歯周病原性細菌のマウス免疫機構に及ぼす影響

澁谷 俊 昭

朝日大学歯学部大学院歯学研究科歯周病学専攻

(指導：岩山幸雄教授)

(昭和63年6月17日受付)

Influence of Periodontopathic Bacterial Antigens on the Immune Response in Mice

Toshiaki SHIBUTANI

Department of Periodontology, School of Dentistry, Asahi University

(Director : Prof. Yukio IWAYAMA)

This study was designed to investigate the influence of the oral flora on the host's immune mechanism.

After human periodontopathic bacterial antigens were inoculated into the inter-T cell and B cell subpopulations of peripheral blood lymphocytes and serum antibody titer were measured proliferation and the kinetics of T cell and B cell in the site of inoculation was observed.

Haemophilus actinomycetemcomitans, *Bacteroides gingivalis*, *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum* and *Capnocytophaga ochracea* were selected as test bacteria and the supernatants from their ultrasonic disintegration were used as antigens which were inoculated into Balb/c mice divided into the initial inoculation group and the booster group.

Peripheral blood lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry using monoclonal antibodies, and

serum antibody titers and tissue lymphocytes were measured by the ELISA method and the immunohistochemical technique using biotin-streptavidin, respectively.

Peripheral blood lymphocyte subsets showed a transitory diminution in T cell in the initial inoculation group. Determination of the helper/suppressor T cell ratio as a parameter of the immunoregulatory function made clear the coexistence of a high-value group and a low-value group. Specific antibody titers showed an interbacterial group difference. Statistical analysis of tissue lymphocyte subsets did not reveal a distinct difference.

The results suggest that inoculation of a bacterial antigen causes a disturbance the immunoregulatory network.

Key words : Periodontopathic bacteria, Immune response, Lymphocyte subsets, Serum Antibody, Flow cytometry

要旨：本研究は生体の免疫機構におよぼす口腔内細菌の影響を明らかにする目的で、ヒト歯周病原性細菌をマウスに接種し、末梢血リンパ球の T cell 間および B cell の subpopulation の測定と血中抗体価の測定、接種局所の T cell, B cell の動態を経時的に観察することにより、免疫機構への影響を検討した。

供試菌には *Haemophilus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium*

nucleatum, *Capnocytophaga ochracea* の5菌種を選び、その超音波破碎上清を抗原溶液とし、Balb/c マウスに初回接種群と booster 群とに分け接種した。末梢血リンパ球 subset の解析にはモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法で行い、血中抗体価の測定には ELISA 法、組織中のリンパ球に対してはピオチンーストレプトアビジンを用いた免疫組織化学的手法で行った。

その結果、末梢血リンパ球 subset の変動では初回接種群で T cell の一過的低下が見られた。免疫調節機能のパラメーターである helper/suppressor 比について検討すると、高い値を示す群と低い値を示す群が存在した。特異抗体価の測定から各細菌群間で差異が認められた。組織中のリンパ球 subset の解析では明らかな差異は見られなかった。

以上の結果から細菌抗原の接種により免疫調節ネットワークに攪乱を生じる可能性が示唆された。

索引用語：歯周病原性細菌，免疫応答，リンパ球サブセット，血清抗体価，フローサイトメトリー

緒 言

歯周疾患の病因に細菌が大きく関与していることは周知の事実であり、口腔内細菌そのものが歯周組織に直接的に侵入するというよりは、むしろその構成成分である酵素や内毒素に関連していることが示唆されている¹⁻⁴⁾。一方、これら細菌構成成分に対する生体側の応答としての免疫機構の発現の様式も、本疾患に重要な役割を担っていることが近年強く示唆されるに至っている⁵⁻⁸⁾。

