原

著

胸腺依存性CD4⁺8⁺小腸上皮間リンパ球の 存在とその性状について

長 澤 敏 行

東京医科歯科大学歯学部歯科保存学第2講座（主任・指導：石川 烈教授）

東京大学医学部免疫学教室（指導：多田富雄教授）

（1991年12月20日 受付）

Presence of Thymus-dependent CD4⁺8⁺ Intestinal Intraepithelial Lymphocytes and Their Characteristics in Mice

Toshiyuki Nagasawa

Department of Periodontology, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. Isao Ishikawa)

Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tokyo University

(Director : Prof. Tomio Tada)

The purpose of this study was the investigation of the T cell subsets in the gut-associated lymphoid tissues. CD4⁺8⁺ T cells were found to appear temporarily in Peyer's patches of mice at 2 to 3 weeks after birth. They disappeared within a short period of time from Peyer's patches, but constantly populated in the intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL). Three to 10% of iIEL were CD4⁺8⁺ in the specific pathogen-free (SPF) condition throughout life. They are mature T cells with a high density of CD3 and TcR $\alpha\beta$ and found to respond to immobilized anti-CD3 antibody. The appearance of CD4⁺8⁺ T cells in iIEL was found to be dependent on the thymic selection, since they were absent in the athymic nu/nu mice, and the V β gene usage was dictated by the pattern of thymic selection. CD4⁺8⁺ T cells were not found in the germ-free mice but increased in the SPF old mice. These results indicate that the iIEL contain a unique subset of thymus-derived mature CD4⁺8⁺ T cells. These cells may repopulate after the thymic selection in the intestine and increase in response to the intestinal microenvironments.

I. 緒 言

免疫反応において中心的役割を担うT細胞は胸腺で分化し末梢のリンパ装置に移動する。近年胸腺にしか存在しないと考えられていたCD4⁺8⁺ (Double Positive ; DP) T細胞が小腸上皮間に存

在することが報告され^{1,2)}、消化管に付属した免疫系に分布するT細胞の特殊性が注目されるようになった。

本研究は歯周組織における局所の免疫反応を考えるための基礎として、粘膜免疫の主役を担う消化管のT細胞の特殊性を明らかにするために行っ

た。マウスの小腸のT細胞を用いてその分化と機能、およびその老化に伴う変化について検索したものである。

II. 材料および方法

1. マウス

SPF (Specific pathogen-free) 下で生育した BALB/c, BALB/c nude, C3H/HeN, B10. BR, B10. A, A/J マウスを用いた。特に指定したもの以外では8週齢から20週齢のマウスを使用した。C3Hの無菌マウス (Germ Free Mouse; GF) は理化学研究所より供与を受けた。無菌マウスは Trexler-Type vinyl isolator で50kGyの γ 線滅菌した飼料を与えて飼育されたものである。

2. リンパ球の分離

脾臓、パイエル板などのリンパ球は、組織切除した2%ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum: FCS) を含む Eagle の minimum essential medium (MEM) の中で、通法どおりにスライドグラスに組織をそっと押し付けることによって細胞を浮遊させた。小腸上皮間リンパ球 (Intestinal Intraepithelial Lymphocytes; iIEL) の分離は田口らの方法³⁾に従って行った。すなわち、上皮間リンパ球を分離するために (実験にあたっては、2~3匹のマウスから小腸を同時に採取した) 採取した小腸からパイエル板を切除して縦断し、さらに5~10 mm に細切して2% FCS 添加 MEM で洗浄した。この組織を2% FCS 添加 RPMI1640 培地にいれ、37℃で30分静かに振とうした後、15秒間強く振とうして細胞を含む上清を採取した。集めた細胞はただちに、600 mg のナイロンウールを緩く詰めた20 ml のシリンジに通して上皮細胞の塊を除いた。遠心して上清除去後、40%の Percoll 液 (Sigma, USA) を細胞のペレットに加えさらに600 g で20分遠心し、上清を除去してリンパ球を得た。

3. 抗体

抗マウスモノクローナル抗体 Thy1.2 (クローン 30H12)⁴⁾, CD3 (クローン 145-2C11)⁵⁾, CD4

(クローン GK1.5)⁶⁾, CD8 (クローン 53-6-72)⁴⁾, T細胞レセプター $\alpha\beta$ 鎖 (T cell Receptor $\alpha\beta$: TcR $\alpha\beta$) (クローン H57-597)⁷⁾, V β 3 (クローン KJ25a)⁸⁾, V β 6 (クローン 44-22-1)⁹⁾, を用いた。

