イヌの実験的歯周炎における歯肉リンパ球 のマイトージェンに対する幼若転換

山下 薫

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(指導：原 耕二教授)

(昭和60年3月18日受付)

Blastogenic Responses of Gingival Lymphocytes to Mitogens in Experimental Periodontitis in Dogs

Kaoru YAMASHITA

Department of Periodontology, Niigata University School of Dentistry

(Chief and Director: Prof. Kohji HARA)

The purpose of the present study was to evaluate the blastogenic responses of gingival lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A) and pokeweed mitogen (PWM) following experimental periodontitis in dogs. And then, their differences among the gingival lymphocyte peripheral blood lymphocyte (PBL) and submandibular node lymphocyte (SNL) were examined.

After establishment of ligature-induced periodontitis in seven dogs, gingival lymphocyte, PBL and SNL were isolated by collagenase treatment and Ficoll-gradient procedure. The cell populations were examined by Giemsa staining and the lymphoproliferative responses were determined by the uptake of ^3H -thymidine.

80.3% lymphocytes and 3.6% macrophages were occupied in the cell population obtained from the

gingival tissues. Viability of the gingival lymphocytes was 77%. The mean count per minute (CPM) and standard error of the gingival lymphocytes, PBL and SNL of unstimulated culture were 399 ± 107 , 864 ± 127 , 758 ± 204 , respectively. The responses of PBL and SNL to PHA, Con A and PWM were remarkably high and peak responses were obtained at days 2 or 3 of culture. On the other hand, the response of gingival lymphocytes stimulated with mitogen was low and almost equal to the level of unstimulated lymphocytes. The peak activity of gingival lymphocytes was shown at day one of culture.

It is suggested that the response of gingival lymphocytes is not parallel to PBL or SNL and blastogenic activity of gingival lymphocytes unstimulated and stimulated with mitogens is low.

Key words : Dog, Experimental periodontitis, Gingival lymphocyte, Blastogenic response, Mitogen

要旨：イヌの実験的歯周炎における歯肉リンパ球の機能を調べるために、イヌに実験的歯周炎を惹起し、PHA, ConA, PWM に対する幼若転換を測定した。さらに末梢血、顎下リンパ節リンパ球との反応性の比較も行った。

雑種成犬7頭に絹糸結紮で歯周炎を惹起した後、コラゲナーゼ処理及び Ficoll 処理にて、歯肉リンパ球、末梢血及び顎下リンパ節リンパ球を抽出した。細胞の構成はギムザ染色標本で調べ、幼若転換は ^3H -thymidine の取り込み

で測定した。その結果、

歯肉細胞浮遊液中のリンパ球は 80.3% (73.0~90.0%), マクロファージの割合は 3.6% (0.8~10.8%) であった。歯肉リンパ球の生存率は 77% (61~89%) であった。未刺激における幼若転換値は、歯肉リンパ球、末梢血及び顎下リンパ節リンパ球でそれぞれ 399 ± 107 , 864 ± 127 , 758 ± 204 cpm $\pm$ S.E. であった。末梢血、顎下リンパ節リンパ球の PHA, ConA, PWM に対する反応は著明に亢進し、反応のピークは 2~3 日にみられ、一方歯肉リンパ球の反応は、マイトゲンで刺激した場合でも低く、殆んど未刺激の場合と変わらなかった。歯肉リンパ球の反応性のピークは培養 1 日目で見られ、以後減少した。

以上の事実より、歯肉リンパ球の反応は、末梢血、顎下リンパ節リンパ球と対応せず、反応性は極めて低いことが示唆された。

索引用語：イヌ、実験的歯周炎、歯肉リンパ球、マイトゲン、幼若転換

緒 言

ヒトにおける末梢血リンパ球のプラーク、細菌に対する幼若転換は、宿主免疫応答あるいは特異抗原に対する反応の指標として広く使用され、これまでにその報告は数多い¹⁻¹²⁾。

しかし、その結果については統一された見解がないまま現在に至っているのが実状である。ヒトにおける末梢血リンパ球の幼若転換に関する見解として、リンパ球のプラーク由来の物質に対する幼若転換は抗原特異的な反応で歯肉炎、歯周炎の有無と相関があるとする考え方¹⁻⁸⁾と、その反論として、その幼若転換は細菌特異性の反応ではなく、非特異的応答である⁹⁻¹²⁾との 2 つの意見に分けられる。このように見解が一致しない理由として、使用した細菌抗原の調整法の相違、ヒト歯周炎の病態把握の違い、抗原ないしマイトゲン濃度、培養日数、細胞濃度など培養系に対する考慮の不足、さらに結果の説明として stimulation index のみのものが多く、実際の cpm が不明瞭といった点が挙げられる¹³⁻¹⁵⁾。しかし、さらに基本的な問題として歯肉局所での免疫応答を末梢血リンパ球で反映できるかといった疑問がある。

末梢血リンパ球に対して、歯肉リンパ球の免疫応答に関する研究は、Ivanyi¹⁶⁾ が *Veillonella* に対するヒト歯肉リンパ球の分裂能が亢進し、末梢血リンパ球の応答と同様な結果であったと報告して以来、O'Neill¹⁷⁾ ら、山上¹⁸⁾による歯肉リンパ球の細胞障害性についての報告、さらに Daly ら¹⁹⁾による歯肉リンパ球の抗体産生能の報告があるにすぎない。