抗体産生系細胞であるB細胞を非特異的に刺激し、抗原非特異的な抗体を産生させる能力 Polyclonal B cell activation (PBA)⁹⁾ は *Bacteroides* sp., *Fusobacterium*, *Capnocytophaga* sp., *H. actinomycescomitans* などのグラム陰性菌成分に保有されていることや¹⁰⁻¹⁸⁾、このPBAの発現機構にはB細胞に直接作用するT細胞非依存性とT細胞のコントロールを受けるT細胞依存性の場合とがあり、*Actinomyces viscosus* や *Fusobacterium nucleatum* のPBAはT細胞依存性であること、また、Tリンパ球が自己の非リンパ球を認識して分裂、増殖を起こす現象において自己認識系の一表現であり免疫系の恒常性の維持に必須の応答であると考えられている Autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR)¹⁹⁾ は健康人に比し有意に低いことなど¹⁹⁻²⁵⁾は、T cell の免疫調節機能の dysfunction が歯周疾患の病態に深く関わっていることを示すものである。

このT cell の免疫調節機構には、そのサブセットである helper T cell, suppressor T cell, inducer T cell, cytotoxic T cell などによる量的および機能的要因が中心になっている。竹内ら^{26,27)}はヒト歯周炎患者の末梢血リンパ球 subset の分析を行ない、helper T cell/suppressor T cell 比の変動が、歯周病の病型によって特異

性のあることを報告し、これが先天性要因および後天性要因に基づくことを示唆している。筆者はこれらの要因、とくに後天性要因に、口腔内細菌の影響が関連していると考え、数種のヒト歯周病原性細菌を接種したマウスにおける免疫調節機能の変化を末梢血リンパ球のT cell subset 間およびB cell のポピュレーションの測定、血中抗体価の測定、接種局所のT cell, B cell の動態を追求することによって検討した。

材料と方法

1. 実験動物

5～7週齢の雄 Balb/c マウス（静岡実験動物農業協同組合）を用いた。

飼育は感染を防ぐ目的で他の動物と隔離した部屋の中で湿度60%、25°Cの条件下のボックス中（EBAC-S）で行い、ボックス内はクリーンエアとした。飼料は固型飼料（M.F., オリエンタル酵母工業）、飲料水はすべて滅菌水とし毎日交換した。また実験期間を通してマウスに全身的な変化は認められなかった。

2. 供試菌株と調整法

Haemophilus actinomycescomitans SUNY 71813 (*H.a.*), *Bacteroides gingivalis* ATCC 33277 (*B.g.*), *Actinomyces viscosus* ATCC 19246 (*A.v.*), *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 (*F.n.*), *Capnocytophaga ochracea* S-3 (*C.o.*) 以上5菌株を用いた。

C. ochracea は岡山大学歯学部保存学第二講座（村山洋二教授）より、その他の菌株は朝日大学歯学部口腔細菌学講座（並河 勇教授）より分与を受けた。

それぞれの菌株は GAM 培地（ニッスイ）に接種後 N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10% の嫌気的条件下（Anaerobic Globe Box 平沢製作所）で 37°C, 7～10 日間培養を行な

group	inj.	-4W-	-2D	inj.	1	2	3	4W
1st. inoc.		○	★	○	○	○	○	○
Booster	★		★	○	○	○	○	○
control		○	★	○	○	○	○	○

★は接種日 ○は採血日

図1 実験スケジュール

図2 血液調整法

った。また *B. gingivalis* に関しては GAM 培地中に 0.1 % menadione (SIGMA), 0.5% hemin (半井化学) を加え、同様の条件で培養を行なった。その後 $7,000 \times G$ 30 分間で集菌し 0.01 M, pH. 7.2, phosphate buffered saline (PBS) を加えピペッティングと洗浄を 3 回ずつ行ない約 1×10^9 個/ml になるように調整した細菌浮遊液を 200 W, 40 分間超音波破碎 (INSONATOR KUBOTA) を行ない菌体を破壊した。

顕微鏡下で菌体が存在しないことを確認後、再度 $7,000 \times G$ 30 分間遠心し上清のみを回収し $0.45 \mu m$ のミリポアフィルターを通し実験に供した。

3. 接種方法

booster マウスの予備免疫には前述の細菌破碎上清と Freund's incomplete adjuvant (DIFCO, LAB.) を 1 : 1 の割合で十分に混和しエマルジョンとしたものをマウス上顎右側頬粘膜下に $25 \mu l$ ずつ 30 G の注射針で接種した。

