リンフォカルト T 接種後の T 細胞の サブクラスの分布に関する研究

九州歯科大学口腔細菌学講座（指導：内山長司教授）

野 村 直 弘

昭和60年2月15日受付

Study of the Population of T-Cell Subclasses after Injection of Lymphocult T

Naohiro Nomura

Department of Oral Bacteriology (Director: Prof. Choji Uchiyama)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Mice were injected with lymphocult T, an activator of T-cells, into the gingiva. T-cells were isolated from submandibular lymph nodes and spleen separately at 7th, 10th and 14th days after the injection. T-cells isolated were tested for both cytotoxicity and Fc receptor positiveness and the proportion of each subclass was calculated. Monoclonal antibodies of Lyt 1, Lyt 2 and Lyt 3 were used in the cell selection of the former test, and IgM and IgG were used in that of the latter test.

Results obtained were as follows:

1. In submandibular lymph nodes, the percentage of Lyt 1 antigen positive cells decreased from 23.8 to 16.1 during the experimental period. In the cases of Lyt 2 and Lyt 3 antigens both percentages decreased from 22.6 to 14.9 and from 13.9 to 11.5, respectively.
2. In spleen, the percentage of Lyt 1 antigen positive cells decreased from 17.3 to 16.2. In the cases of Lyt 2 and Lyt 3 antigens both percentages decreased from 22.6 to 14.9 and from 13.8 to 6.9, respectively.
3. In submandibular lymph nodes the percentage of helper T-cell was calculated from Lyt 1, 2 and 3 positiveness as the range 17.3 to 16.3 and that of suppressor was 43.7 to 36.2.
4. In spleen the percentage of helper T-cell was calculated from Lyt 1, 2 and 3 positiveness as the range 17.3 to 16.3, respectively. Suppressor T-cell was dominant in number as compared with helper one in spleen.
5. The number of helper T-cell was recognized in the same or more by the calculation of positiveness of FC receptor as compared with that of suppressor T-cell in submandibular lymph nodes and spleen.
6. The number of cell matured to the specific subclassed one were more frequently

observed in submandibular lymph nodes than that in spleen.

This result showed that the cytotoxic test was more sensitive than the test of Fc receptor positiveness in the study of the classification of subclass of T-cell.

Key words : *Lymphocult T/Gingiva/Mice/Population of T-cell subclasses*

緒 言

歯周疾患の成立に関与する体液及び細胞免疫学的な報告は多数ある¹⁻⁵⁾。その中で歯肉の炎症成立後、歯周症に進行する過程に細胞免疫反応が関与する細胞媒介性過敏症のT細胞に関する報告は少ないようである。この歯周症の成立因子の一つに細胞媒介性過敏症があげられている。この細胞媒介性過敏症に関与するT細胞にはT細胞の亜集団(サブクラス)があり、そのT細胞の発生、分化^{6,7)}と多彩な免疫学的機能については十分に解明されていない。これらのT細胞のサブクラスはT細胞の細胞表面上に発現されるマーカーによって分類されている。古くは Stuck ら (1964)⁸⁾、Old ら (1965)⁹⁾により Thy 抗原はT細胞以外の脳組織や線維芽細胞に存在することや、TL 抗原は胸腺細胞に存在し、末梢T細胞に存在しないなどが報告された。これによってT細胞のThy 抗原はT細胞をB細胞から区別することによってT-B細胞間の相互作用が解明され、その後、Boyseら (1968)¹⁰⁾によって、Lyt 抗原は胸腺細胞を含めたTリンパ球にのみ特異的であることが見出された。

マウスのLyt 抗原はT細胞を3種類のサブクラスに分類することを可能にし、T-T細胞間の相互作用を解明する上で最も有効なマーカーとして、現在もなお細胞免疫学的に重要視されている。

Cantor ら (1975)¹¹⁾、(1976)¹²⁾はT細胞のLyt 抗原によりT細胞のサブクラスを分類し、さらに、T細胞のサブクラスをヘルパーTとサプレッサーTに分類されることを報告した¹³⁾。また、Huber ら (1976)¹⁴⁾は遅延型過敏症のT細胞のサブクラスの分類を細胞障害試験を用いて分類している。

最近では、T細胞のサブクラスのモノクローナル抗体が作製されるようになり、T細胞のサブクラスの検索が容易になった。Roland (1982)¹⁵⁾はT細胞のLyt 抗原のモノクローナル抗体を細胞障害試験に用いてT細胞のLyt 1, 2, 3 抗原をもつ表現型T細胞のサブクラスの分布を報告した。

