原 著

多形核白血球における Fas および Le^y抗原の発現について

—Flow cytometry による解析—

西 澤 聡 沼 部 幸 博 鴨 井 久 一

日本歯科大学歯学部歯周病学教室（主任：鴨井久一教授）

〔受付：平成 8 年 7 月 31 日，受理：平成 9 年 1 月 30 日〕

Fas and Le^y antigen expression in polymorphonuclear leukocytes.

—flow cytometric analysis—

Satoshi Nishizawa, Yukihiro Numabe and Kyuichi Kamoi

Department of Periodontology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

(Chief : Prof. Kyuichi Kamoi)

2-3-16, Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

[Received on July 31, 1996 ; Accepted on January 30, 1997]

Key words : apoptosis/Fas/Le^y/PMN/saliva/TNF- α

Abstract : Recently, it has been suggested that apoptosis of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) plays a role in the regulation of inflammation (e. g., periodontitis). The present study investigated the relationship between cytokine produced during the course of inflammation and the apoptosis induction of PMNs. Peripheral blood PMNs (BPMNs) and salivary PMNs (SPMNs) were isolated from eight volunteers and treated with PBS, non heat-treated saliva, heat-treated saliva, TNF- α or PMA for 0, 3 hours at 37°C. The sample was examined for apoptosis receptor expression and apoptosis expression on cell surfaces by indirect immunofluorescence using anti-human Fas monoclonal antibody and anti-human Le^y monoclonal antibody. The fluorescence intensity of 5,000 cells in each sample was measured using a flow cytometer and the percentage of FITC positive cells was calculated. The % of Fas-positive cells were almost the same in BPMNs and SPMNs at 0 h. In BPMNs, saliva, TNF- α and Fas extremely increased Fas receptor expression on cell surfaces at 3 h. The % of Le^y-positive cells was higher in SPMNs than in BPMNs at 0 h. In BPMNs, saliva, TNF- α and Fas increased Le^y antigen expression at 3 h, but heated saliva did not it. In SPMNs, Le^y antigen expression was not increased in PBS and the serum group at 3 h compared with that at 0 h. These findings suggest that apoptosis of PMN may be induced by cytokines such as TNF- α in periodontal tissue and induced by stimulation of saliva in the oral cavity.

抄録：近年，炎症の制御における PMN のアポトーシスの関与が報告されている。

本研究では，末梢血 PMN と唾液 PMN を対象とし，周囲の環境とアポトーシス関連抗原の発現との関係を検索し，口腔領域の免疫機構での PMN のアポトーシス発現の可能性について考察した。

健常者の末梢血と唾液から PMN を分離し，PBS，血清，唾液，熱処理唾液，PMA，TNF- α ，Fas 抗体で 3

時間培養した。そしてその前後の PMN における Fas 抗原および Lewis Y (Le^y) 抗原の発現を、間接蛍光抗体法を用い、Flow cytometry で検索した。その結果、以下のことが示された。

1. 末梢血 PMN では、唾液、TNF- α 、Fas 抗体の刺激で Fas 抗原の発現が増加し、血清、唾液、TNF- α 、Fas 抗体の刺激で Le^y 抗原の発現が増加する。

2. 分離直後の唾液 PMN では、Fas 抗原の発現は分離直後の末梢血 PMN と同じ傾向だが、Le^y 抗原の発現は有意に高い。

よって、PMN は終焉の時に、唾液やサイトカインなどの影響を受け、アポトーシスが発現している可能性が示唆された。

緒 言

多形核白血球 (Polymorphonuclear leukocyte: PMN) は、遊走、貪食、殺菌作用の他に、各種のサイトカインの産生を行うなど、宿主防御機構の第一線で機能している¹⁾。しかしその反面、炎症巣などで細胞死に至ると(壊死)自己融解し、酵素などの産物を周囲組織に放出、組織の構成要素を傷害することが知られている²⁾。これは PMN の細胞としての終焉が、組織破壊と密接な関連を持つことを意味している。つまり PMN の局所への集積は、病原因子の駆逐の他に、病変の進行を助長する反対の側面を持っている。