また booster 時と初回接種マウスにはアジュバントを

表1 モノクローナル抗体

FITC 標識	Thy-1.2	(Anti Pan-T cell)
FITC 標識	Lyt-2	(Anti Suppressor/Cytotoxic T cell)
PE 標識	L3T4	(Anti Helper/Inducer T cell)
	I-A ^d	(Anti Pan-B cell)

用いずそのまま同左側に $25 \mu l$ ずつ接種した。control 群には pH. 7.2 PBS を同量接種した。

4. 実験スケジュール

各細菌接種群 (各 5 匹), control 群 (20 匹) に対して図1に示すようなスケジュールで接種と採血をおこなった。また接種部位の組織内でのリンパ球 subset を観察する目的で各群マウスの採血日に合わせ 2 匹ずつ屠殺した。

5. 採血方法

北川²⁸⁾の方法に準じて、約 $5 \mu l$ 500 万単位のヘパリンナトリウムを吸引しておいた滅菌パスツールピペットの先端を、マウス左側眼窩へ慎重に挿入し、約 $100 \mu l$ のヘパリン加末梢血として採取した。

6. 末梢血調整法

リンパ球の分離には Ficoll-Hypaque 法 (Lymphoprep NYCOMED AS.) による比重遠心法でおこなった²⁹⁾ (図2)。

直径 8 mm のチューブに $500 \mu l$ のリンホブレップを入れ、 $200 \mu l$ の希釈末梢血を静かに重層した後に $2,000 \times G$ 30 分間遠心した。

図2に示すようにその上清 (plasma) $100 \mu l$ は ELISA 法による抗体価の測定に用い、リンパ球分画は慎重に回収した後に PBS で数回洗浄し約 1×10^4 個の浮遊液になるように算定、調整した。

7. リンパ球 Subpopulation の分析法

モノクローナル抗体 (MoAb) には、FITC 標識抗 Thy 1.2 抗体 (Rat IgG)^{30,31)}, FITC 標識抗 Lyt 2 抗体 (Rat IgG)^{30~33)}, PE 標識抗 L3T4 抗体 (Rat IgG)^{34,35)}, 抗 I-A 抗体 (mouse IgG)^{36~38)} (Becton Dickinson) を用いた (表1)。

リンパ球 10^3 個に対してそれぞれのモノクローナル抗体を $1 \mu l$ の割合で加え $4^\circ C$ 30 分間反応させた後、PBS で洗浄し再度浮遊液として測定に供した。I-A^d 抗体は未標識抗体のため、さらに 2 次抗体としてアフィニティー精製 FITC 標識抗マウス IgG (Goat TAGO) を引き続き 30 分間反応させ、その後同様に調整した。細胞の膜抗原の変性を防ぐ目的で、保存せずに調整後ただちに

測定をおこなった (図3)。

蛍光陽性細胞率の分析には Flow Cytometry (FCS-1 日本分光) を用いた³⁹⁾。前方散乱光と 90° 側方散乱光により mapping し, そのリンパ球分画の細胞群に gating して, この区域内の細胞の蛍光強度を測定した。測定に際し $1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ 個のリンパ球をカウントした。蛍光陽性の border line は高瀬⁴⁰⁾の方法に準じて決定した (図4)。統計処理に際し各抗体陽性率は Thy 1.2⁺ cell との比としてあらわした。

8. 抗体価の測定方法

5. で分離した血漿 (Plasma) 中の細菌抗原に対する抗体価を Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法⁴¹⁾で測定した (図5)。

まず 96 穴マイクロタイタープレート (住友ベークライト) の各 well に 100 倍希釈した各細菌の超音波処理上清を 50 μ l ずつ入れ 4°C で over night し吸着させた。PBS で洗浄後, 1% BSA (Bovine serum albumin)-炭酸 buffer を 200 μ l ずつ各 well に加え室温, 1 時間, で coating した。PBS-T (pH 7.2 PBS-0.05% Tween 20) で洗浄し, 各群のマウス希釈血漿 (1:10) を 50 μ l ずつ well に入れ 1 時間反応させた。反応後, PBS-T で洗浄し, ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (1:500), IgM (1:500) (Goat. TAGO) を 1 時間反応させ, PBS-T で洗浄し o-PDA (o-Phenylenediamine Dihydro-

chloride 半井化学) pH. 5.0 クエン酸-リン酸緩衝液を加え 30 分後 H_2SO_4 で反応を止めた。直ちに EIA リーダー (BIO-RAD) により, OD 492 nm で吸光度を測定した。また抗体価の測定は全て triplicate でおこなった。