一方、T細胞のサブクラスの分類にT細胞のIgM, IgG に対するレセプターが用いられた。Moretta ら

(1977)¹⁶⁾、矢田 (1979)¹⁷⁾はT細胞のサブクラスをIgM, IgG に対するレセプター陽性細胞を検索して、IgM レセプター陽性細胞をヘルパーTにIgG レセプター陽性細胞をサプレッサーTに分類して報告した。

このように、T細胞のLyt 抗原はT細胞を3種類のサブクラスに分類することが可能になったことは、歯周疾患の解明、しいては細胞媒介性過敏症のT-T細胞間の相互作用を解明する上で最も有効なマーカーとして細胞免疫学的に重要視されている。

これらのことから著者は、実験的にマウス歯肉にリンフォカルトT (T細胞活性物質)を接種して、歯肉組織内のT細胞及びマクロファージを活性化し、歯肉組織内の細胞媒介性過敏症のモデルを作り、歯肉組織内の細胞免疫反応に対する生体反応として、顎下リンパ節及び脾臓のT細胞のサブクラスの分布を経目的に検索してT-T細胞間の相互作用、T細胞とマクロファージの作用を細胞免疫学的に解明して興味ある結果を得たので報告する。

実験材料及び方法

I. 実験材料

A. 実験動物

動物は体重15~20gのICR系マウスを使用した。マウスは1週間以上飼育した後、実験に供した。

B. リンフォカルトT (Lymphocult T)

リンフォカルトT (Biotest 社製)は滅菌蒸留水50mlに溶解し、ミニポーフフィルター (Toyo Roshi co.) 0.45μmで濾過滅菌後、-20°Cで凍結保存し、実験時に解凍してマウスの両側歯肉に0.1mlを接種した。なお、リンフォカルトTは10μg/mlに調製して使用した。

C. ナイロンウール

ナイロンウール (和光社製) 0.8gを10ml用注射筒につめ、T細胞の分離に用いた。

D. モノクローナル抗体

T細胞のモノクローナル抗体は細胞表面抗原の表現型Lyt 1, 2, 3 抗原について、3種類の抗体 (Cedarlane Ltd)を使用した。

Lyt 1 抗原には抗マウス Lyt 1・1 モノクローナル抗体, Lyt 2 抗原には抗マウス Lyt 2・2 モノクローナル抗体と Lyt 3 抗原には抗マウス Lyt 3・1 モノクローナル抗体を使用した。

E. Fc レセプター抗血清

T細胞の Fc レセプター検出に用いた抗血清はウサギ抗 SRBC. IgG 抗体とウサギ抗 SRBC. IgM 抗体 (Serotec Ltd) を使用した。

F. モルモット補体

T細胞障害試験に用いた補体は Low-Tox マウスリンパ球用モルモット補体 (Cedarlane Ltd) を使用した。

II. 実験方法

A. 抗原接種

マウスの歯肉内接種は $10\mu\text{g/ml}$ に調整したリンフォカルト T 0.1ml をマウスの両側歯肉に接種し, 7 日目, 10 日目, 14 日目に撲殺して, 顎下リンパ節及び脾臓を摘出して実験に供した。

B. リンパ球の分離

顎下リンパ節及び脾臓のリンパ球の分離は, あらかじめプラスチックシャーレに生理食塩水 4ml を入れて準備した中に摘出した材料を入れ, ハサミ及びピンセットで細片して細胞浮遊液を作り, ピペティングをくりかえし行い細胞浮遊液とした。次に細胞浮遊液は小試験管で 10 分間静置して, その上清 (細胞浮遊液) 3ml をマウスリンパ球比重分離液 M-SMF (日本抗体研究所製) 3ml に重層して, 1200g , 20 分間遠沈後, リンパ球を分離して PBS で 3 回洗浄後約 $5 \times 10^7\text{cells/ml}$ になるように調整し, リンパ球浮遊液として以後の実験に供した。なお, 赤血球の除去は NH_4Cl ートリス溶液を使用した。

C. T細胞の分離 (ナイロンウール, カラム法)¹⁸⁾

ナイロンウール, カラムの調整は 0.8g のナイロンウールを 10ml 用注射筒の 6ml の目盛のところにくるようにつめ, アルミホイルで包み滅菌して保存した。

実施については

① カラムをスタンドにセットし, 注射針を先端に付け流量を調節した。

② Eagle's MEM (血清を含まない) 20ml をカラムに流す。

③ 10% ウシ胎児血清を含む Eagle's MEM を 20ml 流す。

④ 材料のリンパ球浮遊液は 10% ウシ胎児血清を含む Eagle's MEM に $5 \times 10^7\text{cells/ml}$ に調整した細胞浮