口腔領域では、PMN は歯肉固有層の毛細血管より遊走し、接合上皮内を通過して歯肉溝、そして口腔内に移行する。その道程で細胞は周囲の環境により様々な影響を受け、宿主防御機能が低下していることが知られており、その機能変化と歯周炎の成立との関連に焦点を合わせた研究が増加している³⁾。

近年、細胞死の過程にある PMN は、壊死でなく制御された細胞死、すなわちアポトーシスに誘導されること、その結果細胞が周囲のマクロファージにより速やかに貪食され、細胞融解による周囲組織の傷害を抑制する、一種の炎症制御システムがあることが報告された⁴⁾。

アポトーシスは、クロマチンの凝集、細胞核の断片化、細胞表面の微絨毛の消失、細胞質の凝縮、そして染色体 DNA の断片化を伴うプログラムされた細胞死 (programmed cell death) と定義されている⁵⁻⁸⁾。そしてアポトーシスは様々な生命現象の中で発現する。前述したアポトーシスと炎症の調節機構との関連は全身の各臓器の組織中でも成立している^{9,10)}。歯周組織の場合、組織構造の特殊性、微生物の常在、歯肉溝滲出液 (GCF: Gingival crevicular fluid) および唾液の存在など、多くの因子が炎症の成立に関与していることから、他の組織とは異なったアポトーシス細胞と周囲組織との関係が考えられる。

近年、アポトーシスの検索手技として、これまでの形

態学的手法、生化学的手法に加え、細胞表面のアポトーシス発現の関連抗原を、免疫学的に検索する手法が開発されてきた¹¹⁻¹⁷⁾。これはすべてのアポトーシスが従来の検索方法で検出できるとは限らないこと、そして形態学および生化学的手法に加え、アポトーシスに特有な蛋白質や遺伝子などのマーカーの発現を検索する必要性が生じてきたことが、理由としてあげられる。

そこで本研究では、アポトーシスの誘導と関連がある Fas 抗原、そしてその誘導過程で発現する Lewis Y (Le^y) 抗原の細胞表面上の動態に着眼した。そしてそれらを細胞計量学的に検出する手法として Flow cytometry を用い、末梢血中の PMN (BPMNs) と、歯肉固有層の毛細血管より歯肉上皮を経て唾液中に移動後に役割を終える PMN (SPMNs) での各抗原の発現状態を検索した。さらに血清、唾液、アポトーシスの誘導と関連の深い TNF- α や Fas 抗体の存在下での各抗原の発現との関連も検索し、PMN 周囲の環境とアポトーシス関連抗原の発現との関係を考察した。

材料および方法

1. 被験者の選択

全身疾患を伴わず、過去 3 カ月間各種薬剤の服用経験がなく、歯周病を有さない健康な男性 5 名、女性 1 名(平均 34.5 歳)の協力を得た。また、全員非喫煙者とした。

2. 末梢血からの多形核白血球 (BPMNs) の分離

静脈血 10 ml をヘパリンナトリウム加真空採血管 (ベノジェクト II 真空採血管, TERUMO, 東京) に採取した。その後 PMN の分離層を不連続密度勾配法を用いて得た。すなわち、サンプルチューブ (2037, Falcon, U. S. A.) に Mono poly resolving medium (ICN Biomedicals, U. S. A.) を 3 ml、血液を 3.5 ml 均等に分注し、300G で 30 分間遠心分離した。得られた PMN と血清の分離層をそれぞれサンプルチューブ (25319, Corning, U. S. A.) に移し、PMN の入ったサンプルチューブにリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) 8 ml を加え、200G で