9. 免疫組織学的検索⁴²⁾

屠殺時にマウス右側上顎の接種部位を biopsy し Tissue-Tek II に包埋し -30°C で凍結させ, Cryostat (MINOTOME DAMON/IEC DIVISION) で 5~8 μ m の連続切片とし, アセトン固定した後に PBS 中に 20 分間浸漬した。以下通常の酵素抗体法に従い, 内因性ペルオキシダーゼを除去するために 0.3% H_2O_2 を 10 分間反応させた。一次抗体には前述の抗 Thy 1.2, Lyt 2, L3T4,

図3 末梢血リンパ球の染色法

図4 陽性細胞率の算定法

蛍光陽性の border line は高瀬⁴⁰⁾の方法に準じて決定した

図 5 血中抗体価の測定方法

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法で行った。

I-A^d 精製抗体 (1:100) を用いた。二次抗体以降にはビオチン-ストレプトアビジン システム (ZYMED)⁴³⁻⁴⁶⁾ を用いた。すなわち二次抗体にはビオチン標識抗ラットイムノグロブリンまたは抗マウスイムノグロブリンを反応させ PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させた。発色基剤には AEC (3-Amino-Ethylcarbasol) または DAB (3,3'-Diamino-benzidine-tetrahydrochloride) を用い、核染色にはヘマトキシリンまたはメチルグリーンで行ない、水溶性封入剤で封入し検鏡した (図 6)。組織上での陽性細胞率の算定には無作為に 10 視野を選び、その視野内の単核球中の陽性細胞率として算定し、T cell 陽性率との比として表わした。また同時に対比染色として通常のヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色も併せておこなった。

結 果

1. 末梢血リンパ球 subset の変動

表 2 に示すように control 群では Thy 1.2⁺ cell は 69.66±3.12%, L3T4⁺ cell は 56.03±3.13%, Lyt 2⁺ cell は 15.94±1.22%, I-A^{d+} cell は 9.76±2.01% であり L3T4⁺/Thy 1.2⁺ は 80.65±4.50, Lyt 2⁺/Thy 1.2⁺ は 22.94±2.17, I-A^{d+}/Thy 1.2⁺ は 14.05±2.84 で、図 7 に示すように週に 1 度ずつの眼窩からの採血が、リンパ球 subset の変動には影響しないことが明らかと

図 6 免疫組織染色法

Biotin Streptavidin system を用いて行った。

表 2 control 群の末梢血リンパ球 subset

Antibody	mean±S.D. (%)	/Thy 1.2 ⁺
Thy 1.2 ⁺	69.66±3.12	—
L3T4 ⁺	56.03±3.13	80.65±4.50
Lyt 2 ⁺	15.94±1.22	22.94±2.17
I-A ^{d+}	9.76±2.01	14.05±2.84

なった。

実験群では全ての群で接種後 1 週目に Thy 1.2⁺ cell の低下がみられ (*H.a* では 64.12%→60.04%, *A.v* では 65.18%→56.97%, *B.g* では 71.10%→57.92%, *C.o* では 72.88%→62.88%, *F.n* では 70.57%→64.20%), それに関連して I-A^{d+} cell の増加がみられた。とくに *A.v* 菌群ではその I-A^{d+} cell の増加は 8.90%→24.21% と著しく booster 時にも同様に 17% 前後と高い値を示した。また *C.o* 群でも初回接種時に I-A^{d+} cell の増加傾向が認められ 1 週目で 21.84% であった。しかし Thy 1.2⁺ cell は初回接種時には経時的に増加し正常値に近づいていったが、booster 時には徐々に増加傾向であっ

図 7a 末梢血リンパ球 subset の変動

た (図 7a, b)。

免疫調節機能のパラメーターと考えられている helper T cell/suppressor T cell 比 (L3T4⁺/Lyt 2⁺) の変動に注目してみると (図 8), control 群では 3.52 ± 0.37 と