遊液を流し, 注射針の先端をコックする。

⑤ 37°C , 5% CO_2 を含む CO_2 インキュベーターで 45 分間静置する。

⑥ CO_2 インキュベーターから出し, 10% ウシ胎児血清を含む Eagle's MEM (37°C に加温) 20ml を流し, 溶出する細胞浮遊液を遠心管に入れ, T細胞浮遊液とした。また, T細胞浮遊液は PBS で 3 回洗浄し, 約 10^6cells/ml に調整し実験に供した。

D. T細胞の Fc レセプター検出法

抗体-SRBC 複合体 (EA) は 2% SRBC 1 容と抗 SRBC. IgG または IgM 1 容を 37°C , 30 分間反応させ GVB⁺ で 3 回洗浄後 EA 溶液とした。なお抗 SRBC. IgG または IgM の SRBC 凝集価は 4 倍であった。

実施については

T細胞浮遊液 0.1ml と 0.5% EA, 0.1ml を小試験管に入れ 37°C , 30 分間反応後, 1000rpm . 5 分間遠心して 4°C で一昼夜静置した後, チャンバーに入れロゼット形成細胞の百分率を求めた。

E. 細胞障害試験 (Cytotoxic test)¹⁹⁾

細胞障害試験は細胞表面にある Lyt 抗原に対する Lyt 抗体を反応させ, さらに補体を作用させて細胞を溶解させる反応である。このために Lyt 抗原と Lyt 抗体が特異的に反応するには, あらかじめ 5% ウシ胎児血清及び補体の細胞障害試験を調べた。

1) 補体の細胞障害試験

① 生理食塩水 0.05ml をインムノアッセイ用プレイト (96穴) に入れる。

② 補体 (Low-Tox マウスリンパ球用モルモット補体) 0.05ml を倍数希釈 ($\times 128$) した。

③ T細胞浮遊液 (約 10^6cells/ml) 0.05ml ずつを各プレイトに加えた。

④ 室温で 30 分間放置する。その後 37°C , 30 分間反応させた。

⑤ 反応終了後, 氷冷トリパンプルー液 0.1ml を入れた。

⑥ 検鏡してトリパンプルーを取り込んだ細胞と全体細胞数を算定した。補体の希釈倍数は C.I. (Cytotoxic index) で表示した。

2) 5% ウシ胎児血清と補体の細胞障害試験

① 5% ウシ胎児血清 0.05ml をインムノアッセイ用プレイト (96穴) に入れる。

② T細胞浮遊液 (約 10^6cells/ml) 0.05ml ずつを各プレイトに加えた。

③ 室温で 30 分間放置した。

④ 補体（各倍数希釈）0.05 ml ずつ加え、37°C、30 分間反応させた。

⑤ 反応終了後、氷冷したトリパンブルー液0.1ml を加えた。

⑥ 検鏡してトリパンブルーを取り込んだ細胞と全体細胞数を算定し 5% ウシ胎児血清加補体は C.I. (Cytotoxic index) で表示した。

F. モノクローナル抗体と補体による細胞障害試験

① 5% ウシ胎児血清加 Eagle's MEM 0.05ml をインムノアッセイ用プレート（96穴）に入れる。

② モノクローナル抗体（Lyt 1.1, Lyt 2.2, Lyt 3.1）0.05ml を倍数希釈（×16）して使用した。

③ T細胞浮遊液（約 10^6 cells/ml）0.05ml ずつを各プレートに加えた。

④ 室温で30分間放置した後、補体（希釈×8）0.05 ml ずつ加えた。

⑤ 37°C、30分間反応させ、反応終了後、氷冷した。

⑥ トリパンブルー液0.1ml を加え、検鏡してトリパンブルーを取り込んだ細胞と全体の細胞数を算定した。

各モノクローナル抗体による C.I. (Cytotoxic index) を表示した。

$$\frac{\% \text{死細胞 (検体)} - \% \text{死細胞 (対照)}}{100 - \% \text{死細胞 (対照)}} \times 100 = \text{C.I.}$$

Ⅲ. 実験成績

A. T細胞の分離

マウス歯肉内にリンフォカルト T 0.1ml を接種後、7日目、10日目、14日目の顎下リンパ節及び脾臓よりマウスリンパ球比重分離液（M-SMF）を用いてリンパ球を分離した。顎下リンパ節のリンパ細胞は 1.1×10^7 cells/ml と脾臓のリンパ細胞は約 8.2×10^7 cells/ml を得た。

次に顎下リンパ節及び脾臓のリンパ細胞からのT細胞

の分離はナイロンウール、カラム法（Ⅱ-C）を用い分離して、顎下リンパ節からのT細胞は約 4×10^6 cells/ml と脾臓からのT細胞は約 1.2×10^7 cells/ml を得た。

以上のことから、リンパ細胞浮遊液はナイロンウール、カラムを通過して得られた細胞数は顎下リンパ節が約 $\frac{1}{3}$ と脾臓は約 $\frac{1}{4}$ に減少したT細胞数を得た。