そこで、本研究は歯肉リンパ球の特性を知ることを目として、歯肉リンパ球の各種マイトゲンに対する幼若転換をイヌの実験的歯周炎をモデルに行った。併せて

末梢血、顎下リンパ節リンパ球との反応性の比較も行った。

材料と方法

1. 実験概要 (図 1)

図 1 に示す如く、実験動物として雑種成犬 9 頭 (体重 8~12.5 kg, 年齢不詳) を使用した。実験群 7 頭は実験に先立ち、臨床的健康歯肉の確立のため 1 ヶ月間のブラッシング期間を設けた。ブラッシングは、ケタラール® 50 (三共株式会社) 筋注麻酔下で、一歯につき 30 回ずつ頬舌側をスクラッピング法で行った。その際、0.1% クロールヘキシジン溶液の局所噴霧を併用した。臨床的健康歯肉の確立後、口腔内診査を行い、上下顎左右 CP₂P₃M₁ の 16 歯にラウンドバー #1/2 でグルーブを形成した。グルーブ下縁は歯肉辺縁に位置するよう配慮した。その後同歯の頬側歯肉にフェザー替刃メス #12 及び #15 で歯肉歯槽粘膜境に達する歯肉溝切開を加え、その中に厚さ 0.2 mm のステンレス板を歯肉歯槽粘膜境まで埋入し、グルーブに絹糸結紮を施してステンレス板の保持及びプラークの付着しやすい環境とした。

以後 3 ヶ月間、犬固型飼料 (クレア社) を軟泥状にしたソフトフードで飼育し歯肉に炎症を惹起した。屠殺時、口腔内診査及び末梢血を採取し滅菌生食水 (2 l, 加ヘパリン 10 U/ml) で頸動脈より灌流を 30 分間行った後、顎下リンパ節並びに歯肉を採取した。健康群 2 頭は臨床的健康歯肉の際の歯肉リンパ球を調べるため、1 ヶ月間のブラッシング後、直ちに屠殺して歯肉を採取した。

2. 口腔内診査

臨床的診査項目として、(1) 歯肉炎指数²⁰⁾, (2) プラーク指数²¹⁾, (3) ポケットの深さ, (4) 付着の喪失量を測定し、

図 1 実 験 概 要

歯肉片
リン酸緩衝液洗浄
加
1000 U/ml ペニシリン
1000 µg/ml ストレプトマイシン
細片化 1-2mm ³
コラゲナーゼ処理
Sigma type 1
0.1% 1時間 37°C.
遠 心
2000 rpm 10分間
メッシュ
遠 心
2000rpm 10分間
Ficoll-gradient
400×g 30分間
洗 淨
細胞浮遊液
2×10 ⁵ /well
RPMI 1640, 10% FCS

図 2 歯肉リンパ球の抽出法

X線写真撮影も行った。

歯肉炎指数，プラーク指数，ポケットの深さは1歯あたり頬側3点，舌・口蓋側中央1点，計4点で計測しその平均値を1歯あたりの値として16歯の平均値を個体の値とした。

付着の喪失量は，頬側中央1点でグループ下縁を基準とし，その位置からポケット底部までの距離を測って16歯における平均値を個体値として表わした。

3. 歯肉リンパ球の抽出方法（図2）

歯肉リンパ球の抽出は Mackler ら²²⁾の方法を一部改変して行った。歯肉片は重量測定後，リン酸緩衝液（日水製薬株式会社，加1,000 U/ml ペニシリン，1,000 µg/ml ストレプトマイシン）内でよく洗浄し歯肉バサミで1～2 mm³ に細片化した。それを 0.1% コラゲナーゼ（Sigma type I）を含むリン酸緩衝液 20 ml に浮遊し，よくピペティングしながら 37°C で1時間処理した。

その後 2,000 rpm で10分間遠心し，上清を捨て沈渣を60メッシュに通した。通過した沈渣にリン酸緩衝液を4 ml 加え，24 G 1/2 注射針及びナイロンガーゼに数回通し一様な細胞浮遊液とした²³⁾。これをリンパ球分離剤Lymphoprep®（第1化学薬品株式会社）3に対し細胞浮遊液4の割合で積層し，400 x g で30分間遠心してリンパ球層を得た。リンパ球の生存率はアクリジンオレンジ，エチジウムブロマイド法で確認した。

細胞浮遊液の一部は、塗抹乾燥後ギムザ染色標本を作製し、これを400倍率下で検鏡しリンパ球、上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ等を同定した。又同時期に採取した末梢血、顎下リンパ節に対しては、歯肉と同様に0.1% コラゲナーゼ処理を行いリンパ球を抽出した。末梢血の場合、真空採血管で採取した血液に等量の滅菌生食水を加えたものをLymphoprep® に積層し、得られたリンパ球に対してコラゲナーゼ処理を行った。又顎下リンパ節はシャーレ内でピンセット及びメッシュで組織を解きほぐし、培養液中に遊出してきた細胞をLymphoprep® による比重遠心かけ、得られたリンパ球を酵素処理した。