これらの抗体は、ハイブリドーマを含む腹水あるいは培養上清から、40%飽和硫酸あるいは Protein A (Pharmacia LKB, Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) や抗- κ (クローン MARK1) アフィニティーカラムを用いて精製した。

4. フローサイトメトリ解析のための試薬調製

テキサスレッド標識ストレプトアビジン (TR-SA) は BRL 社 (Gaithersburg, Md, USA) から購入した。抗 Thy1.2, 抗 CD3, 抗 CD8, 抗 TcR $\alpha\beta$, 抗 V β 3, 抗 V β 6 モノクローナル抗体はアルカリ条件下で fluorescein isothiocyanate (FITC) (BBL Microbiology System, Cockeysville, MD) で直接標識した。

抗 CD4 抗体は Hardy らの方法¹⁰⁾に従い, allophycocyanin (APC, Sigma) と結合させた。抗 CD8 抗体についてはさらに N-hydroxysuccinimidobiotin (Sigma) と結合させたものも作製した。

5. フローサイトメトリ解析

3 カラーフローサイトメトリ解析を行う際は、分離した細胞を FITC 標識抗 CD8 抗体と APC 標識抗 CD4 抗体で染色した。4 カラーフローサイトメトリ解析の場合は、細胞を図に示した FITC 標識抗体、ビオチン標識抗 CD8 抗体と反応させた後、APC 標識抗 CD4 抗体、テキサスレッド標識ストレプトアビジンと反応させた。さらに Propidium iodide (PI, Sigma) を 1 μ g/ml 加えて死細胞を染色し、解析時に除去した。解析はアルゴンレーザーとダイレーザーを装着した FACStar plus flow cytometer (Becton Dickinson) で行った。

6. 抗 CD3 抗体によるリンパ球のプラスト化

抗 CD3 抗体を96穴プレートにコートし室温で1時間インキュベートした。MEM で3回洗浄後、10% FCS 添加 RPMI 培地でブロッキングを

1時間行った。脾臓リンパ球,あるいは iIEL を 2×10^5 加えて24時間培養した。

培養後リンパ球を抗 CD4, CD8 抗体で染色し,同様に染色した新鮮分離細胞とフローサイトメトリーを用いて前方散乱光 (Forward angle Light Scatter : FSC) を調べることによって細胞の大きさを比較した。

Ⅲ. 結 果

1. DP 細胞のパイエル板への出現

異なった週齢のマウスのパイエル板について CD4, CD8, PI による3カラーフローサイトメトリーを行ったところ,表1のように DP 細胞が生後2週から3週のマウスのパイエル板に認められた。同じ時期のマウスの脾臓には,このような細胞は存在しなかった。また, DP 細胞が認められた日から1週間後に同じ母親から同じ日に生まれたマウスを調べてみると,上記のような DP 細胞はすでに認められず,きわめて一過性に出現するものであることがわかった。

異なった系のさまざまな週齢のマウスを調べたが, DP 細胞はこの時期のマウスであっても必ずしも認められず,出現がきわめて一時的かつ不規則であることがわかった。

2. DP iIEL の表面抗原

パイエル板の T 細胞は胸管を経て小腸上皮間など消化管に分布することが知られている。パイエル板の T 細胞が iIEL の前駆細胞を含むことから,マウス小腸から iIEL を分離して調べたところ,

表1 同じ母親から同じ日に生まれた C3H マウスのパイエル板の細胞を分離し FITC 標識抗 CD8 抗体, APC 標識抗 CD8 抗体で染色し DP 細胞の比を計算した。死細胞は PI で染色し解析に含めなかった

DP cells in the Peyer's patches (%)		
Weeks after birth	Experiment 1	Experiment 2
2 weeks	0.40%	1.96%
3 weeks	11.67%	0.38%
4 weeks	0.15%	0.4 %

ろ,パイエル板の所見とは全く異なり,成熟マウスの小腸上皮間には常に3~10%の DP 細胞が認められた。

4 カラーフローサイトメトリーでこの DP 細胞のもつ他の表面抗原を調べたところ,図1に示すように97.3%で Thy-1+, 99.2%で CD3+, TcR $\alpha\beta$ + であった。胸腺における未熟な CD4+8+ 細胞は, TcR を弱くしか発現していないが,小腸上皮間の DP 細胞は CD3 および TcR $\alpha\beta$ を強く発現していることが注目された。この事実は iIEL 中の DP 細胞が成熟した T 細胞であると思われた。また,上皮間リンパ球の CD4-8+ 細胞のうち,98%は CD3+ であるが,その60%のみが TcR $\alpha\beta$ +, Thy-1+ であり,他は $\gamma\delta$ T 細胞であることが示された。

