九州歯会誌 39(3): 370~378, 1985.

マウスT細胞のIgG サブクラスの分布に関する実験的研究

九州歯科大学口腔細菌学講座 (指導: 内山長司教授)

山 田 勲

昭和60年4月24日受付

Study of the Proportion of the Positiveness of IgG Subclass Antigens on T Cell of Mice

Isao Yamada

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

As a model system of gingivitis caused by the invasion of various antigens from dental plaque, two characteristic antigens, Lymphocult T (T cell-activator) and LPS (B cell-activator), were injected separately into gingiva of mice to induce an experimental gingivitis. Seventh day after the injection, cell suspensions were prepared from submandibular lymph nodes, spleen and peritoneal cavity and T cells were isolated from the suspension.

The cells were stained by fluorescent antibodies to IgG subclasses, IgG 1, IgG 2a and IgG 2b, and the positiveness of each IgG subclass antigen on the cell was measured.

The results obtained were as follows:

1. The antigens of IgG 1, IgG 2a and IgG 2b were recognized on the peritoneal T cell in the proportion of 42.2%, 39.5% and 34.9%, respectively.
2. In the case of Lymphocult T-injection, the antigens of IgG 1, IgG 2a and IgG 2b were recognized on T cell from submandibular lymph nodes in the proportion of 40.0%, 36.9% and 24.5%, respectively.
3. In the case of LPS-injection, the antigens of IgG 1, IgG 2a and IgG 2b were recognized on T cell from submandibular lymph nodes in the proportion of 42.4%, 33.3% and 24.4%, respectively.
4. In the case of Lymphocult T-injection, the antigens of IgG 1, IgG 2a and IgG 2b were recognized on T cell from spleen in the proportion of 25.4%, 25.0% and 19.5%, respectively.
5. In the case of LPS-injection, the antigens of IgG 1, IgG 2a and IgG 2b were recognized on T cell from spleen in the proportion of 35.1%, 33.3% and 30.4%, respectively.
6. In submandibular lymph nodes there is little difference in the proportion of the positiveness of IgG subclass antigens between the injection of Lymphocult T and that

of LPS. In spleen the injection of LPS brought the higher proportion of the positive-ness of three IgG subclass antigens than that in the case of Lymphocult T-injection.

7. Antigen positiveness on T cell was higher in both IgG 1 and IgG 2b than in IgG 2a in submandibular lymph nodes and also spleen.

Key words: *T cell/IgG subclass/Lymphocult T/LPS/mouse*

緒 言

歯周抗原による歯肉炎の成立及び初期の歯周疾患におけるマクロファージ及びリンパ球 (T, B細胞) の体液性免疫に関する報告は数多くある¹⁻³⁾。その中でも免疫担当細胞であるマクロファージとB細胞がプラズマ細胞に成熟して産生される免疫グロブリンに関する報告が多く、免疫担当細胞と共存状態で抗体産生の調節機構と感染防御機構の役割をもつT細胞に関する報告は少ないようである。

このT細胞にはT細胞の亜集団 (サブクラス) が存在し、そのT細胞の発生及び分化と多彩な免疫学的機能^{4,5)}については十分に解明されていない点が多い。このT細胞のサブクラスはCantorら (1976)⁶⁾によって、T細胞の細胞表面のLyt抗原によりヘルパーTとサブレッサーTに分類されたが、最近Roland (1982)⁷⁾、野村 (1985)⁸⁾はモノクローナル抗体を用いて表現型T細胞の3種類のサブクラスが存在することを報告した。

一方、T細胞のサブクラスに関しては、T細胞がIgM, IgGに対するレセプターをもっていることがわかり、Morettaら (1977)⁹⁾、矢田 (1979)¹⁰⁾らはT細胞のサブクラスを抗IgM, IgGのロゼット法により、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ブレッサーTに分類して報告した。