4. リンパ球幼若転換の測定

歯肉、末梢血並びに顎下リンパ節リンパ球は、10% 牛胎児血清 (56°C, 30 分間加熱非働化) を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO 加 1,000 U/ml ペニシリン, 1,000 µg/ml ストレプトマイシン) に浮遊し、マイクロプレート Falcon 3072 に 200 µl ずつ分注した。マイトーゲンとして Phytohemagglutinin-P (PHP-P, Difco), Concanavalin A (ConA, Pharmacia Fine Chemicals), Pokeweed mitogen (PWM, Sigma) の各種濃度のものを 20 µl ずつ加え 5% CO₂-95% air の条件下で1~4日間培養した。測定 24 時間前に 0.5 µCi ³H-thymidine (Amersham, specific activity 25 Ci/m mol) を加え Semi-automatic cell harvester (Laboscience Co., LTD) でグラスフィルター上に細胞を回収し、一晚フィルターを乾燥した。その後、トルエン 1 l 中に dimethyl POPOP 0.2 g, PPO 5.0 g (Packard) を含む液体シンチレーション液を 5 ml 加え、Liquid scintillation spectrometer (Packard model 3255) にて放射能活性を測定した。尚測定は duplicate あるいは triplicate で行い、データは全て counts per minute (cpm) で表わした。さらに末梢血、顎下リンパ節リンパ球を使い、以下の項目について培養条件を検討した。(1) マイトーゲンの至適濃度、(2) 至適培養日数、(3) 細胞の至適濃度、(4) コラゲナーゼの影響、(5) リンパ球以外の細胞混入による影響。

5. 組織学的評価

P₃頰側歯肉から採取した歯肉片は、直ちに 10% ホルマリンで固定後、通法に従いパラフィン包埋し、厚さ約 5 µm の連続切片を作製し H-E 染色して組織学的観察を行った。

6. データの統計処理

検定法は、対応のない Student-t test で行い、5% 以下の危険率をもって有意の差とした。

表 1 臨床的及び組織学的変化

	実験開始時		屠殺時	
臨床的所見 (n = 7)				
歯肉炎指数	0	**	1.8±0.1 (1.4-2.3)	
プラーク指数	0		3	
ポケットの深さ (mm)	1.1±0.02 (1.0-1.1)	**	1.9±0.1 (1.6-2.4)	
付着の喪失 (mm)	0	**	1.8±0.4 (0.8-3.3)	
組織学的所見 (n = 3)	――		リンパ球浸潤	

平均値±標準誤差 (範囲)

** : P<0.01で有意差あり

表 2 歯肉リンパ球

	実験群 n = 7	健康群 n = 2
歯肉片の重さ g	1.8±0.21* (1.3-2.9)	1.8±0.80 (1.0-2.6)
総リンパ球数 ×10 ⁶	3.40±1.27 (0.43-10.3)	0.05±0.003 (0.03-0.08)
生リンパ球数 ×10 ⁶	2.75±1.09 (0.31-8.65)	0.03±0.005 (0.02-0.03)
生細胞率 %	77±4 (61-89)	62±21 (41-83)
歯肉細胞中のリンパ球 の割合 % n = 5	80.3±3.6 (73-90)	――

* 平均値±標準誤差 (範囲)

結 果

1. 臨床的及び組織学的変化 (表1)

実験開始時から屠殺時までの臨床的变化は歯肉炎指数で平均 0 から 1.8 (1.4~2.3)、プラーク指数で平均 0 から 3、ポケットの深さは平均 1.1 mm (1.0~1.1 mm) から 1.9 mm (1.6~2.4 mm) であった。X線学的には骨吸収は認められなかったが、付着の喪失は平均 1.8 mm (0.8~3.3 mm) 認められた。組織学的には、好中球、形質細胞が少ないリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤像であった。

2. 歯肉リンパ球 (表2, 表3)

歯肉片の重さは、実験群、健康群ともに平均 1.8 g で、リンパ球の総数は前者が平均 3.40×10⁶ (0.43~

表 3 菌肉細胞浮遊液の細胞構成

	n = 5
リンパ球 %	80.3 ± 3.6 (73.0 - 90.0)
上皮細胞-線維芽細胞	16.0 ± 3.3 (8.2 - 24.4)
マクロファージ	3.6 ± 2.4 (0.8 - 10.8)
その他	1.2 ± 0.6 (0 - 2.7)

平均値 ± 標準誤差
(範囲)

図 3 末梢血リンパ球幼若転換のマイトーゲン濃度による変動

10.3×10^6) と後者の平均 5.0×10^4 ($3.0 \sim 8.0 \times 10^4$) に対して約 70 倍の増加が認められた。生細胞率は実験群、健康群それぞれ平均で 77% (61~89%), 62% (41~83%) であった。菌肉細胞浮遊液中のリンパ球の占める割合は平均 80.3% (73~90%) であった。表 3 に示す通りリンパ球以外の細胞として、上皮細胞及び線維芽細胞が平均 16.0% (8.2~24.4%), マクロファージが平均 3.6% (0.8~10.8%) 認められた。その他同定不可能な細胞が約 1.2% 見られた。

3. 培養条件の検討

1) マイトーゲンの至適濃度として 1~100 µg/ml の種々の濃度で検討したところ、末梢血、顎下リンパ節のリンパ球は、PHA, ConA, PWM とともに 5, 10, 50 µg/ml のいずれかに幼若転換のピークが認められ、特に PHA

図 4 顎下節リンパ球幼若転換のマイトーゲン濃度による変動

では 10 µg/ml, ConA では 5 µg/ml, PWM は 10 µg/ml の濃度で反応のピークがみられる傾向にあった (図 3, 図 4)。

2) 至適な培養日数は、末梢血リンパ球で 3 日、顎下リンパ節リンパ球では 2 日であった (図 5, 図 6)。

3) リンパ球濃度については、well あたり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ の範囲で 4 つの条件で検討した結果、 2×10^5 でリンパ球は最も良く反応した。特に未刺激の場合、 2×10^5 の濃度で最大の反応を示し有意の差が認められた ($p < 0.05$, 図 7)。

