T 細胞による多クローン性 B 細胞活性化の修飾

—特に、多クローン性 IgG 産生の増強について—

伊 藤 博 夫

大阪大学歯学部口腔治療学講座

(指導：岡田 宏教授)

(昭和 61 年 12 月 18 日受付)

T Cells Modulate T-independent Polyclonal B Cell Activation and Enhance IgG Synthesis

Hiroo ITO

Department of Periodontology and Endodontology, Osaka University, Faculty of Dentistry

(Director : Prof. Hiroshi OKADA)

Using murine splenic B and T cell populations, it was investigated *in vitro* how T cells effected on T-independent polyclonal B cell activation (PBA) induced by sonic extract from *Actinomyces viscosus* T14V and bacterial lipopolysaccharide. By admixture of separated B and T cell populations, it was demonstrated that normal splenic T cells were able to enhance IgG synthesis in PBA. Further experiments were done to investigate the phenotype of the T cells and the mechanisms to enhance IgG synthesis in PBA. Results were as follows;

1. L3T4 positive T cells were able to enhance IgG synthesis in PBA, but Lyt-2 positive cells were not.
2. L3T4 positive T cells were activated in PBA,

but not activated by polyclonal B cell activators themselves.

3. Anti-L3T4 monoclonal antibody blocked the T cell function to enhance IgG synthesis.

4. Ia antigens were increased on the surface of B cells activated in PBA. These B cells strongly activated T cells in syngeneic mixed lymphocyte reaction.

These results suggested that autoreactive T cells which recognized self-Ia antigens expressed on the surface of B cells would contribute to augmentation of IgG synthesis. Therefore, it was supposed that periodontal lesion dominated by IgG producing cells could be established by PBA modulated by autoreactive T cells.

Key words : Periodontal disease, Polyclonal B cell activation (PBA), Autoreactive T cell, Ia antigen, Syngeneic mixed lymphocyte reaction

要旨 : *Actinomyces viscosus* T 14 V 株の超音波破碎上液(Av. sup)と大腸菌リポ多糖(LPS)による T 細胞非依存性の多クローン性 B 細胞活性化(PBA)に対する T 細胞の影響を検討した。その結果、T 細胞は T 細胞非依存性の PBA による IgG 産生を増強する事が明らかになった。更に、この様な機能を有する T 細胞の性状、及び、T 細胞による IgG 産生の増強機構について検討した結果、helper/inducer サブポピュレーションの T 細胞が、PBA によって活性化

された自己のB細胞表面上のIa抗原に反応して活性化され、この様な自己反応性T細胞がPBAによるIgG産生を増強する事が示唆された。以上の結果から、PBAに自己反応性T細胞が関与して、多数のIgG産生形質細胞が浸潤、増生している歯周炎病巣が形成される可能性が示唆される。

索引用語：辺縁性歯周炎，多クローン性B細胞活性化（PBA），自己反応性T細胞，Ia抗原，自己リンパ球混合培養反応（自己MLR）

緒 言

辺縁性歯周炎の病理組織像としては、形質細胞、とりわけIgG産生細胞の著しい浸潤、増殖が認められる¹⁻⁴⁾。ここで産生される免疫グロブリン(Igs)が、プラーク構成菌に対する特異抗体であることを示唆する報告もあるが⁵⁻⁸⁾、Igsと補体成分の同時局在を示す症例は少なく、たとえ認められても、この免疫複合物の沈着が認められるのは、病変のごく一部にしか過ぎない^{7,9)}。さらに、Clagettら¹⁰⁾は、炎症歯肉組織中の組織固着性の免疫複合物は、抽出可能な全Igsの僅か0.2%でしかないと報告している。

一方、デンタルプラークを構成するグラム陽性やグラム陰性の細菌が、ヒトやマウスのリンパ球を非特異的に刺激しIgs産生を誘導する、いわゆる多クローン性にB細胞を活性化(Polyclonal B cell Activation; PBA)する能力を有することが証明されている¹¹⁻¹⁸⁾。例えばClagettら¹¹⁾は、*Actinomyces viscosus*のガラスビーズ破碎上液(AVIS)がマウスのリンパ球に対して示すPBA活性について詳細に解析し、AVISが、T細胞の関与を必要とせずに、直接B細胞に作用してこれをIgs産生細胞にまで分化させる事を明らかにした。

これらの成績を総合すると、歯周病巣で産生されるIgsの大部分は、PBAによって、非特異的に産生されている可能性が高いと考えられる。しかしながら、これまでのマウスの細胞を用いたPBAについての報告においては、産生されるIgsのクラスは、常に、IgMがIgGよりも圧倒的に優位であり、IgG保有細胞の優位な歯周病巣の成立を、十分に説明するものではない。

他方、木田³⁾、Okadaら⁴⁾は、B細胞性病変と考えられてきた歯周炎病巣中にも多数のT細胞が局在することを証明し、しかもこれらのT細胞が活性化されている事を示唆する結果を得た¹⁹⁾。これは、T細胞が歯周病巣の形成に関与している可能性を示唆するが、歯周病巣中におけるT細胞の機能については、T細胞表面マーカーから、それが免疫反応を促進するものか、或は抑制するものかについてのみを類推しようとする域に留まってお

り^{3,4,19-21)}、その詳細は、いまだ明らかになっていない。

また一方、T細胞非依存性の抗体産生がT細胞によって修飾を受けるという報告²²⁻²⁵⁾や、B細胞がIgM産生細胞からIgG産生細胞へのクラススイッチを行うためにはT細胞由来の因子が必要であるといった報告²⁶⁻²⁹⁾がある。

そこで、PBA反応とT細胞の両者が、歯周病巣の形成にどのように関わっているのかを検討する一環として、マウスのT細胞非依存性のPBAにおけるIgs産生に対するT細胞の影響、特にIgG産生に対する影響について詳細に検討を行った。

材料および方法

1. マウス

8から12週令のBALB/c、雄マウス(静岡実験動物農業協同組合、浜松)を用いた。

2. 多クローン性B細胞活性化(PBA)物質

Actinomyces viscosus T14V株は、Dr.F.C. McIntire (Department of Oral Biology, School of Dentistry, University of Colorado, Medical Center, Denver, Colorado)より恵与された。PBA物質の調製方法は、原田¹⁸⁾の方法に従った。すなわち、菌体を超音波処理(20 kc/sec, 4°C, 20 min)し、5000×gで、4°C, 20分間遠心して菌体を除去し、上液(以下Av. sup)を得、これをPBA物質として以下の実験に用いた。

Escherichia coli 0217:B8株よりフェノール法によって抽出されたリポ多糖(以下LPS)は、Difco Laboratories (Detroit, Mich.)より購入した。

3. T細胞およびB細胞の精製

マウスより無菌的に脾細胞浮遊液を調製し、トリス塩化アンモニウム処理にて赤血球を溶血除去後、Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden)カラムを通過させ、可及的にマクロファージを除いた¹⁸⁾。このようにして得られた脾臓リンパ球画分を、アフィニティー精製抗マウスIgs抗体(anti-IgG+A+M, Cappel, Malvern, PA)を用いたpanning法³⁰⁾によって、B細胞とT細胞に分画した。方法を簡単に示す

と、抗体をあらかじめ吸着させた細菌培養用プラスチック製ペトリ皿に、3 ml の細胞浮遊液 (1×10^7 個/ml) を入れ、室温で1時間インキュベートし、非付着性であるT細胞を取り出したのちペトリ皿を Ca^{2+} , Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) でよく洗い、PBS(-) 中で強くピペッティングを行って付着性のB細胞を取り出した。更に、T細胞画分については、同一操作を繰り返すことで、またB細胞画分については抗Thy-1.2モノクローナル抗体 (moAb) (clone F7D5, Serotec Ltd., Blackthorn, Bicester, England) と家兎補体を用いた補体依存性細胞障害法によって僅かに残るT細胞を融解除去し、各細胞画分の精製に努めた。細胞画分の純度をフローサイトメトリー (FCM) を用いた蛍光抗体法によって確認した結果、B細胞画分におけるThy-1抗原陽性細胞率は1%未満、表面Igs陽性細胞率は90%以上、T細胞画分におけるThy-1抗原陽性細胞率は85%以上、表面Igs陽性細胞率は3%未満であった。