このように、T細胞のサブクラスの分布は、歯周疾患の成因としての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有効なマーカーとして重要視されているが、しかしながら、歯周疾患の歯周組織内に存在する免疫担当細胞のマクロファージ、B細胞、プラズマ細胞及びT細胞がある。これらの細胞は免疫グロブリンと共存状態にあり、T細胞の発生と分化及び多彩な免疫学的機能をもつことからT細胞の細胞表面のレセプターの変化に興味もたれる。

一方、正常マウス及びヒトの免疫グロブリンのIgGに対するサブクラスのIgG 1, IgG 2a, IgG 2bが存在することが報告されている。

このようなことから著者は、歯周抗原に対する歯周組織内の免疫反応を究明することを目的として実験的にマウスの歯肉にLymphocult T (T細胞活性物質) とLPS (B細胞活性物質) の2種類の抗原を接種して、7日後の顎下リンパ節及び脾臓のT細胞を分離した。そのT細胞をFITC標識抗マウスIgG 1, IgG 2a, IgG 2bの3種類を膜蛍光抗体染色法により、その分布を検索して興味ある知見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. 抗原

抗原はLymphocult T (Biotest社製) 及びE. coli 0111 B4 LPS (Difco) を使用した。

C. ナイロンウール

ナイロンウール (和光社製) はカラムにつめ、T細胞の分離に用いた。

D. 蛍光色素標識抗血清 (FITC 標識抗血清)

FITC 標識抗マウス血清 (Serotec Ltd. 社製) は分画されたFITC 標識抗マウスIgG 1, FITC 標識抗マウスIgG 2a, FITC 標識抗マウスIgG 2bの3種を使用した。

II. 実験方法

A. 抗原接種

マウス歯肉内接種にあたって、LPS (Difco) は生理食塩水で10 μ g/mlに調整して、0.1mlを接種した。一方、Lymphocult Tは滅菌蒸留水50mlで、10 μ g/mlに調整して、0.1mlを接種した。またマウス腹腔内接種はLymphocult T 2mlを接種し、3日後腹腔細胞を採取した。一方顎下リンパ節及び脾臓は7日後に撲殺して実験に供した。

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

備した中に材料を入れ、ハサミ及びピンセットで細片し、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に入れ10分間静置して、その上清（細胞浮遊液）3 ml をマウスリンパ球比重分離液 M-SMF（日本抗体研究所製）3 ml に重層して1200 g、20分間遠沈後、リンパ球を分離した。その後PBSで3回洗浄後、細胞は約 5×10^7 /ml になるように調整して以後の実験に供した。

なお、赤血球の除去は NH_4Cl -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）

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

実施法

1. カラムをスタンドにセットし、注射針を先端につけ流量を調節した。
2. 血清無添加 Eagle's MEM, 20ml をカラムに流した。
3. 10%ウシ胎児血清加 Eagle's MEM をカラムに流した。
4. 被検リンパ球浮遊液は10%ウシ胎児血清加 Eagle's MEM で 5×10^7 cells/ml に調整して、カラムに流し注射針の先端をコックした。
5. 37°C , 45分間, 5%, CO_2 インキュベーターで静置した。
6. CO_2 インキュベーターから取り出し、10%ウシ胎児血清加 Eagle's MEM, 20ml を流し、溶出した細胞浮遊液を PBS で3回洗浄後、T細胞を約 2×10^6 /ml に調整し実験に供した。

D. 腹腔細胞の分離

マウス腹腔内にリンフォカルト T 2 ml を接種し、3日後に腹腔滲出細胞を採取した。細胞の採取は血清無添加 Eagle's MEM で細胞を洗い出し、細胞数を約 5×10^6 /ml に調整した1 ml を滅菌カバーグラスを入れたプラスチックシャーレに分注して、 37°C , 30分間5% CO_2 インキュベーターで静置した。その後、カバーグラスを取り出し PBS で軽く洗浄し、ただちに膜蛍光法を行った。