10 分間遠心分離, PMN の沈澱を得た。その後上清を捨て, PBS にて 1.0×10^6 cells/ml の細胞数に調製し, 以下の実験に用いた。

3. 唾液からの多形核白血球 (SPMNs) の分離

含嗽液後の各溶液より PMN を分離する方法は, Ashkenazi ら¹⁸⁾の方法を用いた。

被験者は, 最初に 0.1%ゼラチン加 Hank's balanced solution (Ca^{2+} and Mg^{2+} Free, HBSS-CMF, PH 7.4) を 15 ml/ 口腔内に含み, 30 秒間含嗽した。そして 100 ml の HBSS-CMF を含んだポリプロピレン容器に含嗽液を移す過程を, 合計 400 ml になるまで約 30 分間, 20 回続けた。含嗽後の採取溶液を 10 分間攪拌し, サンプルチューブ (Corning 25331, Corning, U. S. A.) に移し, 室温で 5 分間, 200G で遠心分離した。その後上清を捨て, 上皮細胞, PMN などを含む沈渣を HBSS-CMF 中に再浮遊させ, その溶液を 20 μm のナイロンメッシュ, ついて 10 μm のナイロンメッシュにて濾過した。この過程で, 剥離上皮細胞は除外され, PMN を含む HBSS-CMF 溶液を得た。さらにこの溶液を, 250G で 10 分間室温で遠心分離, 沈渣をゼラチンを含まない HBSS-CMF 溶液および PBS (pH 7.2) で再洗浄し, 細胞数が最終的に 1 ml 中に 1.0×10^6 個となるように調製した。

4. 唾液の採取および熱処理

全唾液 3 ml をサンプルチューブに採取後, 400G で遠心分離, 上清を採取, 使用した。また, その上清を 60°C の恒温槽で 40 分間インキュベートし, 室温に戻したものを熱処理唾液として使用した。

5. 分離細胞数の計測と多形核白血球の同定

分離した 1 ml 中の各 PMN 数の計測には Hemacytometer (Clay Adams U. S. A.) を用いた。そしてそれらが PMN であることの確認にはギムザ染色を用い, 1. 白血球細胞中に分葉核が観察できること, 2. 細胞質中に顆粒が観察されることの 2 点を評価基準とした。

6. PMA, $\text{TNF-}\alpha$, Fas の濃度および作用時間の設定

PMA, $\text{TNF-}\alpha$, Fas において, それぞれ 0, 1, 10, 50, 100, 1,000 ng の濃度で PMN を 0, 1, 3, 6 時間インキュベート後に Flow cytometry にて検索, 試適濃度および作用時間を決定した。

7. 各溶液, 薬剤およびサイトカインでの PMN の処理

1.0×10^6 cells/ml に調製された BPMNs の浮遊液 100 μl に, 100 μl の自家血清, 採取唾液の上清 100 μl , 採取唾液の上清を 60°C で 30 分間処理後のもの 100 μl , PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, SIGMA, U. S. A.) を 25 ng/ml, $\text{TNF-}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- α , Human, Recombinant, BACHEM, U. S. A.) を 100 ng/ml, 抗 Fas モノクローナル抗体 (CH-11, MBL, Japan) を 10 ng/ml の濃度で, さらに対照群として PBS 100 μl のいずれかを加え, 37°C のウォーターバス中で 3 時間インキュベート, 蛍光抗体法による検索を行った。また PMN の各処理前 (分離直後) の細胞群に対しても同様に検索した。これらの検索時には, 同一条件のサンプルを各群 3 本ずつ用意した。

8. 細胞生存率および死細胞率の測定

PMN の細胞生存率は, 採血後の生存率を, 0.4% Trypan blue (SIGMA, U. S. A.) による Trypan blue exclusion 法によって細胞分離直後に検索した。各溶液や試薬とインキュベート後の死細胞率は, Baird ら¹⁹⁾の方法に従い, Propidium iodide (SIGMA, U. S. A.) (以下 PI と略す) を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で各サンプルチューブに加え, 5 分後に Flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson, U. S. A.) で計測, 全計測細胞中の PI 陽性細胞群 (死細胞) の率を算出し, 死細胞率とした。

解析は各条件下それぞれ 3 本ずつのサンプルチューブに PMN を分注した後にいき, その平均値を算出した。

9. Fas 抗原の解析

アポトーシスのレセプターである細胞表面の Fas 抗原の存在^{11,13)}を, 抗ヒト Fas モノクローナル抗体を使用した間接蛍光抗体法で検索した。

各サンプルチューブに PMN 100 μl , PBS 100 μl , 精製 IgM 抗 Fas モノクローナル抗体 (CH-11, MBL, Japan) を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加え, 4°C で 30 分間, インキュベートした。そして, 各サンプルチューブに 4°C の PBS を加え反応を止め, 400G で 10 分間, 4°C で遠心分離した。その後上清を捨て, 二次抗体として PBS で 30 倍に希釈した FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を 100 μl 加え, 攪拌後 4°C で 30 分間, インキュベートした。その後, 各サンプルチューブに 4°C の PBS を加え反応を止め, 400G で 10 分間, 4°C で遠心分離し上清を捨て, 4°C の PBS 1 ml 中に細胞を再浮遊させ測定まで 4°C で保存した。

Fig. 1 Typical pattern of counter map (left) and histogram of fluorescence intensity (right) on Flow cytometer. M2 means a area of positive cells (about 30%).