3. 無菌マウスの iIEL の性状

マウスは生後2週間頃から固形食を食べ始める。このころ,腸内環境では,食物抗原の侵入や常在菌の定着など変化が著しい¹¹⁾。

そこで,SPF マウスと無菌マウスの iIEL を用いて各サブセットの総細胞数を調べてみると,図2に示すように無菌マウスでは iIEL の細胞数は大きく減少していた。そのなかでも DP iIEL は全く認められず, DP iIEL は腸内環境の変化に伴って反応性に誘導されてくることが明らかとなった。

無菌マウスにおいても iIEL 中に CD4+ 細胞, CD4-8- 細胞, CD8+ 細胞は SPF マウスと同様に認められた (図2)。4 カラーフローサイトメトリーで無菌マウスの CD4-8+ iIEL の TcR を調べてみると TcR $\alpha\beta$ + 細胞はほとんど存在せず CD3+ は存在したことから, CD4-8+ TcR $\gamma\delta$ T 細胞は無菌マウスにも存在することが認められた。一方, CD4-8+ TcR $\alpha\beta$ 細胞は SPF 条件下で誘導されてくることが明らかとなった。

4. 老化が DP iIEL に与える影響

上記のように DP iIEL が環境に強く影響を受けたことから,さらに老化による影響について検索した。老化マウスとしては B10. A マウスおよび A/J マウスの24カ月齢を過ぎたマウスを用い

図1 C3H マウスの iIEL を分離し APC 標識した抗 CD4 抗体, ビオチン標識した抗 CD8 抗体と反応させた後, アビジンテキサスレッドで染色し, FITC 標識した抗 CD3, TcR, Thy 1 抗体のいずれかで染色した。死細胞はPIで染色し解析に含めなかった。図は CD4, DP, CD8 iIEL の各分画に表現された CD3, TcR, Thy 1 をヒストグラムで示した。図中の縦線は陰性対照の蛍光強度の最大値を示し, 縦線より右は染色した抗原について陽性, 左は陰性である

図2 BALB/c の SPF, Germ Free, SPF nude マウスの iIEL を分離し APC 標識抗 CD4, FITC 標識抗 CD8 で染色して CD4, DP, CD4⁻8⁻, CD8 各サブセット比を求め, iIEL の総細胞数と乗じて各サブセットの総細胞数を求めた。死細胞は PI で染色し解析に含めなかった
図は 5 回の実験の平均を示す

図3 B10. A 2カ月齢と24カ月齢マウスの iIEL を分離し、各個体ごとに PE 標識抗 CD4, FITC 標識抗 CD8 で染色して CD4, DP, CD4-8-, CD8 各サブセット比を求め、iIEL の総細胞数と乗じて各サブセットの総細胞数を求めた

図は各個体の平均値を示す。老化マウス中で脾腫を伴う個体があり右に別記した

た。

図3に示すようにB10. A老化マウスではiIELの総細胞数は約2倍に増加していた。老化マウスの脾臓ではすでに報告されているように¹²⁾ CD8細胞の減少が認められたが(図4右下)。一方、図4右上に示すように同じマウスにおいてDP iIELが逆に増加しているのが注目された。老化マウスでは胸腺細胞数は減少しており、胸腺からのT細胞の供給が高まっているとは考えられないので、小腸上皮におけるDP iIELの拡大は消化管局所で起こるものと思われた。

老化マウスのなかにはSPF条件下でも非腫瘍性の脾腫がしばしば認められるが、このような動物では、図3のようにDP iIELが顕著に増加していた。脾腫の原因は明らかではないがB10. Aマウスに限らずA/Jマウスでも脾腫が認められ、このようなマウスでは図5右上のようにDP iIELの顕著な増加が必ずみられた。このような老化マウスでは図5左上のようにパイエル板にもDP細胞が認められ、局所においてDP iIELが顕著に増加する際には、パイエル板にもDP細胞が現れ

ることが明らかとなった。

5. DP iIEL の分化

通常胸腺にしか認められないT細胞が消化管上皮間に存在したことから、DP細胞は消化管で分化した細胞であることが推定された。そこで胸腺を欠くヌードマウスの上皮間リンパ球を調べた。ヌードマウスは末梢にT細胞はほとんど認められないが、iIELを調べると図2に示すようにCD8⁺ iIELやCD4⁻8⁻ iIELは存在し、これらのT細胞サブセットが胸腺外分化を遂げたものであることが示唆される。これに反し、ヌードマウスにはDP細胞は認められなかった。このことからSPFマウスの小腸上皮間に認められるDP細胞は胸腺依存性の分化を遂げたことが明らかとなった。