4. T細胞サブポピュレーションの分画

精製されたT細胞は、moAbと家兎補体を用いた補体依存性細胞障害法によって、helper/inducer T細胞と suppressor/cytotoxic T細胞に分画した。helper/inducer T細胞を認識する moAb として、抗 L3T4 moAb³¹⁾ (clone GK 1.5, Dr.F.W. Fitch, University of Chicago より恵与された)、suppressor/cytotoxic T細胞を認識するために抗Lyt-2.2 moAb (NEN, Boston, Mass.) を用いた。なお、helper/inducer T細胞の除去に際しては、抗 L3T4 moAb のみでは、完全な細胞障害性が得られないため、T細胞を抗 L3T4 moAb と反応させた後、さらに抗ラット IgG 抗体 (Cappel) と反応させた。

5. 細胞培養の条件

細胞培養液は、RPMI-1640 培地 (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.) を基礎に、ウシ胎児血清 (FCS) (Flow Laboratories, Irving, Scotland) を 10%, 2-mercaptoethanol (2 ME) 5×10^{-5} M, ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (いずれも和光純薬工業、大阪) の割合で加えたものを使用した。以下、これを培養液という。

細胞培養は、気温 37°C, 湿度 97%, および 5% の CO_2 を含む空気中で行った。

6. Igs 産生量の測定

B細胞 5×10^4 個に対し、種々の個数のT細胞の存在下もしくは非存在下でPBA物質による刺激を行い、マイクロカルチャープレート (96 wells, round bottom, Corning Glass Works, Corning, NY) を用いて7日間培

養を行い、培養上清中に産生されたIgG、またはIgMを微量酵素免疫測定法 (ELISA) にて測定した。PBA物質は予備実験で決定された至適濃度 (Av. sup = 256 倍希釈, LPS = 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で使用した。

ELISA は、以下に述べるようにして行った。ELISA用マイクロタイタープレート (96 wells, flat bottom, Nunc immunoplate I, Nunc, Roskilde, Denmark) に、抗マウス IgG (4 $\mu\text{g}/\text{well}$) または抗マウス IgM (3 $\mu\text{g}/\text{well}$) を吸着 (4°C, over night) させ、0.05% の Tween-20 と 0.02% NaN_3 を含む PBS (PBS-T) で3回洗浄の後、PBS-T で数段階に希釈した培養上清あるいは段階希釈標準サンプル (精製マウス IgG, Zymet Lab. Inc., South San Francisco, Calif. または IgM, Miles Scientific, Naperville, IL) を各 well に入れ室温2時間インキュベートし、PBS-T で3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG または IgM 抗体を室温で2時間反応させる、いわゆるサンドイッチ法を行った。PBS-T で4回洗浄後、酵素基質溶液 (1 mg/ml の濃度になるように 10% diethanolamine 緩衝液, pH 9.8 に融解した paranitrophenylphosphate-2 Na, 和光純薬工業、大阪) を加え、室温で30分間反応させ、3N NaOH にて反応を停止させた後、マイクロプレート光度計 (コロナ MTP-12 Auto, コロナ電気、勝田) を用いて各 well の 405 nm における吸光度を測定した。プレート毎に置いた標準サンプルの測定結果より、X軸に濃度を対数で、Y軸にその吸光度をそれぞれとり、最小自乗法によって標準直線を作成し、これから well 毎の培養上清中の各 Ig 濃度を算出した。なお、相関係数は、常に 0.998 以上であった。

培養及び ELISA は、すべて triplicate で行い、結果は平均値で表わした。標準誤差は常に 10% 未満であった。なお、ELISA に使用した抗体は、全て家兎由来のアフィニティー精製品で Fc 部に特異性を有するもの (全て Zymet Lab.) であり、各抗体の特異性を ELISA によって確認したところ、交叉反応性は見られなかった。

7. フローサイトメトリー (FCM)

フローサイトメーターは日本分光工業社製 FCS-1 X (日本分光工業、八王子) を用いた。レーザー光源は、4 W アルゴンイオンレーザー (NEC, 東京) を波長 488 nm, 500 mW に設定して用いた。

以下、2重蛍光の同時解析の場合 (Ia 抗原の解析、又は L3T4 抗原と DNA の同時解析) を中心に述べるが、Fluorescein Isothiocyanate (FITC) と Propidium Iodide (PI) の2種の蛍光色素は共に 488 nm で励起され、

それぞれ、530 nm と 630 nm 付近にピークを持つ蛍光を発するので、フィルターを選択する事によって、1本のレーザー光源により、同一細胞の2つの独立した信号を同時に解析する事が可能となる³²⁾。すなわち、575 nm の short-pass dichroic mirror で緑色及び赤色の蛍光を分離後、更に 530 nm の狭帯域フィルターで緑色の蛍光を、又は 600 nm の広帯域フィルターで赤色の蛍光を通過させ、それぞれの蛍光強度を測定した。この時僅かに、緑色蛍光が赤色側に漏洩する傾向がみられるので、同じサンプルを FITC のみで染色したものを測定して、これの赤色側への漏洩を数学的に補正した。赤色蛍光の緑色側への漏洩は全く認められなかった。単染色の場合(細胞内 IgG の解析)では、赤色側の検出器の回路を閉じ、補正を行わずに解析した。解析に際しては、1サンプルにつき少なくとも 5000 個以上の細胞を測定した。尚、混在する細胞残渣の影響を除くために前方散乱光は常時測定した。

8. 細胞内 IgG の染色と解析

Zeile³³⁾ の方法を改変して行った。すなわち、B細胞を、T細胞の存在下もしくは非存在化で PBA 物質で刺激し、培養 6 日目の細胞を、0.02% Triton X-100 を含む PBS (－) で処理した後、ビオチン化抗マウス IgG 抗体 (Fc-portion specific, Cappel), PBS (－) で洗浄後、FITC 結合アビジン (Vector Lab. Burlingame, Calif.) を順に室温 30 分間反応させて細胞内 IgG を染色した。洗浄の後、70% エタノールで固定を行い、直ちに FCM にて陽性細胞率を測定し、これと各 well の細胞数より、1 well 当りの細胞内 IgG 陽性細胞数を算出した。陽性率の決定の際には、FITC 結合アビジンのみと反応させたものを陰性対照とした。なお、この解析の為の培養には 24 wells のカルチャープレート (Corning) を用い、96 wells のプレートを使用した場合の 10 倍のスケールで行った。

9. L3T4 抗原と DNA の同時染色

Noronha ら³⁴⁾ の細胞表面抗原と DNA の同時染色法を改変して行った。L3T4 抗原の染色の為には、1 次抗体に抗 L3T4 moAb を、2 次抗体に、FITC 標識抗ラット IgG 抗体 (Tago Inc., Burlingame, Calif.) を用いた間接蛍光抗体法を行った。尚、2 次抗体は、マウスの脾細胞を全く染色しなかった。

細胞表面抗原を FITC で染色された細胞は、PBS (－) で洗浄後 70% エタノールで固定し、PI (200 μ g/ml, Sigma; 4°C, 20 分) で DNA を染色した。細胞を洗浄後、直ちに FCM による解析を行った。この際、死細胞の影響

を染色によって除くことが不可能である為、前方散乱光によって細胞残渣と共に、死細胞の影響を極力排除した。

10. B細胞表面 Ia 抗原の染色と解析

1 次抗体に抗 I-A^d moAb (clone 34-5-3 s, Litton Bionetics Inc., Charleston, SC) を、2 次抗体に FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Fc-portion specific, Cappel) を用いた間接蛍光抗体法を行って、B細胞表面の Ia 抗原を染色した。反応は全て、4°C で 30 分間行った。更に PI (20 μ g/ml) で死細胞を染色して (4°C, 5 分), FCM により生細胞のみの表面 Ia 抗原について解析を行った。また、細胞 1 個当りの Ia 抗原量は、陽性細胞の平均蛍光強度として、Channel 数で表した。2 次抗体のみで染色される表面 IgG 陽性 B細胞は全 B細胞の 3% 未満であり、これを陰性対照とした。