安定しているのに対し, 初回接種後 1 週目に *A. v* 菌群, *B. g* 菌群では 4.06, 4.11 と高い値を示した。反対に *H. a* 菌群は 2.59, *C. o* 菌群では 2 週目に 2.62 と低い値を示し, それぞれ control 群に比し有意な差が存在し

図 7b 末梢血リンパ球 subset の変動

た。

このように初回接種群では1週～2週目に明らかに上昇する群と (*A.v*, *B.g*), 低下する群 (*C.o*, *H.a*, *F.n*) に

分けることができる。しかし3週～4週では比較的接種前の状態に類似する傾向が見られ 4週目には *H.a* 3.56, *A.v* 3.43, *B.g* 3.38, *C.o* 3.83, *F.n* 3.75 で control 群と

図 8 末梢血リンパ球の L3T4⁺/Lyt2⁺ 比の変動表 3 末梢血リンパ球の L3T4⁺/Lyt2⁺ 比

	-2D	1W	2W	3W	4W	1W	2W	3W	4W
H. a	3.34	2.59	2.58	3.48	3.56	3.00	3.40	3.73	4.29
A. v	3.43	4.06	2.93	3.23	3.43	3.25	3.93	2.86	3.04
B. g	3.62	4.11	3.80	3.46	3.38	3.25	3.62	3.18	3.39
C. o	3.73	3.25	2.62	3.42	3.83	3.01	3.32	3.54	3.48
F. n	3.69	3.32	3.17	3.45	3.75	3.16	3.26	2.81	3.20

の間に有意差はみられなかった。booster 時には全群とも 1 週, 2 週には比較的類似した変動傾向を示しているものの 4 週目にはそのばらつきは大きくなり *H.a* 4.29, *A.v* 3.04, *B.g* 3.39, *C.o* 3.48, *F.n* 3.20 と各細菌間で差異が認められた (表 3)。

2. 血中抗体価の測定結果 (図 9, 10)

初回接種時には各群共に初期に IgM が上昇し, 引き続き IgG の上昇がみられ, 各細菌群間では比較的類似した傾向であった。例外としては *F.n* の IgM が 1 週目に 0.240→0.527 (OD 値) になったものの, 4 週目には 0.374 のレベルにまで低下したことで, *H.a* の IgG が 3 週, 4 週になっても 0.405, 0.393 と低い値を保っていたことである。また booster 時には *A.v* 菌群では IgM,

IgG とも 1 週から 4 週まで (IgM ; 0.713, 0.801, 0.840, 0.835, IgG ; 1.187, 1.182, 1.137, 1.118) 著しく高いレベルの抗体価を維持していた。*B.g* 群で IgM が 0.539, 0.557, 0.565, 0.564 と若干上昇傾向にあるものの, その他の群では IgM に上昇傾向は認められなかった (*H.a* ; 0.322, 0.327, 0.359, 0.351, *C.o* ; 0.426, 0.365, 0.368, 0.376, *F.n* ; 0.431, 0.337, 0.328, 0.340)。IgG に関しては初回接種時の 4 週目よりもやや上昇しているものの (*B.g* ; 0.315, 0.528, 0.634, 0.638, 0.686, 0.751, 0.631, 0.699, 0.662) 比較的安定したレベルを保っている。*H.a* 群では 0.494, 0.527, 0.555, 0.583 と低いレベルであり 4 週目には *A.v* 群以外の群では比較的近似した値を示した (*H.a* 0.583, *B.g* 0.662, *C.o*

図 9 各細菌抗原に対する特異抗体価の変動 IgG

図 10 各細菌抗原に対する特異抗体価の変動 IgM

0.682, *F.n* 0.621)。

3. 組織内リンパ球 subset の分析結果

抗原接種局所の組織内リンパ球 subset を免疫組織化学的手法で観察した結果、各細菌群間で明らかな差異は

認められなかったものの、初回接種群と booster 群とを比較すると、booster 群では局所に浸潤した炎症性細胞が多く見られ集簇した像を呈する場合が多く観察され、そのような部位に T cell, B cell 系細胞とも多く見ら

図 11 抗 L3T4⁺ cell

集簇する細胞群の中に陽性細胞が見られる。(×100)