10. Le^y抗原の解析

アポトーシスの発現マーカーである細胞表面の糖鎖抗原の Le^y抗原の発現¹⁷⁾を、精製 IgM 抗 Lewis Y (Le^y) モノクローナル抗体 (BM-1/JIMRO, Japan) を使用した間接蛍光抗体法で検索した。

各サンプルチューブに PMN 100 μ l, PBS 100 μ l, 抗ヒト Le^y抗原モノクローナル抗体, (JIMRO, 大塚製薬, JAPAN) を 20 μ g/ml の濃度で加え, 4°C で 30 分間インキュベートした。そして, 各サンプルチューブに 4°C の PBS を加え反応を止めた後, Fas 抗体の場合と同じく, FITC 標識 2 次抗体による処理を行い, 4°C の PBS 1 ml 中に細胞を再浮遊させ測定まで保存した。

11. Flow cytometry 解析

蛍光強度の解析は, Flow cytometer である FACScan (Becton Dickinson, U. S. A.) を使用した。また解析ソフトは Lysis II (Becton Dickinson, U. S. A.) を使用した。Flow cytometer のフローセル中を通過する細胞浮遊液に 488 nm のアルゴンレーザーを照射し, 前方散乱光および側方散乱光で得られた各細胞群のサイトグラムから, 細胞分離時に混入したわずかな血小板, リンパ球, 単球, 赤血球を, さらに唾液中の PMN の場合は剝離上皮細胞, 食物残渣などをゲーティングにより排除し, PMN のみを計測対象に絞り, ゲーティング範囲内の細胞数が 5,000 個となるまで計測を行った。そして得られた各ヒストグラムより, 全計測細胞中の蛍光染色陽性の細胞群の比率, 平均蛍光強度のピークを算出した (Fig. 1)。

12. 統計学的検索

得られた各群のデータを対応のない t 検定 (Unpaired t test) により有意差検定し, 各条件下での細胞集団の Fas および Le^yの発現状態を比較検討した。

結 果

1. 末梢血および唾液より分離した PMN の細胞生存率

末梢血より分離された細胞は, 99% の純度で PMN で, また Trypan blue exclusion 法による細胞生存率は, 平均 98.6% であった。唾液中より分離された細胞は, 95% の純度で PMN で, 細胞生存率は, 平均 85.3% であった (Table 1)。

2. 各試薬の濃度の設定と作用時間の設定 (Fig. 2, 3)

3 時間のインキュベートで, PMA, TNF- α , Fas の濃度設定を変化させると, PMA は 100 ng を越えると死細胞率が増加し, 計測可能な細胞数が極度に減少した。そして計測が困難となった。TNF- α , Fas では, 濃度依存的に抗原の発現量が上昇したが, TNF- α では 100 ng, Fas では 10 ng において蛍光強度の上昇が緩やかとなった (Fig. 2)。この結果を受けて決定した試適濃度における Fas の蛍光強度の経時変化を Fig. 3 に示す。6 時間では, Fas と TNF- α の値はさらに上昇した。これにより本研究では 3 時間にインキュベート時間を設定した。

Table 1 % of Living Cells and % of Dead Cells

% of Living Cells (0h)	
BPMNs	98.6±0.5
SPMNs	85.3±7.8

% of Dead Cells (after 3h treated with each reagent)				
	PBS	Serum	Saliva	Heated Saliva
BPMNs	7.9±2.3	0.9±0.1	23.2±2.3	13.5±1.1
SPMNs	65.2±3.8**	57.4±1.0**		

% of Dead Cells (after 3h treated with each reagent)			
	PMA	TNF- α	Fas
BPMNs	31.4±0.5	25.2±1.12	18.5±2.2
SPMNs	85.0±6.6**		

Cell viability in each group was assessed using Trypan blue exclusion method and % of Dead Cells in each sample was assessed using propidium iodide (PI) and Flow cytometer.