11. マイトジェン活性の測定

脾細胞を Sephadex G-10 カラムを通過させずに、直ちに panning 法を行い、得られた B細胞または T細胞 (1 $\times$ 10⁵個/well) を、PBA 物質 (Av. sup=1/256, LPS=10 μ g/ml) あるいは concanavalin A (Con A; μ g/ml) と共に日間マイクロカルチャープレート (96 wells, flat bottom, Corning) で培養し、培養終了 20 時間前に、トリチウムチミジン (³H-TdR, NEN) 0.5 μ Ci を各 well に加えた。培養終了後、オートマチックセルハーベスター (ラボマッシュ LM-101, ラボサイエンス, 東京) を用いて細胞をグラスフィルター上に採取し、これを乾燥後、DNA に取り込まれた ³H-TdR の放射活性を液体シンチレーションカウンター (LKB 1215, Rackbeta, Finland) にて測定した。

12. 細胞のマイトマイシン C (MMC) 処理

細胞の分裂増殖能を失わせるために、培養液に 5 $\times$ 10⁵ 個/ml に浮遊した細胞を、50 μ g/ml のマイトマイシン C (MMC, 協和マイトマイシン S, 協和発酵, 東京) で 37°C, 30 分間処理した。

13. 自己リンパ球混合培養反応 (自己 MLR)

精製された T細胞 (2 $\times$ 10⁵ 個/well) を、MMC で処理した B細胞 (2 $\times$ 10⁵ 個/well) と共にマイクロカルチャープレート (96 wells, round bottom) で 7 日間培養を行い、培養終了前の 20 時間の ³H-TdR の DNA への取り込みを、マイトジェン活性の測定と同様に測定し、T細胞の分裂を評価した。B細胞は、MMC 処理に先立って、PBA 物質の存在下にて 37°C で、もしくは PBA の非存在下にて 4°C または 37°C で、20 時間培養を行った。

図1 T細胞非依存性 PBA におけるT細胞の影響

B細胞 (5×10^4 個/well) と A) Av. sup (1/256) B) LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) で7日間刺激した場合の加えるT細胞数の変化に伴う、—▲—, IgG; —■—, IgM の産生量、及び—●—, IgG/IgM 比の変化。PBA 物質で刺激しない時は、—△—, IgG; —□—, IgM はいずれも検出できなかった。*B細胞単独に比べて有意に増加 ($P < 0.05$; Student's *t*-test)

結 果

1. T細胞非依存性 PBA 反応に対するT細胞の影響

既に Av. sup や LPS によるマウス B細胞の多クローン性活性化は、T細胞やマクロファージを必要としないことが明らかにされている^{18, 35, 36)}が、このT細胞非依存性 PBA における Igs 産生がT細胞の存在によって影響を受けるものかどうかを検討した。

可能な限り精製した B細胞 (5×10^4 個/well) を T細胞の存在下 ($2.5 \sim 20 \times 10^4$ 個/well)、もしくは非存在化で PBA 物質で刺激して培養7日間に培養上清中へ産生された IgG 及び IgM 量を ELISA で測定した。Av. sup (図1-A), LPS (図1-B) のいずれの PBA 物質で刺激した場合も、T細胞が存在する時、両クラスの Ig 産生が有意に増加した。しかし、IgG 産生の増強の程度は、IgM のそれよりも大きく、その為 IgG/IgM の比の値はT細胞非存在下の場合に比べて有意に増加した。すなわち、T細胞は、T細胞非依存性の PBA において IgG 産生を増強するような機能を有することが明らかになった。尚、T細胞が存在する時でも、PBA 物質による刺激を加えない場合は、いずれのクラスの Ig も殆ど検出されなかった(図1-A)。また、T細胞数の多い条件下で、

図2 T細胞による多クローン性 IgG 産生細胞の増加

B細胞 (5×10^5 個/well) を Av. sup (A, C) または LPS (B, D) で6日間刺激した場合の、T細胞の存在による細胞内 IgG 陽性細胞数(—●—)および同一培養上清に産生された IgG 量(—▲—)の変化。

図3 マウス脾臓T細胞、またはB細胞(各細胞画分はマクロファージを含む)を、各マイトジェンで刺激した時の DNA 合成。3日間の培養における培養終了前20時間の³H-TdRの取り込みで評価した。グラフの縦線は標準偏差を示す。

Igs (特に IgM) 産生の抑制傾向が見られた。

次に、観察された IgG 産生の増強が、IgG 産生細胞数の増加に基づくものか、それとも、IgG 産生細胞数の変化は無く、1個の細胞が産生する量のみが増加した事によるものかについて検討した。その結果、B細胞を、T細胞の存在下で PBA 物質で刺激すると、IgG 産生量の増加と同時に、細胞内 IgG 陽性細胞数が増加することが示された(図2)。

図4 多クローン性 IgG 産生を増強する T 細胞のサブポピュレーション

B細胞 (5×10⁴ 個/well) をA) Av. sup または B) LPS の刺激下で、—▲—, 全T細胞；—△—, helper/inducer T細胞；—▽—, suppressor/cytotoxic T細胞と共に7日間培養を行った。□, B細胞単独の場合。

2. PBA 物質の T 細胞に対する作用

図1に示したようなT細胞の、多クローン性 IgG 産生を増強する作用は、PBA 物質が、直接 T細胞を活性化した結果もたらされた可能性が考えられるので、この点について検討を行った (図3)。

脾細胞を、Sephadex G-10 カラムを通過させずに、直ちに panning を行って T細胞画分と B細胞画分に分離した。このようにして得た各細胞画分は、抗原提示細胞を含んでいる。従って、T細胞画分は Con A に強く反応して増殖した。しかしながら、このような T細胞は Av. sup 及び LPS に全く反応しなかった。すなわち、この2種の PBA 物質が T細胞を直接活性化することが出来ないことが示唆された。一方 B細胞は、2種の PBA 物質には強く反応したが、Con A には反応を示さなかった。つまり、この B細胞画分には T細胞の混入が無い事を機能的に証明すると同時に、Av. sup, あるいは LPS による PBA が T細胞非依存性であることが改めて確認された。

これらの結果より、PBA 物質が直接に T細胞を活性化するのではないが、T細胞非依存性の PBA の系に T細胞が存在することで IgG の産生が増強される事から、T細胞による PBA の調節機構が考えられる。

3. T細胞サブポピュレーション

次いで、多クローン性 IgG 産生を増強するような T細胞が、どのようなサブポピュレーションに属するの

を検索した。

精製 T細胞を、材料と方法に示したように、helper/inducer T細胞と suppressor/cytotoxic T細胞に分画して、PBA 反応系に添加した。その結果 (図4), helper/inducer T細胞は未分画の T細胞と同様に IgG 産生を増強する事ができたが、suppressor/cytotoxic T細胞のみを加えた場合は、IgG 産生を増強することも抑制することもなかった。すなわち、多クローン性 IgG 産生増強能を有する T細胞は helper/inducer サブポピュレーションに属することが明らかになった。尚、この場合でも、helper/inducer T細胞が多数存在すると、未分画 T細胞と同様に IgG 産生の抑制傾向が認められた。

4. DNA 量と表面 L3T4 抗原の同時解析法を用いた、PBA 反応系における T細胞の活性化の検討

次に、この helper/inducer T細胞が、Av. sup や LPS 刺激による PBA 反応の際に実際に活性化されているかどうかを、FCM を用いて、細胞表面 L3T4 抗原と DNA 量を同時に解析することにより検討した。解析結果は、2次元等高線表示 (図5) 及び、L3T4 抗原陽性細胞に gate window を設定した1次元 DNA ヒストグラム (図6) で表した。尚、L3T4 抗原陽性細胞の活性化の陰性対照として、培養前の Sephadex G-10 カラムを通過させたリンパ球画分 (図5-A, 図6-A) を、陽性対照として Con A (2 µg/ml) で3日間刺激した全脾細胞 (図5-B, 図6-A) を解析した。