E. 膜蛍光法 (Membrane immunofluorescence)

実験法はカバーグラス付着細胞と細胞浮遊液とは操作法が少し異なるが、細胞浮遊液について述べる。

1. 被検細胞（約 10^6 /ml）を PBS に浮遊させた。

2. 1000rpm., 5分間遠心後、上清を除いた。

3. FITC 標識抗血清 (IgG 1, IgG 2a, IgG 2b) 0.05ml を加え、よく混和後、室温で30分間放置した。

4. PBS で3回洗浄し、さらに7% BSA-生理食塩水で洗浄した。

5. 7% BSA-生理食塩水 0.05ml で細胞浮遊液を作り、スライドグラス上に塗沫、乾燥した。

6. 95%アルコールで2—3分間固定し、水洗、乾燥した。

7. グリセリン緩衝液を1滴のせ、カバーグラスをのせ、蛍光顕微鏡で検鏡した。

F. 膜蛍光二重染色法（オーラミンO）

このオーラミンOの二重染色法は細胞表面の抗原をもたない細胞（陰性細胞）を識別するために行った。

実験法は膜蛍光法（II-E）の順で1—4まで行い、次に、オーラミンO（Schmid社製）0.1mcg/ml 5分間染色して、PBSで3回遠沈洗浄し、さらに7% BSA-生理食塩水で洗浄した。

実 験 成 績

I. 腹腔細胞の分布

マウス腹腔内にリンフォカルトTを接種し、3日後の腹腔細胞の膜蛍光二重染色法（膜蛍光法とオーラミンO二重染色を言う）によるマクロファージとリンパ球の分布成績は Table 1 に示す通りである。

FITC 標識 IgG 1 膜蛍光二重染色による腹腔細胞の分布はマクロファージ77 (38.7%)、リンパ球84 (42.2%)、その他の細胞38 (19.1%)であった (Fig. 1)。

FITC 標識 IgG 2a 膜蛍光二重染色による腹腔細胞の分布はマクロファージ64 (49.6%)、リンパ球51 (39.5%)、その他の細胞14 (10.9%)であった (Fig. 2)。

FITC 標識 IgG 2b 膜蛍光二重染色による腹腔細胞の分布は、マクロファージ83 (38.6%)、リンパ球75 (34.9%)、その他の細胞57 (26.5%)であった (Fig. 3)。

このように、腹腔細胞を膜蛍光二重染色によって検索した分布結果は、マクロファージ41.3%と最も多く、リンパ球38.7%、その他の細胞20.1%の順であった。

II. 腹腔リンパ球の分布

マウス腹腔内にリンフォカルトTを接種した3日後の腹腔リンパ球の膜蛍光二重染色による分布成績は Table 2 に示す通りである。

FITC 標識 IgG 1, 膜蛍光二重染色によるリンパ球の分布は陽性細胞23 (27.4%)、陰性細胞61 (72.6%)

Table 1 The Morphological Population of Peritoneal Cells

Cells IgG subclass	total	macrophage	lymphocytes	other cells
IgG 1	199	77 (38.7%)	84 (42.2%)	38 (19.1%)
IgG 2 a	129	64 (49.6%)	51 (39.5%)	14 (10.9%)
IgG 2 b	215	83 (38.6%)	75 (34.9%)	57 (26.5%)
	543	224 (41.3%)	210 (38.7%)	109 (20.1%)

Positive peritoneal cells by membrane immunofluorescence

Fig. 1 Population of peritoneal cells by membrane immunofluorescent stain. (IgG 1)

Fig. 3 Population of peritoneal cells by membrane immunofluorescent stain. (IgG 2 b)

Fig. 2 Population of peritoneal cells by membrane immunofluorescent stain. (IgG 2 a)

Table 2 Population of Peritoneal Lymphocytes

Cells IgG subclass	Lymphocytes		
	total	positive	negative
IgG 1	84	23 (27.4%)	61 (72.6%)
IgG 2 a	51	24 (47.1%)	27 (52.9%)
IgG 2 b	75	30 (40.0%)	45 (60.0%)
	210	77 (36.7%)	133 (63.3%)

Positive lymphocytes by membrane immunofluorescence

であった。

FITC 標識 IgG 2 a 膜蛍光二重染色によるリンパ球の分布は陽性細胞 24 (47.1%), 陰性細胞 27 (52.9%)