図 12 抗 I-A^{d+} cell

陽性細胞が認められるもの非特異染色も多く見られる (×100)

れた(図11, 12)。とくに I-A^{d+} cell は booster 群で高く、その T/B 比は 1.37 ± 0.80 と初回接種群の 1.84 ± 0.90 と比較すると有意差はないものの booster 群で低値を示した。L3T4⁺/Lyt 2⁺ 比に注目すると、 1.74 ± 0.41 , 1.68 ± 0.74 と有意差は存在しなかった(図13, 14)。しかし図12に見られるように I-A^{d+} cell 染色では非特異染色が多くみられ正確な算出は困難であった。H・E 染色による対比染色でも初回接種群で比較的びまん性の細胞浸潤像が見られたのに反し booster 群では多形核白血球、形質細胞、単核球、マクロファージなどを中心に集簇的にみられその浸潤細胞数もきわめて多かった。またその周囲組織には毛細血管の拡張、膠原繊維束の断裂が見られ重篤な炎症性像が観察された(図15~17)。

図 13 接種組織中のリンパ球 subset

図 14 接種組織中の L3T4⁺/Lyt2⁺比, thy 12⁺/I-A⁺ 比

考 察

細菌感染と宿主の免疫機構は表裏一体をなしている。宿主の免疫機構の破綻は易感染性をもたらし、さらにその感染症をより一層重篤なものにする。歯肉溝内に生息する多数の細菌を、脆弱な歯肉溝上皮のみで防御している歯周組織においては、万人に感染症発症の機会があり、その発症阻止のためには、なおさら正常な防御機能が必要とする。事実、永久歯萌出後の歯周組織はすべて subclinical gingivitis を有しているものの、その多くが clinical gingivitis, あるいは periodontitis への進展を阻止していることは、宿主の免疫応答が適格に機能していることの証左である。これを逆説的にみれば、各種歯周疾患への発症に免疫機能の dysfunction が関連していることを大いに示唆するものであり^{47,48)}、竹内ら^{3,4)}は重度進行性歯周炎患者の末梢血リンパ球 subset の解析

(×25)

(×100)

図 15, 16 Booster 接種局所で、集簇的な炎症性細胞浸潤像が見られ結合組織破壊が著しい。

から患者の pan T cell の低下、および pan B cell の有意な上昇、またこのような変化が初診時にも治療中にもあまり変動しないことから、歯周炎罹患患者、あるいは将来歯周炎に罹患する可能性のある個体には免疫機能の dysfunction が内在していることを予測している。このような免疫機構の恒常性の dysfunction には、先天的要因と後天的要因の2面性が考えられる。とりわけ、後天的要因では、細菌性刺激そのものがリンパ球を主とする免疫担当細胞系の feed-back 機構に影響を与えることが考えられる。

本研究においては、細菌性刺激が実際に免疫調節機構に変化を与えるものか否かを、マウスを用いその末梢血リンパ球および細菌侵襲局所のリンパ球の免疫学的、免疫組織学的な解析によって検討した。研究に供した細菌は、現在、歯周病原性細菌として注目されているヒト口腔内細菌のうちの5菌種である。これら細菌の中で *H. actinomycetemcomitans* や *Capnocytophaga. sp.* は一般

(×50)

図 17 初回接種局所、びまん性に炎症性細胞が見られる。

的に限局型若年性歯周炎患者から特異的に見られ、*B. gingivalis* をはじめとする多くの細菌はその他の歯周炎でよく検出されている^{49~65)}。

一方、被験動物としてマウスを用いたが、マウスは他の実験動物以上に免疫機構がヒトに近く、しかも古くから各分野で免疫モデルとして用いられ、精製抗体等、免疫学的研究に必要な材料を容易に入手し得るという利点がある。とくに、Balb/c マウスは免疫機構の面から、生来安定した状態にある動物であるので、本研究のような細菌刺激を与えた場合における対比を明確に捉えることができる⁶⁶⁾。