Each value represents the mean±S. D.

The data was statistically analyzed using Unpaired Student's t test.

** : p<0.01 BPMNs vs SPMNs

Fig. 2 % of Fas positive cells in BPMNs by different concentration of reagents.

Fig. 3 Time kinetics of % of Fas positive cells in BPMNs.

3. Fas 抗原の Flow cytometry による解析結果 (Table 2)

1) BPMNs 群

分離直後の細胞陽性率の平均は $9.8 \pm 1.0\%$ を示した (Fig. 4)。

3 時間インキュベート後の各群の陽性細胞の割合は、Fas 群で 32.3% と最も高く、TNF- α 群、唾液群、熱処

理唾液群、PMA 群、PBS 群の順に低下し、血清群で最も低い値を示した (Fig. 4)。そして PBS 群と、血清群を除くすべての群との間に、危険率 5% または 1% 以下で統計学的有意差が認められた。

2) SPMNs 群

分離直後の細胞陽性率の平均は $8.4 \pm 4.1\%$ を示した (Fig. 5)。

Table 2 The relationship between % of Fas positive cells in BPMNs and SPMNs after 0h or 3h incubation with each reagent.

	PBS	Serum	Saliva	Heated Saliva
BPMNs	5.7±5.5	2.5±2.0	22.1±2.0	14.6±4.4
SPMNs	5.7±5.1	10.6±2.3*		

	PMA	TNF- α	Fas	0h after isolation
BPMNs	13.5±3.5	29.6±13.5	32.3±8.8	9.8±1.0
SPMNs	N. A.			8.4±4.1

Each value represents the mean±S. D.

Mean±S. D.

N. A. : could not count enough cells.

The data was statistically analyzed using Unpaired Student's t test. * : $p < 0.05$, BPMNs vs SPMNs. **Fig. 4** % of Fas positive cells (BPMNs group)

After 0 and 3h incubation with each reagent. The fluorescence intensity of 5,000 cells in each sample was measured using a flow cytometer and % of Fas positive cells in total cells was calculated. The data was statistically analyzed using Unpaired Student's t test.

Each value represents the mean±S. D.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, compared with PBS group value.

インキュベート3時間後において、PBS群、血清群の陽性細胞の割合は、血清群でやや高い傾向を示したが(Fig. 5)、統計学的有意差は認められなかった。

4. Le^a抗原のFlow cytometryによる解析結果 (Table 3)

1) BPMNs群

分離直後の細胞陽性率の平均は $14.2 \pm 4.2\%$ を示した

(Fig. 6)。

3時間インキュベート後の各群の陽性細胞の割合は、Fas群で65.4%と最も高く、唾液群、TNF- α 群、血清群、PBS群、熱処理唾液群、PMA群の順に低下した(Fig. 6)。そしてPBS群と、血清群、熱処理唾液群を除くすべての群との間に、危険率1%以下で統計学的有意差が認められた。

Fig. 5 % of Fas positive cells (SPMNs group)
After 0 and 3h incubation with PBS or serum
Each value represents the mean $\pm$ S. D.

Table 3 The relationship between % of Le^y positive cells in BPMNs and SPMNs after 0h or 3h incubation with each reagent.

	PBS	Serum	Saliva	Heated Saliva
BPMNs	19.8 $\pm$ 2.5	21.4 $\pm$ 5.2	52.9 $\pm$ 4.0	19.0 $\pm$ 2.6
SPMNs	50.0 $\pm$ 4.8**	48.6 $\pm$ 0.7**		

	PMA	TNF- α	Fas	0h after isolation
BPMNs	4.3 $\pm$ 0.3	50.1 $\pm$ 1.8	65.4 $\pm$ 1.8	14.2 $\pm$ 4.2
SPMNs	N. A.			50.0 $\pm$ 4.9**

Each value represents the mean $\pm$ S. D.

N. A. : could not count enough cells.

The data was statistically analyzed using Unpaired Student's t test. ** : $p < 0.01$, BPMNs vs SPMNs.