であった。

FITC 標識 IgG 2 b 膜蛍光二重染色によるリンパ球の分布は陽性細胞 30 (40.0%), 陰性細胞 45 (60.0%)

であった。

このように、膜蛍光二重染色による陽性細胞は36.7%、陰性細胞は63.3%と陽性細胞より陰性細胞が多数分布している結果を得た。

また、抗血清別 (IgG 1, IgG 2a, IgG 2b) の分布では、IgG 2a 陽性細胞47.1%と最も多く、IgG 2b 陽性細胞40.0%、IgG 1 陽性細胞27.4%の順であった。

Ⅲ. 顎下リンパ節及び脾臓Tリンパ球の分布

A. リンフォカルトT接種群

マウス歯肉内にリンフォカルトTを接種して、7日後に撲殺した。細胞浮遊液からリンパ球の分離 (Ⅱ-B) を行い、さらにT細胞の分離 (Ⅱ-C) を行った。顎下リンパ節及び脾臓のT細胞を膜蛍光二重染色 (Ⅱ-E, Ⅱ-F) で検索した。

1. 顎下リンパ節のT細胞の分布

膜蛍光二重染色によるT細胞の分布はTable 3に示す通りである。FITC 標識 IgG 1 膜蛍光二重染色による分布は、陽性細胞28 (40.0%)、陰性細胞42 (60.0%) であった (Fig. 4)。

Table 3 Population of Lymphocytes of Lymph Node

Antigen IgG subclass	Lymphocult T	LPS
IgG 1	40.0%	42.4%
IgG 2a	24.5%	24.4%
IgG 2b	36.9%	33.3%
	33.3%	32.7%

Positive lymphocytes by membrane immunofluorescence

Fig. 4 Population of lymphocytes of lymph node by membrane immunofluorescent stain.

また、FITC 標識 IgG 2a 膜蛍光二重染色による分布は、陽性細胞22 (39.3%)、陰性細胞34 (60.7%) であった。FITC 標識 IgG 2b 膜蛍光二重染色による分布は、陽性細胞34 (36.9%)、陰性細胞58 (63.1%) であった。このように、IgG 1の陽性細胞40.0%と最も多く、次いでIgG 2b 陽性細胞36.9%、IgG 2a 陽性細胞24.5%の順であった。

2. 脾臓のT細胞の分布

膜蛍光二重染色によるT細胞の分布はTable 4に示す通りである。

FITC 標識 IgG 1 膜蛍光二重染色による分布は、陽性細胞50 (25.0%)、陰性細胞140 (75.0%) であった。 (Fig. 5)。

Table 4 Population of Lymphocytes of Spleen

Antigen IgG subclass	Lymphocult T	LPS
IgG 1	25.0%	33.3%
IgG 2a	19.5%	30.4%
IgG 2b	25.4%	35.1%
	24.0%	33.3%

Positive lymphocytes by membrane immunofluorescence

Fig. 5 Population of spleen lymphocytes by membrane immunofluorescent stain.

また、FITC 標識 IgG 2a 膜蛍光二重染色による分布は、陽性細胞23 (19.5%)、陰性細胞95 (80.5%) であった。

FITC 標識 IgG 2b 膜蛍光二重染色による分布は、陽性細胞30 (25.4%)、陰性細胞88 (74.6%) であった。

このように、IgG 1陽性細胞 25.0%、IgG 2b 陽性細胞 25.4%とほとんど同値であったが、IgG 2a 陽性細胞19.5%は少数であった。

小 括

マウス歯肉内に抗原 Lymphocult T を接種後の顎下リンパ節及び脾臓における膜蛍光二重染色による結果から、陽性細胞は顎下リンパ節33.3%が脾臓24.0%より多く、陰性細胞は脾臓76.0%が顎下リンパ節66.6%より多く、Lymphocult T による T細胞の活性化は脾臓より顎下リンパ節が多数みられた。

B. LPS 接種群

マウス歯肉内に LPS を接種して、7日後に撲殺した。顎下リンパ節及び脾臓の細胞浮遊液からリンパ球を分離(Ⅱ-B)し、さらにT細胞の分離(Ⅱ-C)を行った。このT細胞を膜蛍光二重染色(Ⅱ-E, Ⅱ-F)で検索した。