また、胸腺内分化の過程で自己に反応するT細胞は消去されるという、いわゆるネガティブセレクションがおこることが知られている。マイナー組織適合抗原の一つであるMls-2^aをもっているマウスでは、Vβ3を発現したT細胞は胸腺内で消去されることが知られている⁸⁾。こうした事実

図4 B10.A の2カ月齢と24カ月齢マウスの iIEL, 脾臓細胞を分離し, 各個体ごとに PE 標識抗 CD4, FITC 標識抗 CD8 で染色した。図中数字は各分画の%を示す

を基に, この DP iIEL がネガティブセレクションを受けているか否かを検討した。異なった MIs 抗原を遺伝的にもつ系統のマウスを用いて TcRV β_3 の DP 細胞中にしめる割合を調べたところ, MIs-2^a である C3H マウスでは図6右のように V β_3 の発現が消去されており, MIs-2^b である B10BR マウスでは図6左のように V β_3 の発現が認められた。MIs-2^a とは無関係の V β_6 はこれら両方のマウスの DP iIEL で消去されていなかった。このことから DP 細胞が胸腺内でネガティブセレクションを経てきていることが明らかとなった。

6. DP iIEL の機能

成熟T細胞は, 抗 CD3 抗体による刺激でプラスト化し増殖することが知られている。その際にさまざまなインターロイキンを産生してT細胞の機能を発現する。iIEL および脾臓細胞を抗 CD3 抗体で刺激し, 反応した細胞のサイズを測定した。それを刺激していない新鮮分離 iIEL と比較

したところ, 図7に示したように破線で示した新鮮分離細胞に比べて CD3 刺激細胞は右方移動し, そのサイズを増していた。脾臓細胞と同様に iIEL もサイズが増加することがわかった。この際 DP iIEL でも CD4⁺8⁻, CD4⁺8⁺ iIEL と同様に細胞のサイズの増加が認められた (図7)。

IV. 考 察

消化管上皮間には, IEL と呼ばれる特徴のある T細胞が分布している。そのうちでも DP iIEL は胸腺にしか存在しない CD4⁺ CD8⁺ の phenotype をもち, その由来や意義が注目されている。本研究の結果, DP iIEL は CD3 と TcR $\alpha\beta$ を表現した成熟T細胞であることがわかった。この細胞は SPF 条件下では認められるが無菌マウスやヌードマウスには認められなかった。老化マウスでは新たに増加していることがわかった。

DP 細胞は2～3週齢のマウスや脾腫を伴う老化マウスのパイエル板にきわめて一時的に認めら

A/J Old Mouse (24 months) **Splenomegaly** **Normal**

図5 24カ月齢で脾腫を伴う A/J マウスと伴わない A/J マウスの iIEL, パイエル板細胞を分離し, 各個体ごとに PE 標識抗 CD4, FITC 標識抗 CD8 で染色した。图中数字は各分画の%を示す

れたが, 他のリンパ組織には認められなかった。このことから胸腺から供給された T 細胞の一部がパイエル板にいたりやがて DP iIEL として小腸に分布する過程が示唆された。DP iIEL は Mls 抗原によるネガティブセレクションを受けていた。

胸腺内では未成熟の CD4⁻8⁻ 細胞および CD4⁻8⁺ 細胞は DP 胸腺細胞となり, 成熟したのち CD4⁺ あるいは CD8⁺ 細胞へと分化してゆくことが知られている。したがって DP 細胞は成

熟した T 細胞の未熟な前駆細胞と考えられている。もしも小腸で胸腺外分化が起こるのであれば, この DP iIEL は未熟な T 細胞で CD4 あるいは CD8 細胞へと分化する可能性が考えられた。しかし CD3 および TcR を強く発現していることから, この細胞は形態的に成熟した T 細胞であることが明らかとなった。また, CD3 を介した刺激によりプラスト化が認められたことから DP 細胞は機能的にも成熟した T 細胞であることが確認された。