B. 補体及びウシ胎児血清加 Eagle's MEM の細胞障害試験

補体（Low-Tox マウス、リンパ球用モルモット補体）のT細胞に対する細胞障害試験の成績は Table 1, Fig. 1 に示すように、補体を生理食塩水で倍数希釈した2倍から16倍まではT細胞に対する細胞障害試験は陰性であったが、倍数希釈32倍は5.9%、64倍は17.5%、128倍は28.6%と補体の希釈倍数が大きくなるにしたがってT細胞の細胞障害も増加した。

次に、5%ウシ胎児血清加 Eagle's MEM に生理食塩水で補体を倍数希釈して添加した溶液のT細胞に対する細胞障害試験の成績は Table 1, Fig. 1 に示した。

Fig. 1 Cytotoxic test of T cells

Table 1 細胞障害試験

希 釈 数	× 2	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 128
補 体	0	0	0	0	5.9	17.5	28.6
補体 + 5%血清加 MEM	0.75	0.8	4.2	6.8	9.7	11.5	15.7

その結果、補体の倍数希釈に比例して、2倍は0.75%、4倍は0.8%、8倍は4.2%、16倍は6.8%、32倍は9.7%、64倍は11.5%、128倍は28.6%とT細胞に対する細胞障害は増加した。このように、5%ウシ胎児血清加

Eagle's MEM に倍数希釈した補体を添加した溶液と補体のみのT細胞に対する細胞障害試験成績から補体の希釈倍数は8倍、Cytotoxic index 4.2で以下の細胞障害試験に供した。

C. T細胞の細胞障害試験 (Cytotoxic test)

被検細胞 (T細胞) は顎下リンパ節及び脾臓からリンパ球の分離法 (II-B) で分離し, さらに, そのリンパ球浮遊液は, T細胞の分離法 (II-C) で分離した. T細胞は約 10^6 cells/ml に調整して実験に供した.

次に, モノクローナル抗体と補体による細胞障害試験 (II-F) により, 被検細胞 (T細胞) 中のT細胞表面抗原を有する表現型 Lyt 1, Lyt 2, Lyt 3 の検索を行った. また, 表現型抗原に対する3種類のモノクローナル抗体 (I-D) はT細胞の Lyt 1 抗原には抗マウス Lyt 1.1, Lyt 2 抗原には抗マウス Lyt 2.2 抗体, Lyt 3 抗原には抗マウス Lyt 3.1 抗体を使用した.

このように, モノクローナル抗体によって細胞障害を受けた細胞を表現型 Lyt 1, Lyt 2, Lyt 3 抗原を有するT細胞として検索した結果は Table 2, Fig. 2 に示す通りである. 脾臓のT細胞 Lyt 1 抗原を有するT細胞の7日目は17.3%, 10日目は17.5%, 14日目は16.2%と経日的にやや減少する傾向がみられた.

また, Lyt 2 抗原を有するT細胞の7日目は22.6%, 10日目は13.3%, 14日目は14.9%で, 7日目から10日目に急激に減少がみられたが, その後14日目はやや増加し

Fig. 2 Cytotoxic test of T cells

Table 2 脾臓及び顎下リンパ節における T 細胞のサブクラスの分布

	抗原	染色体	脾 臓			顎下リンパ節		
			7	10	14	7	10	14
ヘルパー T	Lyt-1	19	17.3	17.5	16.2	23.8	18.0	16.1
サプレッサー T	Lyt-2	6	22.6	13.3	14.9	31.3	24.6	24.7
	Lyt-3	6	13.8	10.7	6.9	12.4	13.9	11.5
Lyt-2 +Lyt-3 (%)			36.4	24.0	21.8	43.7	38.5	36.2
Lyt-2 +Lyt-3 /Lyt-1			2.1/	1.4/	1.4/	1.8/	2.1/	2.2/
検出細胞率 (%)			53.7	41.5	38.0	67.5	56.5	52.3

た. さらに, Lyt 3 抗原を有するT細胞は7日目は13.8%, 10日目は10.7%, 14日目は6.9%と経日的に減少傾向がみられた.

一方, 顎下リンパ節のT細胞のLyt 1 抗原を有するT細胞の7日目は23.8%, 10日目は18.0%, 14日目は16.1%と経日的に減少傾向がみられた. また, Lyt 2 抗原を有するT細胞の7日目は31.3%, 10日目は24.6%, 14日目は24.7%と7日目から10日目にやや急激な減少傾向がみられたが, 10日目, 14日目はほとんど変化なく同値で推移した. さらに, Lyt 3 抗原を有するT細胞の7日目

は12.4%, 10日目は13.9%, 14日目は11.5%と経日的にもほぼ同値で推移した.