1. 顎下リンパ節のT細胞の分布

膜蛍光二重染色によるT細胞の分布は Fig. 6に示す通りである。FITC 標識 IgG 1膜蛍光二重染色は陽性細胞 28 (42.4%)、陰性細胞 58 (57.6%)であった。また、FITC 標識 IgG 2a 膜蛍光二重染色は陽性細胞20 (24.4%)、陰性細胞62 (75.5%)であった。

さらに、FITC 標識 IgG 2b 膜蛍光二重染色は陽性細胞26 (33.3%)、陰性細胞52 (66.6%)であった。

このように、陽性細胞は IgG 1が42.4%と最も多く、次いで IgG 2b が33.3%、IgG 2a が24.4%の順であった。

2. 脾臓のT細胞の分布

膜蛍光二重染色によるT細胞の分布は Fig. 8に示す通りである。FITC 標識 IgG 1膜蛍光二重染色は陽性細胞 42 (33.3%)、陰性細胞 84 (66.6%)であった。また、FITC 標識 IgG 2a 膜蛍光二重染色は陽性細胞21 (30.4%)、陰性細胞 48 (69.5%)であった。さらに、FITC 標識 IgG 2b 膜蛍光二重染色は陽性細胞 39 (35.1%)、陰性細胞72 (64.9%)であった。

このように、陽性細胞は IgG 2b が35.1%と最も多く、次いで IgG 1が33.3%、IgG 2a が30.4%の順であった。

小 括

マウス歯肉内に抗原 LPS を接種後の顎下リンパ節及び脾臓における膜蛍光二重染色による結果から陽性、陰性細胞ともにほとんど同値であった。

IV. 抗原の種類によるT細胞の分布

A. 顎下リンパ節

T細胞の膜蛍光二重染色による陽性細胞の分布において IgG 1陽性細胞は Lymphocult T 40.0%、LPS 42.4%と LPS がやや多く、IgG 2a の陽性細胞は Lymphocult T も LPS もほとんど同値であった。しかし、IgG 2b 陽性細胞は Lymphocult T 36.9%、LPS 32.7%と Lymphocult T がやや多い成績であった。

以上のことから、顎下リンパ節におけるT細胞の陽性は Lymphocult T 33.3%、LPS 32.7%の結果から抗原種類による活性化の差はみられなかった。

B. 脾臓

T細胞の膜蛍光二重染色による陽性細胞の分布において、IgG 1陽性細胞は Lymphocult T 25.0%、LPS 33.3%と LPS が約8.3%多く、IgG 2a 陽性細胞は Lymphocult T 19.5%、LPS 30.4%と LPS が約10.9%多く分布した。

また、IgG 2b 陽性細胞は Lymphocult T 25.4%、LPS 35.1%と LPS が約10%多く分布する成績を得た。

以上のことから、脾臓におけるT細胞の陽性は Lymphocult T 24.0%、LPS 33.3%の結果から脾臓においては抗原の種類によってT細胞に対する活性化が LPS 約10%高い分布成績を得た。

総括ならびに考察

歯垢抗原による歯肉炎及び初期の歯周疾患の歯肉組織内の免疫担当細胞に関しては病理学的、免疫学的(体液免疫学的)に検索した多くの報告がある^{2),3)}。しかしながら、報告の中にはマクロファージとリンパ球(B細胞)のプラズマ細胞に成熟して産生される免疫グロブリンに関するもの及びリンパ球(T細胞)の亜集団(サブクラス)の分布に関する細胞免疫学的な研究が多い。