DP iIEL

図6 B10BR, C3H マウスの iIEL を分離し APC 標識した抗 CD4 抗体, ビオチン標識した抗 CD8 抗体と反応させた後, アビジンテキサスレッドで染色し, FITC 標識した抗 TcRVβ3, Vβ6 抗体のいずれかで染色した。死細胞は PI で染色して解析に含めなかった。図は DP iIEL に表現された TcRVβ3, Vβ6 をヒストグラムで示した。図中の破線は陰性対照を示す。図中の縦線は陰性対照の蛍光強度の最大値を示し, 縦線より右は染色した抗原に対して陽性である

図2で明らかなようにヌードマウスには CD8 iIEL, CD4⁺CD8⁺ iIEL が存在し, CD4 iIEL がわずかに存在した。これらは消化管で胸腺外分化したことを示唆する。しかし DP iIEL が認められないことから, DP 細胞は胸腺依存性の分化を遂げているものと思われた。

ネガティブセレクションは, 自己反応性の T 細胞による自己の破壊を防ぐための主要なメカニズムであり, マウスにおいては自己の Mls 抗原に反応性の Vβ 陽性細胞が消去されることが報告されている⁸⁾。安部らは Vβ3 陽性 T 細胞クローンを調べた結果, Vβ3 陽性の T 細胞が Mls-2^a の抗原提示細胞と反応することを見出した¹³⁾。また, Pullen らは Mls-2^a のマウスでは Vβ3 陽性の T 細胞が消去されることを報告した⁸⁾。これらがネガティブセレクションの例である。また, このネガティブセレクションは T 細胞が DP の段階で起

ることが報告されている¹⁴⁾。

このことから, DP iIEL がネガティブセレクションを受けてから消化管に分布したのか, それとも受けていない DP 細胞が消化管に分布したのかを調べるために, Mls-2^a である C3H マウスの Vβ3 陽性細胞の割合を調べたところ DP iIEL 中に Vβ3 陽性細胞は存在せず, DP iIEL がネガティブセレクションを経てきていることが明らかとなった。

iIEL のうち胸腺由来のものはパイエル板で抗原刺激を受けそこを經由して小腸上皮間へ分布し, その一方で胸腺外分化を遂げるものはパイエル板を経ず直接上皮間で分化することが報告された¹⁵⁾。彼らは胸腺外分化の例として, CD8α 鎖しかもたない CD8 iIEL はネガティブセレクションを受けていない T 細胞が多いことをあげ, このサブセットが胸腺外分化を遂げるとしている。DP

図7 iIEL, 脾臓細胞を分離後抗 CD3 抗体で刺激し24時間培養した後 FITC 標識抗 CD8, APC 標識抗 CD4 抗体で染色した
図は培養後の CD4, DP, CD8 各サブセットの細胞の大きさを新鮮分離細胞との比較を Forward Scatter のヒストグラムで示した。死細胞はPIで染色し解析に含めなかった

iIEL の CD8 も多くは α 鎖のみであることが報告されており¹⁶⁾, これが胸腺外分化の指標であるならば DP iIEL が胸腺外分化を遂げた可能性を示唆する。しかし, 図6のように DP iIEL はネガティブセレクションを受けていた。2～3週齢のマウス, 脾腫を起こした老化マウスで DP 細胞がパイエル板に認められたことは胸腺由来の細胞と類似する。ヌードマウスの結果と合わせ, DP iIEL は胸腺由来であることが明らかとなった。

マウスは生後2週頃から固形食を食べ始め, パイエル板は急激に大きさを増す。食物抗原の侵入に加え常在細菌叢も変化するなど¹¹⁾消化管の微小環境も大きく変化する。実際に解剖するときに胃

の内容物をみると, ミルクと思われる白い内容物が認められる時期から固形食と思われる緑色の内容物へと変わる時期にパイエル板は肉眼的にかなり大きくなっていた。このころのマウスのパイエル板に DP 細胞が認められたことは, この細胞が腸内環境の変化に対応して誘導されてきたと考えられる。無菌マウスにはほとんど認められなかったことは, DP 細胞が特に腸内細菌の変化に伴い誘導されてきたことを示唆している。

老化マウスの脾臓で CD8 細胞の割合が減少していたのが認められたが, 脾臓では減少しているにもかかわらず, 同じマウスの DP iIEL は減少せず, 増加していた。胸腺細胞は加齢とともに減

図8 DP iIEL の想定しうる分化経路

1. 胸腺で CD4 あるいは CD8 細胞へと分化した後消化管に移り、いずれか一方(CD4 または CD8)を獲得し DP となる経路
2. 胸腺の DP 細胞がそのまま小腸へと分布する経路
3. 骨髄細胞が直接小腸で分化し DP 細胞になるという経路