リンパ球画分を PBA 物質で刺激した場合には、L3T4 抗原陽性細胞の活性化が強く認められるが、これは、B細胞の活性化によるものと考えられる。しかし同時に、L3T4 抗原陽性細胞も少なからず活性化されている様子が観察された (図5-D, E)。そして PBA 物質を加えない時 (図5-C), および、T細胞のみの場合は PBA 物質による刺激を加えても (図5-G, H), L3T4 抗原陽性 T細胞の活性化はほとんど観察できなかった。

このような結果は、L3T4 抗原陽性細胞の1次元ヒストグラムでも確認された。例えば、リンパ球画分を PBA 物質で刺激した場合は無刺激に比べて、L3T4 抗原陽性の T細胞が活性化されており (図6-B), 一方、T細胞のみを PBA 物質と共に培養しても、L3T4 抗原陽性細胞は活性化されず、T細胞と B細胞を共に含む細胞集団を PBA 物質で刺激した場合にのみ、L3T4 抗原陽性 T細胞の活性化が観察された (図6-C, D)。

すなわち、T細胞非依存性の PBA の系においても、L3T4 抗原陽性の T細胞が活性化されている事が明らかになった。

図5 フローサイトメトリーによる L3T4 抗原と DNA 量の同時解析 (2次元等高線表示)

培養前リンパ球画分 (A), 全脾細胞を Con A で3日間刺激後 (B), リンパ球画分 (C, D, E) または T 細胞画分 (F, G, H) を Av. sup (D, G) または LPS (E, H) の刺激下, あるいは無刺激下 (C, F) で6日間培養後。

そこで次に, この様な T 細胞の活性化機構について, 検討を行った。

5. 抗 L3T4 moAb による T 細胞機能の阻害

抗 L3T4 moAb を培養液中に添加 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) することによって, T 細胞による IgG 産生の増強が, ほぼ完全に阻止された (図7)。

この結果は, T 細胞が PBA の系における IgG 産生を増強する為には, なんらかの抗原を認識して活性化される必要があることを示唆している。そしてこのような抗原は, B 細胞表面上に表現されている自己 Ia 抗原である事が考えられる。しかも, PBA 物質によって活性化された B 細胞では表面 Ia 抗原の量が増加し, この結果, 自己の Ia 抗原に応答するような T 細胞 (自己反応性 T 細胞) が強く活性化されて, PBA 反応における IgG 産生を増強することが推測される。そこでこれらの可能性を検討する為に, 以下の実験を行った。

6. PBA 物質の刺激による B 細胞表面 Ia 抗原量の増加

精製 B 細胞を, PBA 物質の刺激下で培養 (20 時間, 37°C) を行うことによって, 表面 Ia 抗原量は, 無刺激で

図6 L3T4 抗原陽性細胞の1次元 DNA ヒストグラム

A) 陰性対照 (—) 及び陽性対照 (---)
B) リンパ球画分, 培養6日後
C) Av. sup または D) LPS の刺激下における各細胞画分培養6日後の DNA 量 (横軸) と相対的細胞数 (縦軸)

同様に培養したもの, 或は, 4°C に保持したもののいずれに対しても有意に増加した (表1)。陰性対照として, 2種類置いた理由は, FCS のみによって B 細胞が活性化される可能性が報告されている³⁷⁾からであるが, 本実験に使用した lot の FCS は, そのみで Ia 抗原量を増加させる事はなかった。

また, B 細胞中の Ia 抗原陽性細胞率も PBA 刺激によって増加した。すなわち, PBA 物質で B 細胞を刺激することによって培養中に存在する Ia 抗原の総量が増加する事が示唆された。

7. 活性化 B 細胞による自己 MLR の増強

PBA 物質によって活性化された B 細胞の Ia 抗原量が增加することから, 活性化 B 細胞は自己反応性 T 細胞をより強く刺激する可能性が考えられる。

そこで, 6. の実験と同様, B 細胞を PBA 物質の刺激下, もしくは無刺激下で培養 (37°C, 20 時間) を行った後, これらを MMC で処理して自己 MLR の刺激細胞として用いたところ, PBA 物質で活性化された B 細胞は, より強く T 細胞の増殖を誘導する事が明らかになった (表2)。

図 7 抗 L3T4 moAb による T 細胞の IgG 産生増強能の阻止

B 細胞 (5×10^4 個/well) を T 細胞と共に A) Av. sup または B) LPS で刺激し、この時培養液中に最終濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ になる様に抗 L3T4 moAb を添加した場合 (—△—) と、添加しなかった場合 (—▲—) の IgG 産生を比較した。

8. T 細胞の MMC 処理

T 細胞が、PBA 反応において IgG 産生を増強するために、自ら分裂増殖を行うことが必要かどうかについて検討した。

すなわち、精製 T 細胞を MMC で処理した後、PBA 反応系へ添加した場合でも、IgG 産生を有意に増強した (図 8)。しかしながら、MMC 処理 T 細胞が、MMC で処理しない T 細胞と同程度の増強作用を示すためには、より多数の細胞が必要であった。

考 察

重度の歯周炎 (Advanced periodontitis) は、多数の B 細胞系の細胞浸潤を示す疾患であり、しかも、歯周病局所におけるこれらの B 細胞や形質細胞が保有する免疫グロブリン (Igs) のクラス (アイソタイプ) は、大部分が IgG であり、IgM は極僅かである事が、免疫組織学的な解析により明らかになっている¹⁻⁴⁾。そして、このような病理組織像をもたらす原因の一つに、歯垢中の細菌に由来する PBA 物質の関与が考えられている¹¹⁻¹⁸⁾。しかも歯垢中の細菌に由来する因子は、マウスの脾臓の B 細胞に対して PBA を誘導するが、それは常に IgM 産

図 8 MMC 処理が T 細胞の多クローン性 IgG 産生増強能に及ぼす影響

B 細胞 (5×10^4 個/well) を MMC 処理された T 細胞と共に A) Av. sup または B) LPS で 7 日間刺激した。△は未処理 T 細胞による最も高い IgG 産生増強効果を示す。

* B 細胞単独に比べて有意に増加 ($P < 0.05$; Student's *t*-test)

生が優位であり、歯周病の病理像の形成機序を十分に説明し得るものではなかった。

これに対し原田は¹⁸⁾、DNP-KLH で感作されたマウスの脾臓 B 細胞を、表面 IgG 陽性 (sIgG⁺) 細胞と、陰性細胞に分画し、これらを PBA 物質である Av. sup で刺激すると、sIgG⁺ 細胞からのみ IgG の産生が認められ、sIgG⁻ 細胞からは、殆ど IgG が産生されない結果を得た。すなわち、Av. sup は、B 細胞のクラススイッチを誘導する事は出来ないものの、1 次感作によって既にクラススイッチを終えた B 細胞 (記憶 B 細胞と考えられる) に作用して、IgG 産生を誘導することから、ヒトの歯周病巣における IgG 産生も、このような記憶 B 細胞が局所へ浸潤し、続いて歯垢中の細菌に由来する PBA 物質によって増殖分化が誘導される事によるものと推測した。

確かに、マウスの脾臓 B 細胞中には、sIgG⁺ 細胞が、殆ど存在しない (材料と方法参照) のに対して、ヒトの末梢血 B 細胞中には sIgG⁺ 細胞や sIgA⁺ 細胞が相当の割合で存在し³⁸⁾、記憶 B 細胞が数多く存在しているものと推測される。しかしながら、これらのヒト末梢血細胞を *in vitro* で PBA 物質によって刺激した場合は、やはり、IgG にほぼ匹敵する大量の IgM が産生される^{14,15,17)}。従って、歯周病巣における IgG 産生が、末梢血由来細胞の PBA 物質による非特異的活性化という仮説に立て