2) SPMNs 群

分離直後の細胞陽性率の平均は $50.0 \pm 4.9\%$ を示した (Fig. 7)。

インキュベート 3 時間後の SPMNs 群では, PBS 群, 血清群の陽性細胞の割合は, PBS 群で高い傾向がみられた ($p < 0.01$) (Fig. 7)。

5. BPMNs と SPMNs 各群の細胞陽性率の関連

Fas 抗体の陽性細胞率を両群で比較すると, PBS 群の値はほぼ同じであったが, SPMNs 群の血清群で高い傾

向を示した ($p < 0.05$) (Table 2)。

また Le^y抗体の陽性細胞率では, BPMNs 群の唾液群, TNF 群, Fas 群において, SPMNs 群の PBS 群, 血清群の値に近い傾向を示した。PBS, 血清, 熱処理唾液群, PMA 群では, SPMNs 群の PBS 群と比較して統計学的有意に低い値を示した ($p < 0.01$) (Table 3)。

細胞分離直後の値は, Fas 抗体群では大きな差はなかったが, Le^y抗体群の SPMNs 群で統計的有意に高い傾向を示した ($p < 0.01$) (Table 2, 3)。

Fig. 6 % of Le^y positive cells (BPMNs group)

After 0 and 3h incubation with each reagent. The fluorescence intensity of 5,000 cells in each sample was measured using a flow cytometer and % of Le^y positive cells in total cells was calculated. The data was statistically analyzed using Unpaired Student's t test.

Each value represents the mean ± S. D.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, compared with PBS group value.

Fig. 7 % of Le^y positive cells (SPMNs group)

After 0 and 3h incubation with PBS of serum.

Each value represents the mean ± S. D.

6. PI による死細胞率の解析

1) BPMNs 群の所見

各条件下でのインキュベート 3 時間後の, PI

(Propidium Iodide) による細胞の変成 DNA の蛍光染色をもとにした死細胞解析の結果, PMA 群で死細胞率が高い傾向を示した。また反対に血清群では最も低い値を示し, 他群との間に危険率 1 % で統計学的有意差が認められた (Table 1)。

2) SPMNs 群の所見

各条件下でのインキュベート 3 時間後, PBS 群, 血清群, PMA 群それぞれにおいて, 死細胞率が高い傾向にあり, 特に PMA 群では 85% 近い死細胞率を示し, 細胞数の減少などから Fas および Le^y 抗原の検索には使用できなかった (Table 1)。

考 察

1. アポトーシス研究における Fas 抗原, Le^y 抗原検出の意義について

1989 年, Yonehara ら¹¹⁾によりアポトーシスを誘導するレセプター分子として細胞膜表面の Fas 抗原が発見され, この抗原に Fas リガンドが結合することがアポトーシスの発現と関連する可能性が報告された^{11,13)}。この際, Fas に対するモノクローナル抗体が, 細胞致死活性を有していることも報告された。この Fas リガンドは

TNF ファミリーに共通する構造を有していることも報告されている²⁰⁾。このことから炎症の発症から進行、収束までに関与するTNFが、Fasも属しているTNF/NGFレセプタースーパーファミリーのひとつの細胞表面タンパク質と結合することで、アポトーシスと関連する可能性が考えられている。よって、Fas抗体やTNFの影響下でのPMN表面のFas抗原の発現を検索することにより、炎症の成立過程を、PMNのアポトーシスの発現の意義と関連づけて再考することができると思われる。

さらにアポトーシスが発現する過程の細胞の特徴として、これまでの形態学的、生化学的特徴に加えて、細胞膜表面の糖鎖抗原であるLe^xの発現の上昇が報告されている¹⁷⁾。これはウイルス性肝炎の急性期や憎悪期の患者、後天性免疫不全症候群の患者の末梢血Tリンパ球の膜上に強く発現することで知られていたもので²¹⁾、1993年、Hiraishiら¹⁷⁾によりアポトーシス細胞に現れるサインの1つであると報告された。よってこのLe^xの発現状態の検索は、従来の形態学的または生化学的検索方法に加え、アポトーシスの発現を類推する一手段と考えることができる。