少し、胸腺から末梢への T 細胞の供給能が DP iIEL に関してのみ亢進することは考えにくいので、DP iIEL は胸腺を経た後に腸管局所で増殖すると思われる。2～3 週齢のマウス、脾腫を起こした老化マウスで DP 細胞がパイエル板に認められ、脾臓やリンパ節に認められないことから、DP 細胞は腸管局所で増殖することが示唆された。

DP 細胞が成熟した機能的な T 細胞であることから次のような分化経路を想定した (図 8)。1. 胸腺で CD4 あるいは CD8 細胞となった後に消化管に移り、いずれか一方 (CD8 または CD4) を獲得し DP iIEL となる経路。2. 胸腺の DP 細胞がそのまま小腸へと分布するという経路。3. 骨髄細胞がそのまま小腸で分化し DP 細胞になるという経路。

DP iIEL がヌードマウスに存在せず (図 2)、ネガティブセレクションを受けていた (図 6) ことは、DP 細胞が胸腺依存性であるという 1 または 2 の可能性が考えられる。Mosley らは胸腺切除した骨髓キメラを用いて DP iIEL が胸腺外分化を遂げることを報告しているが¹⁷⁾、これは上述の 3 の経路を示唆するものである。ヌードマウスの iIEL には TcR $\gamma\delta$ 細胞は存在しているのに対

し $\alpha\beta$ 細胞は非常に少ないこと¹⁸⁾、またこれは胸腺切除したキメラマウスでも同様であること¹⁹⁾が報告されている。DP 細胞がすべて $\alpha\beta$ T 細胞であり、少なくともその大部分は胸腺依存性であることは、 $\alpha\beta$ iIEL が胸腺依存性であるという上記の報告からも間接的に支持される。胸腺依存性と考えられる今回の実験結果と胸腺外分化を主張する Mosley らの報告の違いはまだ完全に説明できない。一つの可能性としては、図 4 のようにヌードマウスの iIEL にはわずかながら CD4, CD8 細胞が存在するので、彼らの報告した胸腺切除マウスの DP iIEL が 1 の経路を経た細胞であることが考えられる。つまりわずかな胸腺外分化した CD4, CD8 細胞がなんらかの刺激でもう一方の分子を獲得するとともに増殖して DP iIEL になることである。

Paliard らは、末梢血の CD4 細胞を IL-4 存在下で培養し細胞傷害性をもつ DP 細胞を得ている²⁰⁾。Mingari らは胸腺の CD4⁺8⁻ 細胞を培養し、刺激を繰り返すことによって細胞傷害性をもつ CD8⁺ TcR $\gamma\delta$ 細胞を得ている²¹⁾。また、獲得された CD8 分子は α 鎖のみの CD8 である。これらのことは、上記 1 の経路を示唆する。つまり、胸腺を経た CD4 細胞が腸管で CD8 分子を獲得し、DP 細胞として分布していると考えられる。

腸管における CD8 分子の獲得は、Bonneville らの報告からも支持される²²⁾。彼らは iIEL の $\gamma\delta$ TcR とは異なったタイプの $\gamma\delta$ TcR をいれた $\gamma\delta$ トランスジェニックマウスを作成し、その iIEL を検索したところ、 $\gamma\delta$ トランスジェニックマウスの iIEL は CD8 の発現が弱かったとしている。CD8 分子が腸管局所で増殖する際に獲得する分子であるならば、胸腺外分化する iIEL が α 鎖のみの CD8 細胞であることや、DP 細胞が CD8 細胞の減少した老化マウスでも減少せず、腸管局所で増殖することと矛盾しない。

同じく 1 の経路として CD8 細胞が CD4 分子を得る可能性も考えられる。Paolo Lusso らは、ヒト CD8 細胞を human herpes virus 6 に感染さ

せると CD4 分子を発現することを見い出した²³⁾。このことは、成熟 CD8 細胞が DP 細胞となる可能性を示唆している。

抗 CD3 抗体の刺激によってプラスト化することから、DP iIEL は成熟した機能的なリンパ球であることが明らかとなったが、腸管における DP 細胞の果たす役割については現在のところ明らかではない。iIEL には細胞傷害性をもつものが多く、感染などで傷害をうけた上皮細胞を取り除く役割を担うと考えられる²⁴⁾。この細胞傷害活性は無菌マウスには認められないことが報告されている²⁵⁾。DP 細胞も無菌マウスに認められず、この細胞傷害活性をもつ可能性が示唆されるが確認は行われていない。