4) コラゲナーゼ処理による影響は、表 4 に示す如く PHA, ConA, PWM いずれの刺激においても、未処理群と処理群との間には cpm の値に有意差は認められなかった。しかし未刺激の場合、未処理群が 480 ± 118 cpm, 処理群で 792 ± 151 cpm となり、有意差はないものの処理群の反応が増加傾向を示した。

5) リンパ球以外の細胞混入の影響に関して、回収した菌肉細胞浮遊液中に上皮細胞及び線維芽細胞が 8.2~24.4% 混入していたことから、上限より多めの 30% の割合で上皮細胞及び線維芽細胞を混合してリンパ球の幼若転換に与える影響を調べた。その結果、上皮細胞及び線維芽細胞自体の分裂能は低いものの、これらの細胞の混入によってリンパ球の分裂が抑制される傾向が見られた (図 8)。

図 5 末梢血リンパ球幼若転換の培養日数による変動

図 6 顎下節リンパ球の幼若転換培養日数による変動

図 7 末梢血リンパ球の幼若転換の細胞濃度による変動

表 4 コラゲナーゼ処理による幼若転換の変化

	末梢血リンパ球 n = 5 - 6	
	コラゲナーゼ(+)*	コラゲナーゼ(-)
未 刺 激	792 ±151	480 ±118
PHA 10μg/ml	4122 ±1039	3038 ±1083
ConA 5μg/ml	3263 ±482	3251 ±953
PWM 10μg/ml	2366 ±538	2675 ±626
生 細 胞 率 %	94	96

平均値 ±標準誤差

* 0.1% 1 時間 37°C

4. リンパ球の幼若転換 (表 5)

歯肉、末梢血並びに顎下リンパ節リンパ球の培養 3 日目における幼若転換結果を表 5 に示した。培養条件は上記に検討した通り、リンパ球を PHA (10 μg/ml), ConA (5 μg/ml), PWM (10 μg/ml) で刺激し、細胞濃度は well あたり 2 × 10⁵ とした。その結果、マイトゲン刺激では顎下リンパ節で最も反応が高く、PHA, ConA, PWM の cpm は順に、40351 ± 16282, 36568 ± 12603, 44602 ± 16749 と PWM が一番高い反応を示した (p < 0.05)。

末梢血では顎下リンパ節よりも反応は劣るものの、顎下リンパ節とは反対に PHA, ConA に対する反応が PWM よりも亢進していた。それぞれの cpm は順に

表 5 リンパ球の幼若転換

	n = 4 - 7			
	未 刺 激	PHA	ConA	PWM
歯 肉	399 ± 107	169 ± 49 (0.5)	473 ± 285 (1.7)	192 ± 58 (0.6)
末 梢 血	864 ± 127	6540 ± 2222 (8.3)	7269 ± 2838 (9.2)	3242 ± 1030 (4.4)
顎下リンパ節	758 ± 204	40351 ± 16282 (55.2)	36568 ± 12603 (55.7)	44602 ± 16749 (63.6)

* P < 0.05 で有意差あり
() : S.I.
PHA : 10μg/ml , ConA : 5 μg/ml , PWM : 10μg/ml
平均値 ± 標準誤差

図 8 歯肉細胞 30% 混入による顎下節リンパ球の反応

6540 ± 2222, 7269 ± 2838, 3242 ± 1030 であった (p < 0.05)。

一方、歯肉では PHA で 169 ± 49, ConA で 473 ± 285, PWM で 192 ± 58 と未刺激の cpm 399 ± 107 と比べると、いずれのマイトゲンにも反応を示さなかった。又未刺激における歯肉、末梢血及び顎下リンパ節リンパ球の反応性を比較すると、順に 399 ± 107, 864 ± 127, 758 ± 204 cpm と歯肉リンパ球は後 2 者に対して、有意の差は

図 9 歯肉リンパ球幼若転換の培養日数による変動

ないものの減少傾向にあった。さらに培養日数による変化は、すでに図 5, 6 に示した通り、末梢血リンパ球は 3 日、顎下リンパ節リンパ球で 2 日に反応のピークがみられたのに対して、歯肉リンパ球では図 9 に示す通り、PHA を除き未刺激, ConA, PWM は 1 日目に cpm の増

加を見せ、以後急激に減少した。特に未刺激、PWM で培養1日と3日との間に有意差が認められた ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。

考 察

1. 実験的歯周炎の惹起について

実験に先立ち、イヌの歯肉にブラッシングを行ない臨床的健康歯肉を確立した。これは実験動物が雑犬であるため、既存の歯肉炎に個体差があり様でないことから、実験スタート時に条件を揃えたこと、その後、絹糸の歯頸部結紮により歯周炎を誘発した場合、その炎症状態がよく把握できるためである。