以上を小括するとT細胞のLyt 1 抗原を有する細胞の分布は, 脾臓より顎下リンパ節にやや多数分布し, また, Lyt 2 抗原を有する細胞の分布も脾臓より顎下リンパ節にはるかに多く分布していた. さらに, Lyt 3 抗原を有する細胞の分布も脾臓より顎下リンパ節にやや多く分布している結果が得た. リンフォカルトTを歯肉接種した後の表現型Lyt 抗原を有する細胞は経日的にも脾臓より顎下リンパ節に多数分布する成績が得られた.

次に、T細胞のLyt 1抗原を有するヘルパーT細胞と、Lyt 2, 3抗原を有するサプレッサーT細胞の分布成績はTable 2に示す通りである。脾臓のヘルパーT細胞の分布は7日目に17.3%、10日目に17.5%、14日目に16.2%とほんのわずかの減少傾向がみられた。一方、サプレッサーT細胞は7日目に36.4%、10日目に24.0%、14日目に21.8%と経日的に徐々に減少傾向がみられた。脾臓のヘルパーT細胞に対するサプレッサーT細胞の分布の割合を比較すると、7日目に2.1倍、10、14日目に1.4倍であり、ヘルパーT細胞に対するサプレッサーT細胞は同値の比率を示した。

顎下リンパ節のヘルパーT細胞は7日目に23.8%、10日目に18.0%、14日目に16.1%とやや減少傾向がみられた。サプレッサーT細胞は7日目に43.7%、10日目に38.5%、14日目に36.2%と高値で経日的に徐々に減少傾向がみられた。顎下リンパ節のヘルパーT細胞に対するサプレッサーT細胞は7日目に1.8倍、10日目に2.1倍、14日目に2.2倍と経日的にヘルパーT細胞とサプレッサーT細胞の比率は増加傾向がみられた。

つぎに、被検細胞(T細胞)の中で表現型Lyt 1, 2, 3の抗マウス、モノクローナル抗体で細胞障害を受けた細胞の総数はTable 2に示す通りである。脾臓は7日目に53.7%、10日目に41.5%、14日目に38.0%と経日的に細胞障害を受けた細胞数は徐々に減少した。顎下リンパ節は7日目に67.5%、10日目に56.5%、14日目に52.3%と経日的に細胞障害を受けた細胞数はやや減少し

たが、被検細胞数の50%以上がT細胞の表現型Lyt 1抗原を有する細胞が分布している結果が得られた。

D. T細胞のFcレセプター(FcR)

被検細胞(T細胞)は顎下リンパ節及び脾臓から分離したT細胞を細胞障害試験に用いたと同様にT細胞は約 10^6 cells/mlに調整して実験に供した。FcRの検索はT細胞のFcRの検出法(Ⅱ-D)に従い、抗体-SRBC複合体の抗血清を用いて、ヘルパーT細胞の検出はウサギ抗SRBC-IgM、サプレッサーT細胞の検出はウサギ抗SRBC-IgGを用いて検索した。T細胞のFcRはTable 3, Fig. 3に示す通りである。

Fig. 3 Fc-Receptor of T cells

Table 3 脾臓及び顎下リンパ節におけるFcレセプター陽生細胞の分布

日 数	脾 臓			顎下リンパ節		
	7	10	14	7	10	14
ヘルパー T Fc レセプター IgM (%)	2.1	1.5	2.6	5.4	5.1	3.5
サプレッサー T Fc レセプター IgG (%)	1.8	1.7	2.1	3.9	4.3	3.3

脾臓T細胞のFcR-IgM(ヘルパーT細胞)の7日目は2.1%、10日目は1.5%、14日目は2.6%と、10日目にやや減少するが14日目は逆に増加傾向がみられた。また、T細胞のFcR-IgG(サプレッサーT細胞)の7日目は1.8%、10日目1.7%、14日目2.1%と7日目、10日目はほとんど同値で14日目にやや増加がみられた。

顎下リンパ節T細胞のFcR-IgM(ヘルパーT細胞)

の7日目は5.4%、10日目は5.1%、14日目は3.5%と7日目、10日目はほとんど同値であったが、14日目はやや急激に減少した。また、T細胞のFcR-IgG(サプレッサーT細胞)の7日目は3.9%、10日目は4.3%、14日目は3.3%と一時的に10日目に増加し、14日目には減少した。

以上を小括すると、T細胞のFcR-IgM, IgGとも顎

下リンパ節は脾臓の約2倍の検出率を示した。脾臓のFcRは経日的に徐々に増加する傾向がみられたが、顎下リンパ節のFcRは経日的に徐々に減少する傾向がみられた。

E. T細胞のサブクラスの分布

脾臓及び顎下リンパ節におけるT細胞のサブクラスの分布成績はTable 4, 5に示す通りである。T細胞のサブクラスの検出に用いた細胞障害試験はFcレセプターの成績よりヘルパーT及びサプレッサーTとも高値の検出成績が得られた。

