の造腫瘍性、浸潤能などの悪性形質の獲得に強く関与する可能性を示唆した。一方、MalotilateでRLEの細胞間結合を高めるような微小環境を整えることが癌転移の抑制につながる可能性を示唆した。