本研究では、山岸ら²⁴⁾の方法を参考に、歯石除去後0.1% クロールヘキシジン溶液の局所噴霧を併用した徹底的なブラッシングを1日1回、これを4週間続けて臨床的健康歯肉を確立した。歯肉の炎症惹起方法は従来本教室で行ってきた方法^{25, 26)}に、歯肉溝切開を加え、ステンレス板を埋入する方法を採用した。これにより辺縁歯肉、付着歯肉に強い炎症を起こすことができた。Schroeder ら²⁷⁾は絹糸の歯頸部結紮とソフトフードの飼育でイヌに比較的短期間のうちに実験的歯周炎を惹起させており、又 van Dijk ら²⁸⁾は、銅バンドを装着する方法を用いて実験的歯周炎を誘発している。

本研究では歯頸部の絹糸結紮と歯肉溝へのステンレス板挿入により、比較的短期間に歯周ポケットの形成、付着の喪失を伴う歯周炎を起こしたものの骨吸収は認められなかった。さらに組織学的には形質細胞の浸潤は極めて弱く、リンパ球を主体とした炎症像であったことから Page らの分類で early lesion に相当すると言える。

2. 歯肉リンパ球の抽出方法について

歯肉リンパ球の抽出は Mackler らの方法を改変して行った。従来 Sinden ら²⁹⁾、Ivanyi¹⁶⁾、Daly ら³⁰⁾が歯肉リンパ球の抽出方法について報告しているが、歯肉リンパ球を抽出する際の問題点として、(1) コラゲナーゼ使用の有無及び使用する際の濃度、処理時間、(2) 比重遠心分離法の使用の有無並びに他の細胞の混入の程度が挙げられる。

本研究において、イヌの歯肉片をほぐし、その中からリンパ球を抽出する際、コラゲナーゼによる酵素処理は不可欠であった。

その理由として、ヒトの炎症歯肉では炎症はかなり慢性化しており歯肉結合組織線維が喪失し脆弱化している状態であり、これに反して、イヌの炎症歯肉の病期は早

期で、歯肉結合組織線維の喪失は比較的限局しており、かつ線維性に富み堅固な状態を呈しているためと考えられたからである。

酵素処理を行うにあたり、予備実験で末梢血リンパ球を使い、種々のコラゲナーゼ濃度の幼若転換に与える影響を検討した。酵素処理群で 0.1% 濃度までは幼若転換の cpm は、無処理群と変わらず、0.5% を越えると cpm の低下が認められたことから、コラゲナーゼ濃度を 0.1% と設定した。事実 表4で示したように、コラゲナーゼ処理による影響はないと思われる。0.5% 以上の濃度でみられた幼若転換の低下は、O'Neill¹⁷⁾ らが言うように、コラゲナーゼのようなプロテアーゼによるリンパ球のレセプターへの障害と考えられる。次にコラゲナーゼ処理時間について、Sinden ら²⁹⁾は30分、60分、90分と処理時間の違いによる検討を行い、90分を越えると生存率が減少したと報告していることから、本研究では60分間処理で行った。しかし、本研究でのリンパ球の生存率は実験群で平均 77% とやや低下していた。これは酵素処理による影響とは考えられず、むしろメッシュ操作等に生ずる機械的障害の可能性が大きい。Mackler ら²²⁾もメッシュでリンパ球を抽出すると細胞への障害が大きくなり生存率が低下すると述べている。これに反して Ivanyi¹⁶⁾ はメッシュによる歯肉リンパ球を抽出し90%以上の生存率を得ている。このほか、歯肉の炎症程度を評価するのに、Mackler ら²²⁾は Periodontal Disease Index を、Ivanyi¹⁶⁾ は Periodontal Index を使用しており、リンパ球の幼若転換や生存率に関しては、歯肉の炎症状態の違いやコラゲナーゼ濃度やその処理時間、メッシュの利用などの操作法の微妙な違いが関与していると考えられる。

次にリンパ球分離剤について考察する。Mackler ら²²⁾の報告によれば、Ficoll を使用しない場合、上皮細胞と線維芽細胞の混入が 48~64% であるとしている。又 Daly ら³⁰⁾は Ficoll 分離前の歯肉細胞浮遊液中に、上皮細胞が 42.4%、線維芽細胞が 18.3% 認められると報告した。

本研究では、Ficoll 分離前の状態は調べていないが、Ficoll 分離後、上皮細胞並びに線維芽細胞が平均 16% (8.2~24.4%) 混入していたことから、Ficoll を使用しない場合、この数値はさらに高くなったものと予想される。さらに、さきの報告の通り上皮細胞並びに線維芽細胞が 30% の割合で混入すると、リンパ球の幼若転換に影響することから、これらの細胞の混入を防ぐ上で Ficoll の使用は不可欠であると思われる。又歯肉組織に

存在する血液由来のリンパ球の混入の可能性については、Ivanyi¹⁶⁾ は細胞浮遊液中の赤血球を算定し約 0.3% 程度であると報告している。本研究では歯肉片を採取する前に灌流操作を行っており、実際血液由来のリンパ球の混入はなかったか、あったとしても極めて少ないものと思われる。

マクロファージの同定は、ギムザ染色塗抹標本を 400 倍率の顕微鏡下で次の 4 項目を基準に行った。(1) 細胞は円形でなく不定形である。(2) 細胞質/核の比が大きい。(3) 核はハート状を呈し円形ではない。(4) 細胞質に顆粒が存在する。その結果、マクロファージの混入は平均 3.6% (0.8~10.8%) であった。Sinden ら²⁹⁾ は、平均 7.3% (5.4~10.1%)、Daly ら³⁰⁾ は平均 7.7% (4.4~14.2%) と報告しているように、本研究と比べると高い値を示している。この違いは、歯肉の炎症程度、分離法、同定法の違いにあると思われる。口腔常在菌の汚染については、緩衝液及び培養液中に 1,000 U/ml ペニシリン、1,000 µg/ml ストレプトマイシンを加えたことから、その危険性はなく培養期間を通して培地内での細菌増殖は見られなかった。