細胞傷害性をもつ iIEL が CD1 分子を認識することが報告された²⁶⁾。CD1 分子はマウスやヒトの腸管上皮の他、歯肉上皮にも発現されていることが知られている²⁷⁾。CD1 分子の発現量は IL-1 によって上昇することが報告されており²⁷⁾、感染や炎症に伴う CD1 発現量の増加とそれに伴う iIEL の活性化が示唆される。感染、炎症により Class I, Class II の発現も上昇すること²⁸⁾、CD4, CD8 分子はそれぞれ Class II, Class I に結合することが知られている^{29,30)}。DP 細胞の腸管局所における増加、無菌マウスに存在しないことから、細菌、炎症などの局所環境の変化による CD1, Class I, Class II などの変化が DP 細胞の活性化、増殖に大きな影響を与えているであろう。

ヒト末梢血では、わずかに DP 細胞が存在するが³¹⁾、歯肉上皮における局在は確認されていない。歯周疾患のような消化管局所の炎症性疾患を考察するうえで、マウスの DP iIEL のように、胸腺で分化しているにもかかわらず局所環境に対応して増加する T 細胞が存在することは興味深い。特に、老化の T 細胞サブセットに与える影響が消化管局所と他のリンパ装置で異なることは、加齢の歯周疾患に与える影響を免疫学的見地から調べる際に、単純に全身免疫系を調べるだけでは不十分であることを意味する。本研究のモデルは、マウスの小腸のリンパ球であったが、今後こ

れらの知見を基に歯周組織をモデルとした検索が重要であると思われる。

V. 結 論

1. DP 細胞が、2～3 週齢のマウスのパイエル板に一時的に認められた。また、老化マウス、特に脾腫を伴う老化マウスで DP 細胞は増加し、局所での増殖が示唆された。
2. DP 細胞は SPF マウスの小腸上皮間に認められるが、無菌マウスには認められなかった。
3. DP 細胞はヌードマウスには認められず、またネガティブセレクションを受けており胸腺依存性の T 細胞サブセットであると思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇篤なるご指導ならびにご校閲を賜りました石川烈教授に深甚なる感謝の意を表しますとともに、終始懇切丁寧なご教授とご校閲をいただきました東京大学免疫学教室 多田富雄教授に深く感謝いたします。

また、丁寧なご助言、ご教示をいただきました東京大学免疫学教室 浅野喜博助教授、佐野公仁夫博士に心から感謝の意を表します。

さらにさまざまなご援助、ご協力をいただきました理化学研究所 池郁夫博士、水谷武夫博士、動物実験に際しご協力いただきました横池妙子さん、文献の収集、整理にご助言をいただきました山口葉子さんに厚くお礼申し上げます。

最後に、暖かいご援助をいただきました東京医科歯科大学歯科保存学第 2 講座、東京大学免疫学教室の方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 長沢敏行, 佐野公仁夫, 多田富雄: 免疫細胞分化の場としての消化管。細胞工学 9 : 795-801, 1990.
- 2) Mosley, R. L., Styre, D. and Klein, J. R. : CD4⁺ CD8⁺ murine intestinal intra epithelial lymphocytes. Int. Immunol. 2 : 361-365, 1990.
- 3) Taguchi, T., Mcghee, J. R., Coffman, R. L., Beagley, K. W., Eldridge, K., Takaku, K. and Kiyono, H. : Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues: frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells which secrete IFN γ and