このT細胞はその発生及び分化と多彩な免疫学的機能をもち^{4),5)}、免疫担当細胞として共存し、抗体産生細胞の調節機構と感染防御機構及び遅延型過敏症の役割をもつことから歯周疾患の歯周組織内で免疫学的な役割が重要視されるようになった。このT細胞の分布と分類について、Cantor ら(1976)⁶⁾、Roland (1982)⁷⁾ らは3種類の表現型T細胞のモノクローナル抗体を用いてサブクラスをヘルパー Tとサプレッサー Tに分類した。また、Moretta ら(1977)⁸⁾、矢田(1979)¹⁰⁾ らはT細胞のサブクラスを抗 IgM、IgG レセプターによって、ヘルパーTとサプレッサーTに分類した。このように、T細胞の細胞表面レセプターによる分類と一方では免疫グロブリン IgG のサブクラス(IgG 1, IgG 2a,

IgG 2b) の **T**細胞表面レセプターによって**T**細胞のサブクラスの分布の報告がある¹³⁻¹⁵⁾。

このように、**T**細胞のサブクラスの分布は初期の歯周疾患の抗体産生の調節機構としてのヘルパー**T**及びサプレッサー**T**の働き、感作リンパ球の感染防御機構としてのリンフォカインによる局所組織へのマクロファージの遊走などの感染防御の役割をもっている。このことについて、野村 (1985)⁸⁾は歯肉に抗原を接種した7日目に、顎下リンパ節及び脾臓のヘルパー**T**よりサプレッサー**T**が増加し、**T**細胞が活性化することを報告した。

一方、マウス抗血清の免疫グロブリン **IgG** のサブクラスの定量について、Ey ら (1978)¹⁶⁾、Rosenberg ら (1979)¹⁷⁾、Seman ら (1979)¹⁸⁾はマウス抗血清の免疫グロブリン **IgG** のサブクラス (**IgG 1**, **IgG 2a**, **IgG 2b**) を分画し、定量して正常マウス血清の免疫グロブリン **IgG** のサブクラスと比較して後者より前者のマウス抗血清の免疫グロブリン **IgG** のサブクラスが抗体価とともに増加することを報告した。

また、Brittle ら (1980)¹²⁾、Löwy ら (1983)²⁰⁾は感染マウスの脾臓細胞よりモノクローナル抗体を作製して、免疫グロブリン **IgG** のサブクラスが存在することを報告している。

このようなことから、感染マウスの抗体産生には抗原の種類によっても少し異なるが、免疫担当細胞であるマクロファージ及びリンパ球 (**T**, **B**細胞) が関与してリンパ球 (**B**細胞) のプラズマ細胞への成熟と抗体産生の役割とその調節機構を司るリンパ球 (**T**細胞) のヘルパー**T**、サプレッサー**T**は共存状態にある。このことはEy ら Rosenberg ら Seman らの免疫グロブリン **IgG** のサブクラスが増加することからも確認されている。ここで著者は、**T**細胞の発生及び分化と多彩な免疫学的機能を考えると感染マウスの**T**細胞は感作リンパ球となり、**T**細胞のサブクラスの表面レセプターは表現型 **Lyt**, 抗 **IgM**, 抗 **IgG** などと複雑な表面レセプターが存在することが考えられ、さらに免疫グロブリン **IgG** のサブクラスが増加し、**T**細胞のサブクラスの共存状態を考えると**T**細胞のサブクラスの表面レセプターに抗 **IgG** のサブクラスのレセプターが存在することが考えられた。この**T**細胞のサブクラスの抗 **IgG** のサブクラスについて、Imai ら (1979)²¹⁾は抗 **IgG** のサブクラス (**IgG 1**, **IgG 2a**, **IgG 2b**) に蛍光色素 (FITC) を標識した蛍光抗体法により**T**細胞のサブクラスに抗 **IgG** サブクラスのレセプターが存在することを報告した。

著者は、これらの**T**細胞のサブクラスの分布と表面レセプターと抗 **IgG** サブクラスのレセプターを考慮して、感染マウスのモデルとしてマウス歯肉組織に **Lymphocult T** (**T**細胞活性物質) と **LPS** (**B**細胞活性物質) を接種後7日目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蛍光二重染色法によって検索した。まず、マウス腹腔に **Lymphocult T** を接種後3日目のリンパ球の陽性細胞は36.7%で陰性細胞は63.3%であった。この結果はImai らの感染マウスの抗原とは異なるが同じ腹腔細胞の膜蛍光二重染色法による陽性細胞の検出率はほとんど同値であった。