3. 歯肉リンパ球の幼若転換について

今回の実験で歯肉リンパ球はマイトーゲンに対し反応を示さないことが認められた。その点について考察する。

一般に、リンパ球の幼若転換は *in vitro* の反応を評価することから、種々の外因的条件により反応が規制されるのは言うまでもないが、個体に内在する生物学的周期性によっても規制される。従って、リンパ球の幼若転換を判定する際、これらの点を考慮する必要がある。

最初に、歯肉リンパ球のマイトーゲン至適濃度の違いが考えられる。末梢血、顎下リンパ節リンパ球における PHA, ConA, PWM の至適濃度は、それぞれ 10, 5, 10 µg/ml であった。特に末梢血リンパ球で、実験開始時、炎症惹起 2 週目、屠殺時の炎症経過 3 ヶ月における反応性の違いを予備実験で検討したところ、PHA, ConA では炎症惹起 2 週目で実験開始時と比較して cpm の減少が見られ、3 ヶ月後には反応が亢進していた。PWM では炎症の進行に伴いリンパ球の幼若転換は亢進する傾向が見られた。この場合 5, 10, 50 µg/ml とマイトーゲン濃度の変動にもかかわらず、これら反応性には有意差はみられず、Lang ら³¹⁾ の言う末梢血リンパ球のマイトーゲン刺激による dose response は認められなかった。従って、今回歯肉リンパ球で使用したマイトーゲン濃度が直接歯肉リンパ球に対する至適濃度であるとは断言でき

ないが、少なくとも反応を阻害する濃度とは考えにくい。

次に、培養日数について考えると、末梢血及び顎下リンパ節リンパ球の反応は、それぞれ培養 2 日ないし 3 日目に最高値を示した。歯肉リンパ球の場合、傾向として 1 日目に反応のピークが見られることから 5 日目以降に反応する可能性は少ないと考えられる。

Suzuki ら³²⁾、Mangan ら³³⁾ が指摘するように、使用プレートの型及び細胞濃度も結果を左右する因子と考えられる。今回使用したのは Falcon 3072 の flat bottom type のもので、そのプレートによる細胞濃度を検討したところ、至適濃度は 2×10^5 /well であった。特に未刺激において、この濃度でリンパ球の反応性に有意差が見られたことから、反応性を比較する場合、プレートの型や細胞濃度は考慮すべき事項であると言える。

PHA, ConA, PWM は、いずれもマクロファージ依存性のマイトーゲンであることから、リンパ球の応答を知る上でマクロファージの役割は無視できない問題である。Stashenko³⁴⁾、Carpenter ら³⁵⁾ は歯周病原性細菌やマイトーゲンに対するリンパ球の幼若転換、抗体産生におけるマクロファージの役割をマクロファージの含有比を 15% または 20% で検討しているが、本研究で得られたマクロファージの含有比は平均 3.6% 程度であり、リンパ球の反応を抑制する濃度とは言えない。

以上、本研究で歯肉リンパ球反応性低下をきたすものとして、マイトーゲン濃度、培養日数、マクロファージの含有比など考察してみたが、これらとの関連性は少ないように思われる。

そこで歯肉リンパ球のマイトーゲンに対する反応性低下をひきおこす可能性のある別の因子を以下に挙げてみる。

第 1 に、プラーク成分の直接的作用が考えられる。歯肉の炎症に伴い上皮の透過性が増加し、細菌性プラーク成分が組織内に侵入し浸潤しているリンパ球に作用するという可能性である。事実 *in vitro* の予備実験において、イヌのプラークを超音波処理し、その菌液 (タンパク濃度 1 µg/ml, 20 µg/ml) と末梢血リンパ球を 1 時間培養した後、マイトーゲン刺激に対する反応性を検討した。その結果、プラークと接触したリンパ球の反応性が、未処理のリンパ球と比較すると平均 78% 抑制された。このことは歯肉リンパ球の反応性はプラーク成分によって反応がかなり修飾される可能性を示すものである。事実 Shenker ら³⁶⁾ は、若年性歯周炎患者に生棲する *Actinobacillus actinomycetemcomitans* がリンパ球の反応を抑

制することを証明しており、そのメカニズムについて細菌のもつ抑制因子がリンパ球レセプターの抗原またはマイトゲンとの競合を阻害したり、あるいはサプレッサー細胞を活性化させるためであろうと推定している。

第2に、歯肉リンパ球の培養条件下での生存率が問題となる。本研究から歯肉リンパ球の末刺激の cpm が 399 ± 107 で、末梢血、顎下リンパ節リンパ球の、それぞれ 864 ± 127 , 758 ± 204 と比べて低下していた。培養3日目における well あたりの生リンパ球数を検討すると、末梢血、顎下リンパ節リンパ球の場合、それぞれ 0.63×10^5 , 0.61×10^5 であったのに対し、歯肉リンパ球では 0.1×10^5 と減少していた。これらの結果が歯肉リンパ球の幼若転換の劣化という現象に反映しているように思われる。