表 1 B 細胞表面 Ia 抗原量の PBA による変化

	無 刺 激		Av. sup	LPS
	4 °C	37 °C	(1/256) 37 °C	(10 µg/ml) 37 °C
Ia 抗原陽性細胞率 (%)	72.1±1.3 ^a	70.1±1.6	78.9±1.5*	76.2±1.2*
平均蛍光強度 (Channel)	113.9±0.92	114.5±0.68	124.6±1.4*	132.5±1.6*

^a Mean±SE*無刺激 (4 °C, 37 °C の両方) に対し、有意に増加 ($P<0.001$; Student's *t*-test)

表 2 自己 MLR に対する PBA の作用

	B 細胞の前処理 ^a			T 細胞 単 独
	無刺激	Av. sup (1/256)	LPS (10 µg/ml)	
自己 MLR ^b	8,420±652 ^c	14,200±1,180*	14,800±699*	329±171
B 細胞単独	188±18	915±105	447±49	—

^a B 細胞は、PBA 物質の存在下、または非存在下で 20 時間の培養を行った後、MMC 処理を行った。^b T 細胞 (2×10^5 個) を MMC 処理 B 細胞 (2×10^5 個) と共に 7 日間培養を行い、培養終了前 20 時間の ³H-TdR の DNA への取り込みを測定した。^c Mean cpm/well±SE*無刺激 B 細胞を刺激細胞とした場合に対し有意に増加 ($P<0.01$; Student's *t*-test)

ば、病巣局所における IgG 産生の増強機構の存在を他にも考える必要があろう。

一方、木田、Okada ら^{3,4,19)}は、歯周病巣においても、T 細胞が少なからず存在し、しかも、それらが活性化されている事を示唆する結果を見出ししている¹⁹⁾。また一方、マウスを用いた基礎免疫学的研究では、B 細胞のクラススイッチには、T 細胞の関与が必要であるといった報告²⁶⁻²⁹⁾がある。これらの成績から、歯周病巣に存在する T 細胞がなんらかの形で IgG 産生を調節している可能性が考えられる。

この可能性について検討する為、最も直接的なアプローチは、歯周病巣からリンパ球を抽出し、T 細胞を分離してこの機能を分析する方法であるが、歯周病巣から抽出できる T 細胞は、非常に少数であり³⁹⁾、しかもこれを分離し、*in vitro* で機能を解析する事は、大変困難である。加えて、一度得られたサンプルを再度入手することができないため、多角的な検討を不可能にしている。

一方 Carpenter ら¹⁷⁾は、ヒトの末梢血リンパ球を用いて、歯周病関連細菌の示す PBA 活性について報告しているが、彼らの結果は、T 細胞が Ig-アイソタイプの表現を調節する可能性に対しては何の知見を与えるもの

でもない。しかも彼らが主張しているように、ヒトリンパ球における PBA の発現には helper T 細胞が必須であるならば、同じ表面マーカーを持つ事が予想される Ig-アイソタイプを調節する T 細胞の PBA における機能について、ヒトリンパ球を用いて解析する事は極めて困難である。そこで先ず、実験における諸条件を簡略化する事が可能な、マウスの *in vitro* での T 細胞非依存性 PBA の系を用いて、PBA において IgG 産生を増強するような T 細胞が存在するかどうかについて検討した。

本研究に用いた PBA 物質は、一つは、グラム陰性菌である *E. coli* の LPS で、他の一つは歯周病関連細菌である *A. viscosus* T 14V 株の超音波破碎上液 (Av. sup) であり、これは LPS を含まないと考えられる。従って、この 2 つの PBA 物質による B 細胞の活性化機構は、異なったものである可能性があるが、いずれの PBA 物質も、T 細胞やマクロファージの関与を必要とせず B 細胞を活性化する点は共通しており、系の簡略化に好都合であった。

本研究の結果、T 細胞非依存性の PBA においても L3T4 抗原陽性の helper/inducer サブポピュレーションに属する T 細胞が、IgG 産生を増強する事が示され、更に、このような機能を持つ T 細胞は自己 Ia 抗原を認

識する事によって活性化される、自己反応性T細胞である可能性が強く示唆された。すなわち、L3T4 抗原は、マウスの helper/inducer T 細胞の抗原認識レセプター上に存在する事が示されているが³¹⁾、この抗原認識レセプターを抗 L3T4 moAb で被覆する事によって、多クローン性 IgG 産生を増強する能力も阻止されるという結果(図 7)は、T 細胞が、IgG 産生を増強するように活性化される為には、何らかの抗原を認識することが必要である事を示すと同時に、T 細胞が単に filler cell (もしくは feeder cell) として機能した事によるものではない事、また、PBA 物質が T 細胞に直接作用して、これを活性化した事によるものでもない事を強く示唆している。この実験に使用した、抗 L3T4 moAb の 0.5 $\mu\text{g/ml}$ という濃度は、自己 MLR を完全に阻害するのに十分である事から決定されたものである。

更に、PBA による B 細胞表面 Ia 抗原量の増加(表 1)、活性化 B 細胞による自己 MLR の増強(表 2)、或は、T 細胞と B 細胞が共存する場合にのみ観察された PBA 反応系での T 細胞の活性化(図 5, 6)といった結果は全て、PBA 反応系において、自己反応性 T 細胞が活性化され、この活性化自己反応性 T 細胞によって IgG 産生の増強がもたらされるという仮説を強く支持するものである。なお、非活性化 B 細胞を用いた場合でも、自己 MLR の誘導が可能であったのに対し、FCM による L3T4 抗原と DNA 量の同時解析においては、PBA 物質の非存在下では、L3T4 抗原陽性細胞の活性化が観察できなかった事については、後者の実験感度が前者に比べて低いことによるものと考えている。

自己と非自己の識別がどのような機構によって行われているかという問題は、免疫学上、最大の問題の一つである。ごく近年に至るまで、正常な個体では、自己抗原に対する無応答性が確立されているものと考えられてきた。すなわち、自己抗原に対する免疫反応は、自己免疫病という表現が示すように、生体の病的状態であると認識されてきた。しかしながら、Katz ら⁴⁰⁾が、免疫応答に主要組織適合系(MHC)による遺伝的拘束が存在する事を示して以来、ここ十数年の免疫学上の発見は、免疫系は自己の認識を基本として非自己を識別するという、概念上の大きな変化をもたらした。すなわち抗体産生系においては、T-B 間、T-マクロファージ間の Ia 抗原の一致が必要であり、自己の Ia 抗原に対する T 細胞の認識によって免疫応答が制御されているといった概念である。さらに、外来性抗原の関与なく、自己 Ia 抗原のみの刺激によって T 細胞が活性化されるという、自己

MLR の存在⁴¹⁾が、広く認められるに至って、自己反応性 T 細胞の免疫系における役割が各方面から注目を集めている。

本研究において、IgG 産生を増強する T 細胞は、helper/inducer サブポピュレーションに属していた。一方、自己 MLR によって活性化される T 細胞の表面マーカー、或は機能については、数多くの報告があり⁴²⁻⁴⁶⁾、一定の結論は得られていないが、マウスではやはり、L3T4 或は Ly-1 抗原陽性、ヒトでは Leu 3 或は T4 抗原陽性の helper/inducer サブポピュレーションに属する T 細胞が、自己の Ia 抗原によって活性化される事によって反応が開始するというのは一致した見解である。更に、近年の培養技術の目ざましい進歩により正常 T 細胞のクローン化が可能になったことで、自己反応性 T 細胞の機能についてもクローンレベルでの解析が進んでいる^{37, 47-52)}。そして、これまでの報告の限りでは、自己反応性 T 細胞クローンは、おおむね全て helper/inducer マーカーを有している。