脾臓及び顎下リンパ節のFcレセプターによるヘルパ

ーTはサプレッサーTよりやや高い分布成績が得られたが、細胞障害試験ではFcレセプターの検出成績の反対のサプレッサーTがヘルパーTより高い分布成績が得られた。このことは、サプレッサーTの表現型Lyt 2, Lyt 3 抗原を有する細胞の両者を加えたものであることが考えられる。

一方、歯肉に抗原物質を接種した後の脾臓及び顎下リンパ節のT細胞のサブクラスは脾臓のヘルパーT及びサプレッサーTより顎下リンパ節のヘルパーT及びサプレッサーTが高値で分布した成績が得られた。

Table 4 脾臓におけるヘルパー T とサプレッサー T の分布

日 数	脾 臓					
	ヘルパー T			サプレッサー T		
	7	10	14	7	10	14
Fcレセプター (%)	2.1	1.5	2.6	1.8	1.7	2.1
細胞障害試験 (%)	17.3	17.5	16.2	36.4	24.0	21.8

Table 5 顎下リンパ節におけるヘルパー T とサプレッサー T の分布

日 数	顎 下 リ ン パ 節					
	ヘルパー T			サプレッサー T		
	7	10	14	7	10	14
Fcレセプター (%)	5.4	5.1	3.5	3.9	4.3	3.3
細胞障害試験 (%)	23.8	18.0	16.1	43.7	38.5	36.2

総括ならびに考察

歯周疾患の成立に関与する細胞免疫学的な報告に、歯周組織及び免疫担当細胞に対する内毒素(LPS)の多様な病原性は病理学的及び免疫学的に検索されている²⁻⁵⁾。しかし、歯周疾患の初期の歯肉炎の治癒後、口腔の常在菌及び歯垢の抗原による歯肉炎の再発から歯周症に進行する過程で、歯周組織内で惹起される免疫応答は体液性免疫から細胞性免疫に移行してT細胞(感作リンパ球)がその主役を演じているといっても過言ではない。このT細胞(感作リンパ球)が歯周症の成立因子としての細胞媒介性過敏症が関与していることは知られている。このことはT細胞の発生、分化及び多彩な免疫機能をもつこと^{6,7)}、T細胞には3つの亜集団(サブクラス)が存在すること⁸⁻¹⁰⁾などがT細胞の細胞表面上に発現される

マーカーによって分類されていることから理解ができる。しかしながら、T細胞が多彩な機能とマーカーをもつT細胞のサブクラスであることから、これらの抗体を作製するには困難であり、また作製された抗体にも多くの問題を残したままであった。

最近、T細胞の3種類のサブクラスのモノクローナル抗体が作製されるようになり、T細胞のサブクラスの検索が容易になった。Roland (1982)¹⁵⁾はT細胞のLyt 1, 2, 3 抗原をもつ表現型T細胞のモノクローナル抗体を用いて、胸腺摘出マウスの脾臓及びリンパ節のT細胞のサブクラスを細胞障害試験を用いて報告した。これらのことから著者は、実験的にリンフォカルトTをマウス歯肉に接種後、経時的に顎下リンパ節及び脾臓のT細胞のサブクラスの分布をT細胞の抗Lyt 1, 2, 3 モノクローナル抗体を用いて検索した。その結果はRoland

の分布成績よりやや高い値を得られたが、脾臓のサブクラスの分布より顎下リンパ節のサブクラスの分布が高値を示した結果は著者の成績と同様であった。また、Huber ら (1976)¹⁴⁾ が遅延型過敏症の脾臓と顎下リンパ節のT細胞のサブクラスの検索をモノクローナル抗体を用いて検索した結果は、著者の分布成績と同様であった。このように、歯周組織における著者の細胞媒介性過敏症と Huber らの遅延型過敏症が生体に及ぼす影響でT細胞のサブクラスの分布は脾臓より所属顎下リンパ節に高い分布がみられる同様の成績であった。

つぎに、ヘルパーTとサプレッサーTについて、Cantor ら (1975)¹¹⁾, (1976)¹²⁾, Jandinski ら (1976)¹³⁾ はT細胞のLyt抗原により分類したT細胞のサブクラスの中で、Lyt 1 抗原をもつT細胞のヘルパーTとLyt 2, 3 抗原をもつT細胞のサプレッサーTの2種類に分類した。