そこで本研究ではPMNのアポトーシス発現能力の評価のためにFasを、アポトーシス発現状態の評価のためにLe^xを検索対象とし、PMNの歯周組織周辺での死の意義について考察を試みた。

2. 末梢血中のPMN (BPMNs) と唾液中のPMN (SPMNs) のアポトーシス発現について

本実験の結果で興味深いものの1つに、BPMNsを唾液やTNF- α 、Fas抗体でインキュベートすると、Fas抗原の発現量が増加し、その量はSPMNsのFas発現量を大きく上回ることがあげられる。これはFasリガンドやTNF- α と同じく、唾液もFas抗原の発現の誘導能力を持つことを示唆している。また、分離直後のSPMNsではFasの発現量と比較して、Le^xの発現量が高いことが示された。熱処理後の唾液にはFas抗原を発現させる作用がみられないことから、その成分は酵素である可能性も考えられる。近年、微生物の産物が細胞のアポトーシスを誘導することが報告され²²⁾、微生物由来の酵素や代謝産物、毒素などがアポトーシス機構と関連することも考えられている。またサイトカインがPMNに様々な機能を発現させることが知られている現在²³⁾、TNF- α 以外のサイトカインとアポトーシスの発現との関連の検索が今後の課題となると思われる。

3. SPMNsのアポトーシス発現の意義について

SPMNsは、歯肉固有層内の毛細血管中を流れているPMNが血管壁から周囲組織内に遊出し、歯肉の接合上皮中を通過後、歯肉溝から口腔内に移行したものである。よって、その過程で周囲の環境より様々な影響を受け、細胞自体の活性は低下していることが報告されている^{2,3)}。すなわち、これらの細胞はその寿命が終わりに近づき、細胞死へと向かっている。歯周組織周辺でも細胞の壊死、融解が生じると、酵素などの細胞の内容物が周囲に放出され、歯肉上皮や歯肉結合組織が傷害される。この事態を回避するために、PMNのアポトーシスへの誘導と、他の食細胞による速やかな貪食がある。この場合、アポトーシス細胞の細胞表面におけるビトロネクチンレセプターの発現が、マクロファージによる認識と貪食を容易にすることが報告されている⁴⁾。本研究で、SPMNsではFas抗原の発現量が少なく、Le^xの発現量が高かったことは、すでにSPMNsの細胞がアポトーシスへと誘導されている可能性を示唆している。よってSPMNsは、“食される”細胞としての準備が整っているものと考えられる。本研究で使用したSPMNsの分離法は、実際歯肉溝から遊走してきた直後の細胞を捕らえているので、アポトーシスは、実際は歯肉上皮内や歯肉固有層内で発現している可能性も考えられる。これは歯周組織中での過剰な炎症反応の抑制機構の一部であるとも考えられる。今後形態学的、生化学的検索を加えて、歯周病患者のSPMNsのアポトーシスの誘導状態を検索することで、炎症組織中でのPMNのアポトーシスの発現状態を知ることができるものと思われる。

以上のことから、口腔内や歯周組織中では、周囲の環境因子によりPMNにFasやLe^xの発現が高まり、アポトーシスが誘導されている可能性が示唆された。

結 論

健常者の末梢血および唾液からPMNを分離し、各条件下で3時間インキュベートした前後のFas抗原、Le^x抗原の発現状態を比較したところ、以下の結果を得た。

1. 唾液、TNF- α 、Fas抗体は、末梢血中のPMN (BPMNs) に対し、アポトーシスのレセプター分子であるFas抗原の発現を増加させた。

2. 血清、唾液、TNF- α 、Fas抗体は、BPMNsに対し、アポトーシス誘導のマーカーであるLe^x抗原の発現を増加させた。

3. 分離直後のBPMNsでは、Fas抗原、Le^x抗原の発現は比較的低い値にあった。

4. 分離直後の唾液中の PMN (SPMNs) は, Fas 抗原の発現は低い, Le^x抗原の発現は統計的に有意に高い値にあった。そしてその傾向は, PBS および血清でのインキュベート後もほとんど変化がなかった。

以上のことより, 唾液や歯周組織中に存在する PMN が, 周囲の環境因子によってアポトーシスに誘導されていることが推測され, このことが生体防御システムの恒常性を維持している可能性が示唆された。