研究に先立って、このような未処置 Balb/c マウスの末梢血リンパ球の経時的変動を4週にわたって予備調査したが、免疫調節機構のパラメーターとされる helper T cell/suppressor T cell 比は 3.52 ± 0.37 で正常値を保った。このことから健常 Balb/c マウスは免疫機構において経時的変動のないことが判明した。実験は1回の初回接種群に加え、4週間後さらにもう1回接種の booster 接種群でおこなった。これはヒトの歯肉溝内あるいは歯周ポケット内の常在菌が繰り返し歯周組織に侵襲しつつあることを想定したうへの接種手段である。このように長期にわたって観察した両群の Balb/c マウスにおける末梢血リンパ球の動きを総括的にみると、初回接種後4週にわたる検索では、ヒトの pan T cell に相当する $\text{Thy } 1.2^+$ cell の一過性の減少と、ヒトの pan B cell に相当する I-A^d+ cell のやや増加が全般傾向として認められ、さらに、ヒトの helper, inducer T cell に相当する L3T4^+ cell、および suppressor, cytotoxic T cell に相当する $\text{Lyt } 2^+$ cell では、両 cell とも各菌種において control とほぼ同様か、やや減少を認めた。従って

Thy 1.2⁺ cell の減少はこの両 cell の低下に基づくものであることが判明した。

一方、同様のことを booster 接種後についてみると、L3T4⁺ cell は 2 週後を境にして増加し、以後プラトーに達する傾向が認められたのに対し、Lyt 2⁺ cell は経時的変動があまり認められなかった。しかし、これらの全般的な傾向の中であって、特定の菌種を接種したマウスにおいて例外的な動きを示した。すなわちこれらを基に実験マウスの helper T cell/suppressor T cell 比を算出してみると、control の 3.52 に対して、初回接種群において、*A.v* 菌および *B.g* 菌接種群ではそれぞれ 4.06, 4.11 と control より高値を示し、*H.a* 菌および *C.o* 菌接種群ではこれらとは逆に低値を示した。booster 接種群においては、とくに *H.a* 菌接種群が 4 週目に 4.29 と高値を示した。

このような初回接種後の期間、および booster 接種後の期間の helper T cell/ suppressor T cell 比の高低はそれぞれのリンパ球 subset の増減によってもたらされることはいうまでもないが、これには、それぞれのリンパ球の増殖における feed-back 機構が関わっている。通常、正常状態においては、各リンパ球 subset は末梢リンパ臓器において正負の feed-back と機構が交互に働き、定常状態を保っている。このような定常状態を保持する要因は多彩であるが、その中核をなすものはマクロファージ (Mφ) および helper T cell と suppressor T cell であることはよく知られ、このために、helper T cell/suppressor T cell 比が重要な意味を有することになる。また、これら細胞が機能する際の実際の物質は interleukin (IL) であることも知られるようになってきた。この中には、IL-1, IL-2, IL-3 がある。IL-1 はマクロファージの産生物質であり、胸腺細胞や末梢 T cell の分裂、増殖を促すことから mitogenic protein あるいは Lymphocyte activating factor とも命名され helper T cell に対して T cell growth factor (IL-2) の産生を誘導し、T 細胞依存性抗体産生を促す。マクロファージの IL-1 産生を誘導する物質の主たるものは細菌抗原であり、BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), *Corinebacterium*, *Streptococcus* がよく知られている。一方、IL-2 は抗原 T cell, Lyt 1 遅延型 effector T cell, Lyt 2 suppressor, killer T cell の増殖を促すこの IL-2 による effector T cell の誘導過程においてインターフェロン γ が産生され、これが helper T cell に対して negative feed-back をもたらす。IL-3 は thy 1⁺, Lyt⁺ cell によって産生され、骨髄および脾臓に存在する極めて幼弱な