一方、顎下リンパ節の膜蛍光二重染色法による**T**細胞のサブクラスの分布について、**Lymphocult T** 接種群の陽性細胞は33.3%、**LPS**の接種群の陽性細胞は32.7%であり、抗原の種類による陽性細胞検出率からは認められなかった。このことは、歯肉に抗原刺激した顎下リンパ節では抗原の種類による感作**T**細胞の分布には大差は認めなかったが、直接抗原を接種した局所の歯肉組織に**T**細胞のサブクラスが多量に遊走し、顎下リンパ節には少量の**T**細胞が残存しているものと考えられた。そのことは、正常マウスの顎下リンパ節の**T**, **B**細胞の分布は**B**細胞より**T**細胞の分布が多いこと、末梢血には**T**細胞のサブクラスが多数分布することからも推測された。

このようなことから、歯垢の抗原刺激に対する歯肉炎の組織内の免疫反応の実験モデルを作り、歯肉組織に性状の異なる2種類の抗原**T**細胞活性物質と**B**細胞活性物質を接種し、局所の歯肉組織内の免疫応答の場で産生される免疫グロブリン **IgG** サブクラスに対する**T**細胞のレセプター陽性細胞を顎下リンパ節から検索して顎下リンパ節の**T**細胞においては2種類の抗原による **IgG** サブクラス陽性細胞の分布には大差は認めなかったが、一方の脾臓の**T**細胞においては**T**細胞活性物質より**B**細胞活性物質に多数の **IgG** サブクラス陽性細胞の分布がみられた結果から**T**細胞は抗原刺激により感作リンパ球が分化する過程に、**T**細胞のサブクラスが出現する。野村の**T**細胞のモノクローナル抗体による細胞障害試験の結果は**T**細胞の分化の過程の分布であり、著者の成績から**T**細胞が抗原刺激により分化する過程を特に **LPS** 接種群に於ては、顎下リンパ節及び脾臓の **IgG** サブクラスの陽性細胞が多く分布することは抗体産生の過程で分化する**T**細胞の表面レセプターをもつものが増加するものと考えられ、Roland、野村の**T**細胞の表現型 **Lyt** 抗原とは異なるもののように考えられた。このことは、著者の2種類の抗原を用いた成績から脾臓の**T**細胞の **IgG**

サブクラス陽性細胞は LPS 接種群に多く Lymphocult T 群に少ないことから T細胞の分化による T細胞のサブクラスの分布よりも産生された抗体と共存する T細胞の表面レセプターの増加によるものであると考えられた。

しかしながら, T細胞は発生, 分化の過程で T細胞のサブクラスが出現し, それら T細胞のサブクラスの免疫機能は多彩であり, 著者の IgG サブクラスの表面レセプターの検索は歯垢抗原に対する歯肉炎の免疫応答がわずかながらも解明出来, T細胞の免疫グロブリン IgG サブクラスの陽性細胞が顎下リンパ節よりも局所の歯周組織に多数分布し, 感染防御機構の重要な役割をしていることが推測される知見が得られた。今後さらに, T細胞の免疫学的機構についての解明を待たねばならないと考えられた。

結 論

歯垢の抗原刺激に対する歯肉炎の組織内の実験モデルとして, マウス 歯肉組織に性状の異なる 2 種類の抗原 Lymphocult T (T細胞活性物質), LPS (B細胞活性物質) を接種後, 7 日目の顎下リンパ節及び脾臓のリンパ球 (T細胞) と腹腔細胞を分離した。それらの細胞の免疫グロブリン IgG のサブクラスの陽性細胞を膜蛍光二重染色 (FITC 標識抗マウス IgG 1, IgG 2a, IgG 2b) により, その分布を検索した。その主な知見は次の通りである。