更に興味深いことには、これらのクローンがある IgA イソタイプの産生を特異的に誘導、或は増強する、いわゆる isotype-specific T cell としての機能を有するとの報告が多く見られる^{47, 48, 50)}。Clayberger ら⁴⁸⁾は、B 細胞を外来抗原と、この抗原に特異的な helper T 細胞が産生した抗原特異的因子で活性化した場合には、IgM 産生のみが誘導されたが、ここに、自己反応性 T 細胞クローン由来の因子を添加すると、IgG 産生が誘導された事を報告している。Finnegan ら⁴⁷⁾は、また違った系を用いて、自己反応性 T 細胞が、IgG クラスの特異抗体産生を誘導する事を報告している。Leung ら⁵⁰⁾のヒトの自己反応性 T 細胞クローンは、IgE 産生を誘導した。これらの報告は、かつて多クローンの T 細胞を用いて得られた成績からその存在が示された、isotype-specific T cell²⁶⁾が自己反応性 T 細胞である可能性を示唆している。

本研究においては、PBA のみで B 細胞を十分活性化出来る所に、更に T 細胞を加えてその影響を見た訳であるが、これは、Clayberger ら⁴⁸⁾の実験系が、B 細胞を抗原と抗原特異的 helper 因子で十分活性化出来る上に、更に自己反応性 T 細胞の関与を見た点において極めて類似している。また、彼らのクローンは、抗体産生に対する増強作用も抑制作用も同時に有し、その抑制作用は、自己反応性 T 細胞が多い場合に観察された。そして、この抑制作用の本体は、このクローンが自己の Ia 陽性細胞を特異的に融解する事によるものであった³⁷⁾。自己 MLR は、活性化される細胞の性状や機能、産生される

液性因子等の点で極めて複雑な現象と考えられているが、それには、例えば Cyayberger らのクローンで示されたように、一個の自己反応性T細胞が多くの機能を持つ事が関与しているのかもしれない。

本研究においても、T細胞を多く加えた場合には、至適条件の時に比較して IgG 産生が抑制される傾向を示し(図 1)、更に、抗 Lyt-2.2 moAb と補体処理によって suppressor/cytotoxic T 細胞を除いた後も、この傾向は変わらなかった事から(図 4)、この抑制傾向は、一般の suppressor T 細胞が関与しない、helper/inducer T 細胞の作用によるものと考えられる。

また、T細胞を MMC で処理することで、抑制傾向が見られなくなった(図 8)が、このような事は、多くの抑制現象に一般に観察されるものではあるが、これもやはり、Clayberger らの報告において³⁷⁾、自己反応性 T 細胞クローンの自己 Ia 抗原陽性細胞を融解する能力が、放射線照射を受けることによって減弱し、抗体産生を増強する作用は残ったという結果と一致している。また、本研究において、MMC 処理 T 細胞では、未処理 T 細胞と同程度の IgG 産生増強作用を示す為には、より多数が必要であった事(図 8)を併せて考察すると、自己反応性 T 細胞が IgG 産生を増強するには、B細胞に対してある程度の数が必要であり、これが、Ia 抗原で活性化された後に増殖出来るような条件下では、たとえ培養開始時に存在する数が少なくても、培養期間中に増殖することで十分な IgG 産生の増強作用が見られるが、培養開始時により多数が存在する時には抑制作用の方が比較的強く現れるのではないかと推測される。尚、この抑制傾向が、細胞数の増加に伴う培養条件の悪化によるものという可能性は、Av. sup 刺激後の 1 well 当りの細胞数は、LPS 刺激のそれに比べて圧倒的に少ない(図 2)にもかかわらず、抑制傾向は同様に観察出来た事から否定できよう。なお、本研究は、IgG 産生の増強作用を解析する目的で進められたが、IgG/IgM 比は Ig 産生が抑制される部分でもなお増加傾向にあり(図 1)、今後、この抑制作用についても、解析する必要があると考える。

自己反応性T細胞の生体内における意義については、いまだ不明な点が多く、仮説の域を出ないが、大まかには、2つの対立する仮説が存在する。第1には、抗自己反応は、正常な生体内に常に存在し、自己反応性T細胞は自己の Ia 抗原に常に刺激されているとする説⁵³⁾である。この説によると、活性化自己反応性T細胞が、suppressor 細胞群を誘導する事で、1つの免疫ネットワークを形成し、免疫系を制御しているという。第2には、自

己 MLR は、正常な生体内では起こっていないとする説^{54,55)}である。すなわち、生体内に正常なレベルで存在する Ia 抗原量では、自己 MLR の刺激になり得ず、自己 MLR は存在しないか、もしくは存在しても低レベルで維持されているが、Ia 抗原陽性細胞の異常な増殖や、Ia 抗原量の増加によって自己反応性T細胞が活性化され、その結果、病的状態に陥るというものである。前者は、自己 MLR による suppressor-inducer 細胞の誘導^{44~46)}や、活動期の自己免疫疾患における自己 MLR の低下と言った事実^{56~60)}などから支持され、後者は皮下移入された自己反応性T細胞クローンが、炎症を惹起し得る事実⁵¹⁾、或は、自己反応性T細胞の活性化が、Ia 抗原量の多い細胞、或は活性化細胞により効果的に誘導される事実^{37,54,55)}などから支持される。

本研究においても、PBA による活性化 B 細胞は、自己T細胞に対して強い刺激能を有する事が示された。すなわち、B細胞の非特異的活性化、増殖によって自己反応性T細胞の異常増殖が誘導される可能性が考えられる。ここで、活性化B細胞による、自己反応性T細胞の増殖の増強は、Ia 抗原量の増加によるものと考えられるが、IL-1 等の Cytokine の関与もあるのかもしれない。すなわち、Ia 抗原の増加そのものが、T細胞の増殖を高めるのではなく、正常量の Ia 抗原による T細胞の活性化を、PBA 物質で刺激されることで B細胞が産生するようになった IL-1 が増強するという可能性である。事実、正常B細胞がマイトジェン等で活性化されると IL-1 を産生するという報告⁶¹⁾があるので、B細胞が Av. sup で刺激される事で、IL-1 を産生するものかどうか、現在検討中である。

次に、活性化B細胞により活性化を受けた自己反応性T細胞が、どのような機序で PBA を修飾するものかも、大きな研究課題である。現在著者は、PBA 反応系からの長期培養自己反応性T細胞株の樹立に成功し、クローニングには至っていないものの、この培養上清が IgG 産生を増強する活性を有する事を確認している事から、1つには、活性化自己反応性T細胞は、なんらかの液性因子を放出し、この因子が PBA を修飾するものと考えている。Isackson ら²⁸⁾は、LPS によって刺激された B細胞の IgG₁ 産生を誘導する因子を T細胞ハイブリドーマの培養上清中に見い出し、これを B cell differentiation factor- γ (BCDF- γ) と名付けたが、自己反応性T細胞の産生する因子が BCDF- γ のように IgM 産生を運命付けられた B細胞の IgG 産生細胞へのクラススイッチを誘導するものか、もしくは IgG 産生を運命付けられ

たB細胞の増殖を選択的に増強するものかについては、とりわけ興味深い問題の1つである。今後クローニングを行い、このような活性の本体を、そのクローンの詳しい抗原特異性と共に検討していくつもりである。

最後に、歯周病の病巣局所における自己反応性T細胞の存在意義について考察する。本論文の各所で述べたように、ヒト歯周炎病巣は、多数のB細胞系の細胞が浸潤、増生している病変である。これらのB細胞が活性化されている事は、多数の形質細胞が存在する事実からも十分に推定出来るが、Seymour ら³⁹⁾はB細胞活性化マーカーに対する moAb を用いてこれを証明している。従って、これらのB細胞は、自己反応性T細胞の強力な刺激となり得るものと考えられる。また、マクロファージ等も同様に、刺激源となり得る。更に線維芽細胞もT細胞由来の γ -インターフェロン (IFN γ) によって刺激されることで、Ia 抗原を表現するようになるという報告⁶²⁾もあり、これらの事実から、歯周病巣局所に存在する Ia 抗原の総量は非常に大きい事が推測される。すなわち、PBA によるB細胞の活性化、活性化B細胞による自己反応性T細胞の活性化が引き起こされ、続いて自己反応性T細胞によるPBAの修飾、すなわちIgG産生の増強が考えられる。また、自己反応性T細胞そのものからか、もしくは、これが他のT細胞を活性化することによって産生されるB細胞活性化因子による新たなB細胞の活性化や、IFN γ による線維芽細胞のIa抗原の発現が考えられ、この様にして一層増加したIa抗原が、自己反応性T細胞を更に活性化するような、悪循環の免疫ネットワークが形成されるといった機構が、慢性炎症の成立に関与している可能性が推測される。