第3に、リンパ球以外の細胞の影響が考えられる。歯肉リンパ球浮遊液中には平均 16% の割合で、上皮細胞及び線維芽細胞が混入していた。これら細胞の混入は図8に示したように、歯肉リンパ球の反応性に多少とも影響を与えていると考えられる。どのようなメカニズムで、これらの細胞が反応を抑制しているかは不明であるが、培養後のリンパ球生細胞数は減少しないことを考慮すると、これらの細胞の混入が毒性的に作用しているとは考えにくい。恐らく well 内でのリンパ球の cell to cell contact の状態が、これらの細胞の混入によって疎になっているためか、リンパ球のマイトゲンに対するレセプターが何らかの形でブロックされているためのいずれかとも考えられる。

このように、歯肉リンパ球のマイトゲンに対する応答は末梢血及び顎下リンパ節リンパ球とは、かなり性状が異なることが示された。今後、さらに検討を加えて細菌抗原に対する幼若転換も含めて、歯肉局所におけるリンパ球の活性機能について追求する必要がある。

結 論

イヌの実験的歯周炎における歯肉リンパ球の機能を調べるために、雑種成犬7頭に実験的歯周炎を惹起し、歯肉局所に浸潤したリンパ球の各種マイトゲンに対する幼若転換を測定した。さらに末梢血、顎下リンパ節リンパ球との反応性の比較を行った。

その結果

1. 採取した歯肉湿重量は平均 1.8 g ($1.3 \sim 2.9$ g) で、回収したリンパ球総数及びリンパ球の生存率は平均 3.40×10^6 ($0.43 \sim 10.3 \times 10^6$), 平均 77% ($61 \sim 89\%$) で

あった。歯肉細胞浮遊液中のリンパ球、上皮細胞及び線維芽細胞、さらにマクロファージの割合は、それぞれ平均で 80.3% ($73 \sim 90\%$), 16.0% ($8.2 \sim 24.4\%$), 3.6% ($0.8 \sim 10.8\%$) であった。

2. 歯肉、末梢血及び顎下リンパ節リンパ球の幼若転換は、末刺激の場合、順に 399 ± 107 , 864 ± 127 , 758 ± 204 cpm であった。PHA 刺激の場合、cpm で順に 169 ± 49 , 6540 ± 2222 , 40351 ± 16282 となり、ConA では、 473 ± 285 , 7269 ± 2838 , 36568 ± 12603 cpm であった。又 PWM 刺激では 192 ± 58 , 3242 ± 1030 , 44602 ± 16749 の値を示した。

3. 歯肉局所のリンパ球反応は、末梢血、顎下節リンパ球反応を反映していないことが示唆された。

謝 辞

本稿を終るにあたり、終始懇篤なる御指導と御校閲を賜りました原 耕二教授に心から感謝申し上げます。又本研究の遂行に際して懇切丁寧な御教示並びに御助言を賜りました本学歯科保存学第2教室 吉江弘正講師に謹んで感謝の意を表すると共に、第2保存学教室員の皆様の御協力に感謝申し上げます。

尚、本研究は1983年(昭和58年)文部省科学研究費一般研究C課題番号58570797の補助で行われたことを付記する。

文 献

- 1) Ivanyi, L. and Lehner, T. : Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. Arch. Oral Biol., 15 : 1089-1096, 1970.
- 2) Ivanyi, L. and Lehner, T. : Lymphocyte transformation by sonicates of dental plaque in human periodontal disease. Arch. Oral Biol., 16 : 1117-1121, 1971.
- 3) Horton, J.E., Leikin, S. and Oppenheim, J.J. : Human lymphoproliferative reaction to saliva and dental-deposits; An in vitro correlation periodontal disease. J. Periodontol., 43 : 522-527, 1972.
- 4) Mackler, B.F., Altman, L.C., Wahl, S., Rosentreich, D.L., Oppenheim, J.J. and Mergenhagen, S.E. : Blastogenesis and lymphokine synthesis by T and B lymphocytes from patients with periodontal disease. Infect. Immun., 10 :