- IL5. *J. Immunol.* 145 : 68, 1990.
- 4) Ledbetter, J. A. and Herzenberg, L. A. : Xenogenic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.* 47 : 63, 1979.
- 5) Leo, O., Foo, M., Sachs, D. H., Samelson, L. E. and Bluestone, J. A. : Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 1374, 1987.
- 6) Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, M. and Fitch, F. W. : Characterization of murine surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5 : similarity of L3T4 to the human Leu3/T4 molecules. *J. Immunol.* 131 : 2445, 1983.
- 7) Kubo, R. T., Born, W., Kappler, J. W., Marrack, P. and Pigeon, M. : Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine $\alpha\beta$ T-cell receptors. *J. Immunol.* 142 : 2736, 1989.
- 8) Pullen, A. M., Marrack, P. and Kappler, J. W. : The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* 335 : 796-801, 1988.
- 9) Acha-obe, H., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H. : Cytotoxic T cell clone-specific monoclonal antibodies used to select clonotypic antigen-specific cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.* 15 : 31, 1985.
- 10) Hardy, R. R. : Purification and coupling of fluorescent proteins for use in flow cytometry. In Weir, D. M., Herzenberg, L. A., Blackwell, C. C. and Herzenberg, L. A., eds : *Handbook of experimental Immunology*, 4th edn, Ch. 31, p. 1. Blackwell Scientific, Edinburgh.
- 11) Koopman, J. P., Stadhouders, A. M. and H. de Boer : De Darmflora van de muis *Tijdschr. Diergeneesk.* 106 : 748-756, 1981.
- 12) Komuro, T., Sano, K., Asano, Y. and Tada, T. : Analysis of age-related degeneracy of T-cell repertoire : Localized functional failure in CD8⁺ T cells *Scand. J. Immunol.* 32 : 545, 1990.
- 13) Abe, R., Vacchio, M. S., Barbara Fox and Hodes, R. J. : Preferential expression of the T-cell receptor V β 3 gene by Mls reactive T cells. *Nature* 335 : 827-830, 1988.
- 14) MacDonald, H. R., Hengartner, H. and Pedrazzini, T. : Intrathymic deletion of self-reactive cells prevented by neonatal anti-CD4 antibody treatment. *Nature* 335 : 174-176, 1988.
- 15) Rocha, B., Vassalli, P. and Guy-Grand, D. : The V β repertoire of mouse gut homodimetric α CD8⁺ intraepithelial T cell receptor α/β ⁺ lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 173 : 483-486, 1991.
- 16) Lefrancois, L. : Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J. Immunol.* 147 : 1746-1751, 1991.
- 17) Mosley, R. L., Styre, D. and Klein, J. R. : Differentiation and functional maturation of bone marrow derived intestinal T cells expressing membrane T cell receptor in athymic radiation chimeras. *J. Immunol.* 145 : 1369-1375, 1990.
- 18) Bandeira, A., Mota-Santos, T., Itohara, S., et. al. : Localization of γ/δ T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J. Exp. Med.* 172 : 239-244, 1990.
- 19) Bandeira, A., Itohara, S. and Bonneville, M. : Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor $\gamma\delta$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 43-47, 1991.
- 20) Paliard, X., Malefijt, R. W., Vries, J. E., et. al. : Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4⁺ T-cell clones *Nature* 335 : 642-644, 1988.
- 21) Mingari, M. C., Varese, P., Bottino, C., et. al. : Clonal analysis of CD4⁻ CD8⁻ human thymocytes expressing a T cell receptor γ/δ chain. Direct evidence for the de novo expression of CD8 surface antigen and of cytolytic activity against tumor targets. *Eur. J. Immunol.* 18 : 1831-1834, 1988.
- 22) Bonneville, M., Itohara, S., Krecko, E., G., et. al. : Transgenic mice demonstrate that epithelial homing of $\gamma\delta$ T cells is determined by cell lineages independent of T cell receptor specificity. *J. Exp. Med.* 171 : 1018-1026, 1990.
- 23) Lusso, P., Maria, A., Malnati, M., et. al. : Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8⁺ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 349 : 533-535, 1991.
- 24) Janeway, C. A., Jr. : Frontiers of the immune system. *Nature* 333 : 804-806, 1988.
- 25) Lefrancois, L. and Goodman, T. : In vivo modulation of cytolytic activity and Thy-1 expression of TCR- $\gamma\delta$ ⁺ intraepithelial lymphocytes. *Science* 243 : 1716-1718, 1989.
- 26) Balk, S. P., Ebert, E. C., Blumenthal, R. L., Mcdermott, F. V., Wucherpfennig, K. W.,

- Landau, S. B. and Blumberg, R. S. : Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Science* 253 : 1411-1415, 1991.
- 27) Walsh, L. J. and Seymour, G. J. : Interleukin1 induces CD1 antigen expression on human gingival epithelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 90 : 13, 1988.
- 28) Barclay, A. N. and Mason, D. R. : Induction of Ia antigen in Rat epidermal cells and gut epithelium by immunological stimuli. *J. Exp. Med.* 156 : 1665, 1982.
- 29) Doyle, C. and Strominger, J. L. : Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *J. Exp. Med.* 169 : 149, 1989.
- 30) Rosenstein, Y., Ratnofsky, S., Burakoff, S. and Herrmann, S. : Direct evidence for binding of CD8 to HLA class I antigen. *J. Exp. med.* 169 : 149, 1989.
- 31) Blue, M-L., Daley, J. F., Levine, H., Craig, K. A. and Schlossman, S. F. : Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J. Immunol.* 134 : 2281, 1985.