著者の検索した脾臓及び顎下リンパ節ともヘルパーTよりサプレッサーTが多い分布を示したが、顎下リンパ節は脾臓よりヘルパーTとサプレッサーTとも多い分布成績が得られた。この成績は、Jandinski らが実験的過敏症で得た分布に類似した成績である。

つぎに、T細胞のヘルパーTとサプレッサーTの分類に用いられる抗SRBC, IgM, IgG レセプターについて Moretta ら (1977)¹⁶⁾, 矢田 (1979)¹⁷⁾ らはT細胞のサブクラスはLyt 1 抗原をもつ細胞で抗SRBC, IgM レセプター陽性細胞をヘルパーTとし、Lyt 2, 3 抗原をもつ細胞で抗SRBC, IgG レセプター陽性細胞をサプレッサーTの2種類に分類したが Raff (1971)²⁰⁾, 高津ら (1978)²¹⁾ によると、サプレッサーTの中にはキラーTとしての機能をもつ細胞が含まれていることを示唆している。これらの分類を考慮して著者の検索した脾臓では、ヘルパーTとサプレッサーTともほぼ同値の分布成績で推移したが、顎下リンパ節ではサプレッサーTよりヘルパーTがやや多い分布が得られた。矢田は、*in vitro* でT細胞をCon A で刺激した後、抗SRBC, IgM, IgGレセプターの成績と、臨床例による抗SRBC, IgM, IgG レセプターの分布成績を比較して、ヘルパーTとサプレッサーTとの分布がやや異なることを報告したが、T細胞の発生、分化の時点で複雑な問題があり、多彩な免疫機能をもつことからT細胞のサブクラスのLyt抗原とヘルパーT及びサプレッサーTの分布が一致しない点が考えられる。

著者の成績からも、T細胞のLyt抗原を用いたT細胞のサブクラスの分布成績と抗SRBC, IgM, IgG レセ

プターを用いた分布に異なった成績が得られた。しかし、抗SRBC, IgM, IgG レセプターを用いた分類と、T細胞のLyt抗原を用いた分類の共通した点は脾臓より顎下リンパ節のヘルパーT及びサプレッサーTが多数分布した成績が得られた。

このようなことから、T細胞のサブクラスの検索にはLyt抗原を有する細胞のモノクローナル抗体を用いた松橋ら (1983)¹⁹⁾ の抗体と補体による細胞障害試験が最も有効である結果を得た。

著者は、マウスの歯肉にリンフォカルトTを接種して歯肉組織内でT細胞の活性化とマクロファージの遊走を促進して、二次的に惹起されるT細胞の活性化によるリンフォカインの放出、そのリンフォカインによるマクロファージの遊走と活性化を行い、細胞免疫反応を活発にした。

細胞免疫反応を図示すると以下のとおりです。

実線はリンフォカルトTによる直接作用で、破線は二次的な作用が考えられる。このことは動物の歯肉に細菌抗原を接種した場合顎下リンパ節のT細胞は、1週目に正常値にもどるが、著者のリンフォカルトTを接種した群は1週目をピークに経日的に正常値となった。

また、著者の顎下リンパ節のT細胞のサブクラスの分布からもヘルパーTよりサプレッサーTが多数分布していることから歯周組織内のリンフォカルトTはT細胞とマクロファージの直接、間接反応とT-T細胞間反応の細胞媒介性過敏症様反応を示しているものと考えられる。しかしながら、口腔の歯周組織内で惹起する免疫反応は未解決の問題が山積しているのが現状で今後研究が期待されている。

結 論

実験的にマウス歯肉にリンフォカルトT (T細胞の活性物質) を接種して、歯肉組織内のT細胞及びマクロファージの活性化 (細胞媒介性過敏症) を計り、その歯肉組織内の細胞免疫反応に対する生体反応として、マウスを7日目、10日目、14日目に撲殺し、顎下リンパ節及び脾臓のT細胞のサブクラスの分布を細胞障害試験 (抗Lyt 1, 2, 3モノクローナル抗体) とFcレセプターIgM, IgGを用いて検索した。

その主な知見は次の通りである。

1. 顎下リンパ節のT細胞のサブクラスの分布は抗Lyt 1抗原は23.8%~16.1%, 抗Lyt 2抗原は22.6%~14.9%, 抗Lyt 3抗原は13.9%~11.5%と1週目を最高値に経日的に減少した.

2. 脾臓のT細胞のサブクラスの分布は, 抗Lyt 1抗原は17.3%~16.2%, 抗Lyt 2抗原は22.6%~14.9%, 抗Lyt 3抗原は13.8%~6.9%と1週目を最高値に経日的に減少した.

3. 顎下リンパ節のヘルパーTは, 23.8%~16.1%, 一方サプレッサーTは43.7%~36.2%で, ヘルパーTよりサプレッサーTが多く分布した.