1. 腹腔リンパ球の IgG サブクラスは IgG 1 42.2%, IgG 2a 39.5%, IgG 2b 34.9%の順に陽性細胞が分布した。

2. 顎下リンパ節における Lymphocult T 接種群の T細胞の IgG サブクラスは IgG 1 40.0%, IgG 2b 36.9%, IgG 2a 24.5%の順に陽性細胞が検出された。

3. 顎下リンパ節における LPS 接種群の T細胞の IgG サブクラスは IgG 1 42.4%, IgG 2b 33.3%, IgG 2a 24.4%の順に陽性細胞が検出された。

4. 脾臓における Lymphocult T 接種群の T細胞の IgG サブクラスは IgG 2b 25.4%, IgG 1 25.0%, IgG 2a 19.5%の順に陽性細胞が検出された。

5. 脾臓における LPS 接種群の T細胞の IgG サブクラスは IgG 2b 35.1%, IgG 1 33.3%, IgG 2a 30.4%の順に陽性細胞が検出された。

6. 抗原別の T細胞の IgG サブクラスは顎下リンパ節においては差はなく, 脾臓において LPS 接種群が Lymphocult T 接種群より陽性細胞が多数分布した。

7. IgG サブクラス別の分布は顎下リンパ節及び脾臓において IgG 1, IgG 2b は高値で, IgG 2a が低値で分布した。

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) Snyderman, R.: Role for endotoxin and complement in periodontal tissue destruction. *J. Dent. Res.* 51: 356—361, 1972.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Raff, M.C.: Role of thymus-derived lymphocytes in the secondary humoral immune response in mice. *Nature*. 226: 1257—1258, 1970.
- 6) 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.
- 7) Roland, S.: Adult thymectomy does not alter the proportion of T cells of the Ly 1, 2, 3 subclass. *Nature*. 300: 529—531, 1982.
- 8) 野村直弘: 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: 九州歯会誌 39: 191—200, 1985.

- 9) 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. Exp. Med.* 146 : 184—197, 1977.
- 10) 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.
- 11) Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, C.R. : Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG 2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry*. 15 : 429—436. 1978.
- 12) Brittle, M.P. and Playfair, H.L. : The role of T cells in regulating immunoglobulin class and subclass. *Immunology*. 41 : 743—752. 1980.
- 13) Minami M., Usui M., Kanno T., Tamura N. and Matuhasi T. : Demonstration of two types of helper T cells for different IgG subclass responses to dinitrophenylated flagellin polymer. *J. Immunol.* 120 : 1195—1206, 1978.
- 14) Slack, J., Der-Balian, G.P., Nahm, M. and Davie, J.M. : Subclass restriction of murine antibodies, II The IgG plaque-forming cell response to thymus-independent type 1 and type 2 antigens in normal mice and mice expressing an X-linked immunodeficiency. *J. Exp. Med.* 151 : 853—872, 1980.
- 15) Mongini, P.K.A., Stein, K.E. and Paul, W.E. : T cell regulation of IgG subclass antibody Production in response to T-independent antigen. *J. Exp. Med.* 153 : 1—12, 1981.
- 16) Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, C.R. : Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG 2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* 15 : 429—436, 1978.
- 17) Rosenberg, Y. and Chiller, J.M. : Ability of antigen specific helper cells to effect a class restricted increase in total Ig-secreting cells in spleen after immunization with antigen. *J. Exp. Med.* 150 : 517—532, 1979.
- 18) Seman, S. and Zilberfarb, V. : Genetic control of the IgG 2a response in mice isotype and antigen specific T cell mediated suppression in low responders. *J. Immunol.* 122 : 2534—2558, 1979.
- 19) Löwy, I., Brezin, C., Neauport-Santes, C., Theze, J. and Fridman, W.H. : Isotype regulation of antibody production : T-cell hybrids can be selectively induced to produce IgG 1 and IgG 2 subclass-specific suppressive immunoglobulin-binding factors. *Immunology* 80 : 2323—2327, 1983.
- 20) Imai Y., Oguchi T., Nakano T. and Osawa T. : Separation of mouse T cell subsets by a fluorescent activated cell sorter using fluorescence-labeled peanut agglutinin. *Immunol Commun.* 8 : 495—503, 1979.