結 論

1. T細胞非依存性の多クローン性B細胞活性化(PBA)を、T細胞が修飾し、とりわけIgG産生を増強した。

2. 多クローン性IgG産生を増強するT細胞は、L3T4抗原陽性で helper/inducer サブポピュレーションに属し、これらは、PBA反応において活性化される事が明らかとなった。しかし、PBA物質によるT細胞の直接の活性化は認められなかった。

3. 多クローン性IgG産生を増強するT細胞は、自己のIa抗原に応答性を有する、いわゆる自己反応性T細胞である事が示唆された。

4. PBA物質で活性化されたB細胞は、自己反応性

T細胞をより強く活性化出来ることが示唆された。

5. 以上の成績から、T細胞非依存性PBA反応におけるT細胞の関与は、PBAにより非特異的に活性化されたB細胞による自己反応性T細胞の活性化、この活性化自己反応性T細胞によるPBAの修飾、IgG産生の増強という機構が推測される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学歯学部口腔治療学講座、岡田 宏教授に心から感謝いたします。また、実験の実施にあたり直接御指導を頂きました口腔治療学講座、原田 泰博士に深く感謝いたします。

さらに、著者に免疫学研究の基礎を御教授下さいました大阪大学医療技術短期大学部、渡辺信一郎教授、また、試薬の調達などに際しまして多大な御助力を賜りました大阪大学医学部附属癌研究施設、浜岡利之教授、並びに教員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究に対して種々御協力下さいました口腔治療学講座教室員の皆様に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Macker, B.F., Frostad, K.B., Robertson, P.B., and Levy, B.M. : Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, 12 : 37-45, 1977.
- 2) Seymour, G.J. and Greenspan, J.S. : The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, 14 : 39-46, 1979.
- 3) 木田友信 : 歯周炎患者における免疫担当細胞の検索—Tリンパ球, Bリンパ球, Fcレセプター保有細胞について—. *日歯周誌*, 24 : 84-105, 1982.
- 4) Okada, H., Kida, T. and Yamagami, H. : Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect. Immun.*, 41 : 365-374, 1983.
- 5) Berglund, S.E. : Immunoglobulins in human gingiva with specificity for oral bacteria. *J. Periodontol.*, 42 : 546-551, 1971.
- 6) 竹内 宏, 筒井正弘 : 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究(第1報)—螢光抗原法(直接法)による細菌特異抗体の歯肉組織中での局在について—. *歯基礎誌*, 15 : 347-354, 1973.
- 7) Genco, R.J., Mashimo, P.A., Krygier, G. and

- Ellison, S.A. : Antibody-mediated effects on the periodontim. J. Periodontol., 45 : 330-337, 1974.
- 8) Kagan, J.M. : Local immunity to *Bacteroides gingivalis* in periodontal disease. J. Dent. Res., 59 (DI) : 1750-1756, 1980.
 - 9) Toto, P.D., Lin, L. and Gargiulo, A.W. : Immunoglobulins and complement in human periodontitis. J. Periodontol., 49 : 631-634, 1978.
 - 10) Clagett, J.A. and Page, R.C. : Insoluble immune complexes and chronic periodontal diseases in man and the dog. Arch. Oral Biol., 23 : 153-165, 1978.
 - 11) Clagett, J.A., Engel, D. and Chi, E. : *In vitro* expression of immunoglobulin M and G subclasses by murine B lymphocytes in response to a polyclonal activator from *Actinomyces*. Infect. Immun., 29 : 234-243, 1980.
 - 12) Bick, P.H., Carpenter, A.B., Holdeman, L.V., Miller, G.A., Ranney, R.R., Palcanis, K.G. and Tew, J.G. : Polyclonal B-cell activation induced by extracts of gram-negative bacteria isolated from periodontally diseased sites. Infect. Immun., 34 : 43-49, 1981.
 - 13) Donaldson, S.L., Bick, P.H., Moore, W.E.C., Ranney, R.R., Burmeister, J.A. and Tew, J.G. : Polyclonal B-cell activating capacities of gram-positive bacteria frequently isolated from periodontally diseased sites. J. Periodont. Res., 17 : 569-575, 1982.
 - 14) Mangan, D.F. and Lopatin, D.E. : *in vitro* stimulation of immunoglobulin production from human peripheral blood lymphocytes by a soluble preparation of *Actinomyces viscosus*. Infect. Immun., 31 : 236-244, 1981.
 - 15) Mangan, D.F. and Lopatin, D.E. : Polyclonal activation of human peripheral blood B lymphocytes by *Fusobacterium nucleatum*. Infect. Immun., 40 : 1104-1111, 1983.
 - 16) Kimura, S., Hamada, S., Torii, M., Morisaki, I., Koopman, W.J., Okada, H., Michalek, S.M. and McGee, J.R. : Lymphoid cell responses to bacterial cell wall components: murine B-cell responses to a purified cell wall moiety of *Actinomyces*. Scand. J. Immunol., 17 : 313-322, 1983.
 - 17) Carpenter, A.B., Sully, E.C., Ranney, R.R. and Bick, P.H. : T cell regulation of polyclonal B-cell activation induced by extracts of oral bacteria associated with periodontal diseases. Infect. Immun., 43 : 326-336, 1984.
 - 18) 原田 泰 : *Actinomyces viscosus* T 14V 株の超音波処理上液が示す多クローン性B細胞活性化作用の発現機構. 日歯周誌, 27 : 82-98, 1985.
 - 19) Okada, H., Kassai, Y., Kida, T. : T lymphocyte subsets in the inflamed gingiva of human adult periodontitis. J. Periodont. Res., 19 : 595-598, 1984.
 - 20) Taubman, M.A., Stoufi, E.D., Ebersole, J.L. and Smith, D.J. : Phenotypic studies of cells from periodontal disease tissues. J. Periodont. Res., 19 : 587-590, 1984.
 - 21) Johannessen, A.C., Nilsen, R., Knudsen, G.E. and Kristoffersen, T. : *In situ* characterization of mononuclear cells in human chronic marginal periodontitis using monoclonal antibodies. J. Periodont. Res., 21 : 113-127, 1986.
 - 22) Goodman, M.G. and Weigle, W.O. : Tcell regulation of polyclonal B cell responsiveness, I. Helper effects of T cells. J. Immunol., 122 : 2548-2553, 1979.
 - 23) Goodman, M.G. and Weigle, W.O. : The role of regulatory components from resident T lymphocytes in polyclonal B cell activation. J. Cell. Biochem., 18 : 395-405, 1982.
 - 24) Endres, R.O., Kushnir, E., Kappler, J.W., Marrack, P. and Kinsky, S.C. : A requirement for nonspecific T cell factors in antibody responses to "T cell independent" antigens. J. Immunol., 130 : 781-784, 1983.
 - 25) Tanay, A. and Strober, S. : T cell regulation of the thymus-independent antibody response to trinitrophenylated-*Brucella abortus* (TNP-BA). J. Immunol., 134 : 3669-3674, 1985.
 - 26) Rosenberg, Y.J. : Isotype-specific T cell regulation of Immunoglobulin expression. Immunological Rev., 67 : 33-58, 1982.
 - 27) Martinez-Alonso, C. and Coutinho, A. : Im-