4. 脾臓のヘルパーTは17.3%~16.2%, 一方サプレッサーTは36.4%~21.8%で, ヘルパーTよりサプレッサーTが多く分布した.

5. 脾臓及び顎下リンパ節のFcレセプターによるT細胞のヘルパーTはサプレッサーTよりやや多く分布した.

6. 抗原接種後のT細胞のサブクラスは脾臓より顎下リンパ節に多数分布した.

以上のことからT細胞のサブクラスの検索は, Fcレセプターのサブクラスを分類するより, 細胞障害試験(Lyt 1, 2, 3)に分類する方が有効であった.

稿を終るに臨み, 終始御懇篤なる御指導を賜った九州歯科大学口腔細菌学講座内山長司教授に深甚なる感謝の意を表します. また終始暖かい御協力をいただいた口腔細菌学講座の皆様に感謝の意を捧げます.

引用文献

- 1) Hausman, E. and Raisz, L.G. : Endotoxin stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* **168** : 862—864, 1970.
- 2) Snyderman, R. : Role for endotoxin and complement in periodontal tissue destruction. *J. Dent. Res.* **51** : 356—361, 1972.
- 3) 斉藤和久・河西信彦 : 内毒素の細胞障害作用, 細菌内毒素, 講談社, 東京, 1973, 394—403.
- 4) 中野昌康 : リポ多糖体の免疫学的活性, 蛋白質核酸酵素, 別冊細菌毒素研究 : 269—282, 1976.
- 5) 萩原俊明 : 実験的歯周炎における生体反応に関する研究 : 九州歯会誌 **35** : 205—220, 1981.
- 6) 垣生園子 : Ly 抗原とT細胞の分化, 代謝. **15** : 臨時増刊号, 1431—1437, 1978.
- 7) Raff, M.C. : Role of thymus-derived lymphocytes in the secondary humoral immune response in mice. *Nature* **226** : 1257—1258, 1970.
- 8) Stuck, B., Boyse, E.A., Old, L.J. and Garswell, E.A. : ML; a new antigen found in leukaemia and mammary tumours of the mouse. *Nature*. **203** : 1033—1034, 1964.
- 9) Old, L.J., Boyse, E.A. and Stockert, E. : The G (Gross) leukemia antigen. *Cancer Res.* **25** : 813—819, 1965.
- 10) Boyse, E.A., Miyazawa, M., Aoki, T. and Old, L.J. : Ly-A and Ly-B; two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse. *Proc. Roy. Soc. [Biol]* **170** : 175—193, 1968.
- 11) Cantor, H. and Boyse, E.A. : Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J. Exp. Med.* **141** : 1376—1389, 1975.
- 12) Cantor, H., Shen, F.W. and Boyse, E.A. : Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly component. II. activation by antigen : After immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated distinct T cell subclasses. *J. Exp. Med.* **143** : 1391—1401, 1976.
- 13) Jandinski, J., Cantor, H., Tadakuma, T., Peavy, D.L. and Pierce, C.W. : Separation of helper T cells from suppressor T cells Expressing different Ly components. 1. Polyclonal activation : Suppressor and helper activities are inherent properties of distinct T cell subclasses. *J. Exp. Med.* **143** : 1382—1390, 1976.
- 14) Huber, B., Gershon, D.R. and Cantor, H. : Cell-mediated immunity delayed-type hypersen-

- sitivity and cytotoxic are mediated by different T-cell subclasses. *J. Ext. Med.* **143** : 365—371, 1976.
- 15) **Roland, S.** : Adult thymectomy does not alter the proportion of T cells of the Ly 1. 2. 3. subclass. *Nature.* **300** : 529—531, 1982.
- 16) **Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P.M. and Cooper, M.D.** : Functional analysis of two human T-cell subpopulations : Help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. *J. Ext. Med.* **146** : 184—197, 1977.
- 17) 矢田純一 : IgM ないし IgG に対するレセプターの存在と T細胞サブセット. 代謝 **16** 臨時増刊号 : 1935—1942, 1979.
- 18) 松橋 直・成内秀雄・臼井美津子 : ナイロンウールカラム法, 生物化学実験法15. 学会出版センター, 東京, 1983, 175—177.
- 19) 松橋 直・成内秀雄・臼井美津子 : 抗体と補体による細胞障害試験, 生物化学実験法15, 学会出版センター, 東京, 1983, 189—190.
- 20) **Raff, M.C.** : Evidence for subpopulation of mature lymphocytes within mouse thymus. *Nature [New Biol]* **229** : 182—184, 1971.
- 21) 高津聖志・黒木 求 : サプレッサー T細胞の多様性. 代謝 **15** 臨時増刊号 : 1411—1420, 1978.