文 献

- 仙道富士郎：特集に寄せて一好中球研究の新たな展開。細胞 26 : 122~123, 1994.
- Miyasaki, K. T. : The Neutrophil : Mechanisms of Controlling Periodontal Bacteria. J. Periodontol. 62 : 761~774, 1991.
- 沼部幸博, 清信浩一, マークライダー, 鴨井久一：口腔領域における多形核白血球貪食機能の検索—フローサイトメトリーによる解析—。歯基礎誌 36 : 274~288, 1994.
- Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N. and Haslett, C. : Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Nature 343 : 170~173, 1990.
- Majno, G. and Joris, I. : Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. J. Pathol. 146 : 3~15, 1995.
- Hockenbery, D. : Defining Apoptosis. J. Pathol. 146 : 16~19, 1995.
- 武井 寛, 渡辺白告, 仙道富士郎：好中球の細胞死。細胞 26 : 130~135, 1994.
- 仙道富士郎, 武井 寛, 土田秀也, 武田裕司, 加藤智幸, 渡辺白告：好中球のアポトーシス—その多様性と制御機構。臨床免疫 27 : 416~422, 1995.
- Grigg, J. M., Savill, J. S., Sarraf, C., Haslett, C. and Silverman, M. : Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs. The Lancet 338 : 720~722, 1991.
- 蓮沼智子, 住田孝之, 西岡久寿樹：慢性関節リウマチにおける Fas 依存性アポトーシスの機序とその意義。臨床免疫 27 : 1323~1327, 1995.
- Yonehara, S., Ishii, A. and Yonehara, M. : A Cell-killing Monoclonal Antibody (Anti-Fas) to a Cell Surface Antigen Codownregulated with the Receptor of Tumor Necrosis Factor. J. Exp. Med. 169 : 1747~1756, 1989.
- Liles, W. C. and Klebanoff, S. J. : Regulation of Apoptosis in Neutrophils-Fas Track to Death ? The American Journal of Immunology 157 : 3289~3291, 1995.
- 米原 伸：アポトーシスと免疫系。別冊日経サイエンス 110 : 66~77, 1995.
- 岡崎俊朗, 沢井宏文, 堂前尚親：Fas を介するアポトーシスにおけるセラミドの役割。臨床免疫 27 : 1008~1012, 1995.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Bino, G. D., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota P. and Traganos, F. : Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. Cytometry 13 : 795~808, 1992.
- Ormerod, M. G., Sun, X., Brown, D., Snowden, R. T. and Cohen, G. M. : Quantification of Apoptosis and Necrosis by Flow Cytometry. Acta Oncologica 32 : 417~424, 1993.
- Hiraishi, K., Suzuki K., Hakomori, S. and Adachi, M. : Ley antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). Glycobiology 3 : 381~390, 1993.
- Ashkenazi, M. and Dennison, D. K. : A New method for isolation of salivary neutrophils and determination of their functional activity. J. Dent Res. 68 : 1256~1261, 1989.
- Baird, M., Enosawa, S. and Heslop, B. : Evidence that changes in expression of major histocompatibility complex antigens may underlie the immunosuppressive effect of heat-treated cells in vivo and in vitro. Transplantation 53 : 1329~1333, 1992.
- Suda, T., Takahashi, T., Goldstein, P. and Nagata, S. : Molecular cloning and expression of the Fas ligand : a normal member of the tumor necrosis factor family. Cell 75 : 1169~1178, 1993.
- 小瀬戸隆, 柏木伸仁, 長野みゆき, 榎田 洋, 足立正一, 佐田通夫, 谷川久一：モノクローナル抗体 (BM-1) を用いた Two-Color Flow Cytometry によるヒト T 細胞に発現する Le^x糖鎖抗原の測定法について。臨床病理 39 : 627~632, 1995.
- Colotta, F., Re, Fabio., Polentarutti, N., Sozzani, S. and Mantovani, A. : Modulation of Granulocyte Survival and Programmed Cell Death by Cytokines and Bacterial Products. Blood 80 : 2012~2020, 1992.
- 向田直史：好中球活性化に関与するサイトカイン。臨床免疫 27 : 407~415, 1995.