- munoglobulin C-gene expression. III. Possible induction of specific genetic events in activated B lymphocytes by the polyclonal stimuli driving clonal expansion. *Eur. J. Immunol.*, 12 : 502-506, 1982.
- 28) Isackson, P.C., Pure, E., Vitetta, E.S. and Krammer, P.H. : T cell-derived B cell differentiation factor (s), Effect on the isotype switch of murine B cells. *J. Exp. Med.*, 155 : 734-748, 1982.
 - 29) Coutinho, A., Pettersson, S., Ruuth, E. and Forni, L. : Immunoglobulin C gene expression. IV. Alternative control of IgG₁-producing cells by helper cell-derived B cell-specific growth or maturation factors. *Eur. J. Immunol.*, 13 : 269-272, 1983.
 - 30) Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75 : 2844-2848, 1978.
 - 31) Dialynas, D.P., Wilde, D.B., Marrack, P., Pierres, A., Wall, K.A., Havran, W., Otten, G., Loken, M.R., Pierres, M., Kappler, J. and Fitch, F.W. : Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5 : Expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. *Immunological Rev.*, 74 : 29-56, 1983.
 - 32) Kruth, H.S., Braylan, R.C., Benson, N.A. and Nourse, V.A. : Simultaneous analysis of DNA and cell surface immunoglobulin in human B cell lymphomas by flow cytometry. *Cancer Res.*, 41 : 4895-4899, 1981.
 - 33) Zeile, G. : Intracytoplasmic Immunofluorescence in multiple myeloma. *Cytometry*, 1 : 37-41, 1980.
 - 34) Noronha, A., and Richman D.P. : Simultaneous cell surface phenotype and cell cycle analysis of lymphocytes by flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, 32 : 821-826, 1984.
 - 35) Mosier, D.E., Scher, I. and Paul, W.E. : *In vitro* responses of CBA/N mice : spleen cells of mice with an X-linked defect that precludes immune responses to several thymus-independent antigens can respond to TNP-lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 117 : 1363-1369, 1976.
 - 36) Scher, I. : CBA/N immune defective mice ; evidence for the failure of a B cell subpopulation to be expressed. *Immunological Rev.*, 64 : 117-136, 1982.
 - 37) Clayberger, C., DeKruyff, R.H. and Cantor, H. : Immunoregulatory activities of autoreactive T cells: An I-A-specific T cell clone mediates both help and suppression of antibody responses. *J. Immunol.*, 132 : 2237-2243, 1984.
 - 38) 原田弘智, 笠原 忠, 伊藤喜久, 榎本博光, 中野康平, 河合 忠 : ヒトBリンパ球のロゼット法による検出法. *臨床病理*, 28 : 1232-1234, 1980.
 - 39) Seymour, G.J., Cole, K.L. and Powell, R.N. : Analysis of lymphocyte populations extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. *J. Periodont. Res.*, 20 : 47-57, 1985.
 - 40) Katz, D.H., Hamaoka, T. and Benacerraf, B. : Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 137 : 1405-1418, 1973.
 - 41) Weksler, M.E., Moody, C.E., and Kozak, R. W. : The autologous mixed-lymphocyte reaction. *Adv. Immunol.*, 31 : 271-312, 1981.
 - 42) Hausman, P.B. and Stobo, J.D. : Specificity and function of a human autologous reactive T cell. *J. Exp. Med.*, 149 : 1537-1542, 1979.
 - 43) Chiorazzi, N., Fu, S.M. and Kunkel, H.G. : Induction of polyclonal antibody synthesis by human allogeneic and autologous helper factors. *J. Exp. Med.*, 149 : 1543-1548, 1979.
 - 44) Sakane, T. and Green I. : Specificity and suppressor function of human T cells responsive to autologous non-T cells. *J. Immunol.*, 123 : 584-589, 1979.
 - 45) Smith, J.B. and Knowlton, R.P. : Activation of suppressor T cells in human autologous mixed lymphocyte culture. *J. Immunol.*, 123 : 419-422, 1979.
 - 46) Yamashita, U., Ono, S. and Nakamura, H. : The syngeneic mixed leukocyte reaction in mice. II, The I region control of suppressor

- T cell activity induced in the syngeneic mixed leukocyte reaction. *J. Immunol.*, 128 : 1010-1017, 1982.
- 47) Finnegan, A., Needleman, B. and Hodes, R.J. : Activation of B cells by autoreactive T cells: cloned autoreactive T cells activate B cells by two distinct pathways. *J. Immunol.*, 133 : 78-85, 1984.
 - 48) Clayberger, C., DeKruyff, R.H. and Cantor, H. : T cell regulation of antibody responses: an I-A-specific, autoreactive T cell collaborates with antigen-specific helper T cells to promote IgG responses. *J. Immunol.*, 134 : 691-694, 1985.
 - 49) Kotani, H., Mitsuya, H., Jarrett, R.F., Yenokida, G.G., James, S.P. and Strober, W. : An autoreactive T cell clone that can be activated to provide both helper and suppressor function. *J. Immunol.*, 136 : 1951-1959, 1986.
 - 50) Leung, D.Y.M., Young, M.C. and Geha, R.S. : Induction of IgG and IgE synthesis in normal B cells by autoreactive T cell clones. *J. Immunol.*, 136 : 2851-2855, 1986.
 - 51) Saito, K., Tamura, A., Narimatsu, H., Tadakuma, T. and Nagashima, M. : Cloned auto-Ia-reactive T cells elicit lichen planus-like lesion in the skin of syngeneic mice. *J. Immunol.*, 137 : 2485-2495, 1986.
 - 52) Saito, T. and Rajewsky, K. : Functional analysis of a self-I-A reactive T cell clone which preferentially stimulates activated B cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 126 : 311-316, 1986.
 - 53) Smith, J.B. and Talal, N. : Significance of self-recognition and interleukin-2 for immunoregulation, autoimmunity and cancer. *Scand. J. Immunol.*, 16 : 269-278, 1982.
 - 54) Jnaneway, C.A.Jr., Bottomly, K., Babich, J., Conrad, P., Conzen, S., Jones, B., Kaye, J., Katz, M., McVay, L., Murphy, D.B. and Tite, J. : Quantitative variation in Ia antigen expression plays a central role in immune regulation. *Immunology Today*, 5 : 99-105, 1984.
 - 55) Rosenberg, Y.J., Steinberg, A.D. and Santoro, T.J. : The basis of autoimmunity in MLR-*lpr/lpr* mice: a role for self Ia-reactive T cells. *Immunology Today*, 5 : 64-67, 1984.
 - 56) Sakane, T., Steinberg, A.D. and Green, I. : Failure of autologous mixed lymphocyte reactions between T and non-T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75 : 3464-3468, 1978.
 - 57) Miyasaka, N., Sauvezie, B., Pierce, D.A., Daniels, T.E. and Talal, N. : Decreased autologous mixed lymphocyte reaction in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.*, 66 : 928-933, 1980.
 - 58) Moody, C.E., Casazza, B.A., Christenson, W.N. and Weksler, M.E. : Lymphocyte transformation induced by autologous cells. VIII. Impaired autologous mixed lymphocyte reactivity in patients with acute infectious mononucleosis. *J. Exp. Med.*, 150 : 1448-1455, 1979.
 - 59) Smith, J.B. and Pasternak, R.D. : Syngeneic mixed lymphocytes reaction in mice: strain distribution, kinetics, participating cells, and absence in NZB mice. *J. Immunol.*, 121 : 1889-1892, 1978.
 - 60) Glimcher, L.H., Steinberg, A.D., House S.B. and Green I. : The autologous mixed lymphocyte reaction in strain of mice with autoimmune disease. *J. Immunol.*, 125 : 1832-1838, 1980.
 - 61) Matsushima, K., Procopio, A., Abe, H., Scala, G., Ortaldo, J.R. and Oppenheim, J.J. : Production of interleukin 1 activity by normal human peripheral blood B lymphocytes. *J. Immunol.*, 135 : 1132-1136, 1985.
 - 62) Umetsu, D.T., Katzen, D., Jabara, H.H. and Geha, R.S. : Antigen presentation by human dermal fibroblasts: activation of resting T lymphocytes. *J. Immunol.*, 136 : 440-445, 1986.