- 844-850, 1974.
- 5) Baker, J.J., Chan, S.P., Socransky, S.S., Oppenheim, J.J. and Mergenhausen, S.E. : Importance of *Actinomyces* and certain negative anaerobic organisms in the transformation of lymphocytes from patients with periodontal disease. *Infect. Immun.*, 13 : 1363-1368, 1976.
- 6) Lang, N.P. and Smith, F.N. : Lymphocyte blastogenesis to plaque antigens in human periodontal disease. I : Population of varying severity of disease. *J. Periodont. Res.*, 12 : 298-309, 1977.
- 7) Patters, M.R., Genco, R.J., Reed, M.J. and Mashimo, P.A. : Blastogenic response of human lymphocytes to oral bacterial antigens : Comparison of individuals with periodontal disease to normal and edentulous subject. *Infect. Immun.*, 14 : 1213-1220, 1976.
- 8) Patters, M.R., Sedransk, N. and Genco, R.J. : Lymphoproliferative response during resolution and recurrence of naturally occurring gingivitis. *J. Periodontol.*, 48 : 373-380, 1977.
- 9) Kiger, R.D., Wright, W.H. and Creamer, H. R. : The significance of lymphocyte transformation responses to various microbial stimulants. *J. Periodontol.*, 45 : 780-785, 1974.
- 10) Tew, J.G., Miller, G.A., Green, E.J., Rice, P. L., Jordan, W.P., Palcanis, K.G. and Ranney, R.R. : Immunological studies of young adults with severe periodontitis. II : Cellular factors. *J. Periodont. Res.*, 16 : 403-416, 1981.
- 11) Osterberg, S.K., Page, R.C., Sims, T. and Wilde, G. : Blastogenic responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from individuals with various forms of periodontitis and effects of treatment. *J. Clin. Periodontol.*, 10 : 72-88, 1983.
- 12) Suzuki, J.B., Sims, T.J., Singer, D.L. and Page, R.C. : Blastogenic responsiveness of human lymphoid cells to mitogens and homogenates of periodontal pocket bacteria. *J. Periodont. Res.*, 19 : 352-365, 1984.
- 13) Lehner, T. : Cellular immunity in periodontal disease : An overview. Genco, R.J. and Mergenhausen, S.E., *Host-parasite interaction in periodontal disease*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1981, 202-216.
- 14) Page, R.C. : Lymphoid cell responsiveness and human periodontitis. Genco, R.J. and Mergenhausen, S.E., *Host-parasite interaction in periodontal disease*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1981, 217-224.
- 15) Campana, L.R. : Lymphocyte transformation responses in gingivitis and periodontitis : A review. *J. Periodontol.*, 52 : 367-372, 1981.
- 16) Ivanyi, L. : Stimulation of gingival lymphocytes by antigens from oral bacteria. Lehner, T. and Cimasoni, G., *The borderland between caries and periodontal disease*. Academic Press, London, 1980, 125-134.
- 17) O'Neill, P.A., Woodson, D.L. and Mackler, B. F. : Cytotoxic activity. *J. Periodont. Res.*, 17 : 50-59, 1982.
- 18) 山上紘志, 木田友信, 岡田 宏 : ヒト歯肉由来線維芽様細胞に対する抗体依存性細胞障害の実験モデル. *日歯周誌*, 26 : 101-109, 1984.
- 19) Daly, C.G., Cripps, A.W. and Clancy, R.L. : Lymphocytes form chronically inflamed human gingiva. II. Immunoglobulin production in vitro. *J. Periodont. Res.*, 18 : 132-138, 1983.
- 20) Loe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol. Scand.*, 21 : 533-551, 1963.
- 21) Silness, J. and Loe, H. : Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol. Scand.*, 22 : 121-135, 1964.
- 22) Mackler, B.F., Withers, J.A., Woodson, D.L., Coker, E., Herrin, A., Friedman, L. and O'Neill, P.A. : Human gingival lymphocytes. I. Methodology for the isolation of human gingival lymphocytes. *J. Dent. Res.*, 58 : 1946-1952, 1979.
- 23) 斉藤和久, 多田隈卓史 : Cunningham and Szenberg のプラーク法, 免疫実験操作法 A, 日本免疫学会編, 免疫細胞Ⅲ, 1971, 485-490.
- 24) 山岸 茂 : 菌破壊液滴下により発生したイヌの初期歯肉炎について一主として病理組織学的観察を

- 中心として一. 日歯周誌, 23 : 69-83, 1981.
- 25) 茂手木義男 : イヌの実験的歯肉炎に関する免疫病理学的研究, 第2報 歯肉炎発生と免疫複合体について. 日歯周誌, 23 : 569-579, 1981.
 - 26) 山下 智 : イヌの実験的歯肉炎における歯肉免疫グロブリンの動態. 日歯周誌, 24 : 249-265, 1982.
 - 27) Schroeder, H.E. and Lindhe, J. : Conditions and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dogs. J. Periodontol., 51 : 6-19, 1980.
 - 28) van Dijk, L.J., Jansen, J., Pilot, T. and van der Weele, L. Th. : Artificial periodontal defects in beagle dogs. A clinical evaluation during 24 months. J. Periodontol., 53 : 449-452, 1982.
 - 29) Sinden, P.R.V. and Walker, D.W. : Inflammatory cells extracted from chronically inflamed gingiva. J. Periodont. Res., 14 : 467-474, 1979.
 - 30) Daly, C.G., Clancy, R.L. and Cripps, A.W. : Lymphocytes from chronically inflamed human gingiva. I. Cell recovery and characterization in vitro. J. Periodont. Res., 18 : 67-74, 1983.
 - 31) Lang, N.P. and Smith, F.N. : Lymphocyte response to T-cell mitogen during experimental gingivitis in humans. Infect. Immun., 13 : 108-113, 1976.
 - 32) Suzuki, J.B., Sims, T.J. and Page, R.C. : Effect of factors other than pathologic status on responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic periodontitis. J. Periodontol., 54 : 408-419, 1982.
 - 33) Mangan, D.F. and Lopatin, D.E. : Polyclonal activation of human peripheral blood B lymphocytes by *Fusobacterium nucleatum*. Infect. Immun., 40 : 1104-1111, 1983.
 - 34) Stashenko, P. : Regulatory effect of monocytes on T cell proliferative responses to oral microbial antigens. Infect. Immun., 42 : 938-947, 1982.
 - 35) Carpenter, A.B., Sully, E.C., Palcanis, K.G. and Bick, P.H. : Role of monocytes in polyclonal immunoglobulin production stimulated by sonicates of periodontally associated bacteria. Infect. Immun., 42 : 853-863, 1983.
 - 36) Shenker, B.J., Mcarthur, W.P. and Tsai, C. C. : Immune suppression induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. I. Effects on human peripheral blood lymphocyte responses to mitogens and antigens. J. Immunol., 128 : 148-154, 1982.
-