20 α -hydroxysteroid dehydrogenase をもつリンパ球に作用し、この物質の産生を誘導すると同時に増殖をも促進させる⁶⁸⁻⁷²⁾。

以上のような、各リンパ球 subset の増減の feed-back 機構は個体発生上、正常に形成され、機能している間においては、外因性、あるいは内因性の抗原物質から生体を防御することができる。換言すれば先天的に免疫機能不全があればこれを行ない得ないことになるが、AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome)⁷³⁾ の如く、元来正常な免疫臓器を侵襲し、後天的に免疫不全を招くこともある。AIDS は極端な例であるが、種々の抗原物質の持続的侵襲も、重篤度に差はあるものの同様の結果を引き起こす可能性がある。というのは、上述のマクロファージ, helper T cell, suppressor T cell という免疫調節回路を後天的に作動させる引き金となるのは抗原物質にほかならないからで、現在、これら 3 種の免疫担当細胞による免疫調節回路のネットワークに関する詳細な feed-back control の仮説の中にも抗原の介在が述べられており、このネットワークの一要因であることは明らかである。しかし抗原が如何なる条件下で免疫調節ネットワークを破綻させるのかは十分な検討がなされていない。想定し得る要因には抗原の質と量との関係がある。たとえば抗原の質が TI 抗原か TD 抗原かによって成立する免疫ネットワークが違ってくる。また、抗原量の著しい多寡が免疫トレランスを引き起こすことは周知の事実であり、トレランスの成立は、見方を変えれば明らかに免疫調節機構の dysfunction を意味するものである。とくに細菌は、生体にとってこのような抗原の質と量による免疫機構を dysfunction させる最も有力な抗原と考えられる。これは、菌体成分は多種多様であり、したがって抗原性も複雑多岐にわたると同時に、侵襲の様相も色々であるからである。このことは口腔内細菌にもあてはまり、とりわけ、歯肉溝内の細菌は菌種が多種類にのぼるだけでなく持続感染の可能性が極めて高い。現実には、歯肉溝内の細菌は健康人および歯周炎患者ともどもがこの特異抗体を有していることはよく知られている。例えば、若年性歯周炎患者では *H.a* 菌や *Capnocytophaga. sp.* に、びまん性の若年性歯周炎患者や進行性の重度歯周炎患者では *B. gingivalis* に、他の歯周炎では *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Veillonella*, に対する血中抗体価の上昇することが知られている⁴⁹⁻⁶⁵⁾。このことは一応、歯周病原性細菌を始めとする口腔内細菌に対する防御の備えができていたと意味するものであるが、その特異抗体の保有は生体個々によって一

様ではなく、抗体力価の相違に停まらず、個体間において有無の認められることも往々である。この現実もまた、免疫機構の dysfunction に起因するところ大である。今回、数種のヒト歯周病原性細菌の抗原量を同一として接種したところ、初回接種の one shot において、すでに helper T cell/suppressor T cell 比が正常値をラインとして高低の相反する解析値が得られ、菌種間の相違を認めた。しかし、その多くは経時的に旧に復したことから、菌種がリンパ球 subset の動向に特異的な影響を与えるものの、侵襲が一過性であるかぎり subset の変化も一過性であることが判明した。ここにさらに、booster shot を加えると、持続性の変動が生じることが明らかになった。このことは、反復侵襲の場合に、細菌抗原は免疫調節ネットワークを攪乱する可能性を有していることを示すものである。この際に、booster 接種後 2 週までは菌種間の相違はあまり認められなかったが、4 週目に入ると、その相違が明確になり、helper T cell/suppressor T cell 比は *A.a* および *B.g* で 4.0 あるいはそれ以上を示し、*C.o* および *F.n* は control 群の 3.52 ± 0.37 に近似し、*A.v* はこれより低い値を示した。つぎに血中 Immunoglobulin の様相をみると、初回接種では、いずれの菌種接種群も初期に IgM が上昇し、後に IgG にスイッチするという一般的傾向を示した。ここでは *H.a* 接種群は例外的に IgG が常に低値を示すという傾向が認められた。

一方、booster 接種群では、菌種間の差がやや著明になり、*A.v* 接種群は IgM、IgG とともに高値を示し、*H.a* 接種群は IgM、IgG とともに他と比べて低値を示した。以上の helper T cell/suppressor T cell 比と血中 Immunoglobulin 量とを対比してみると、subset 比が高値を示した *H.a* 接種群では逆に特異抗体価が低く、また subset 比が低値を示した *A.v* 菌接種群では特異抗体価が高くなるという逆相関性を認めた。このような subset 比と Immunoglobulin 値との関係、歯周病原性細菌のある群のもの、とくに *A.v* および *H.a* は反復感染によって免疫調節機構を攪乱する可能性のあることが示唆された。

最後に、歯周病原性細菌が与える以上のような免疫調節機構への影響が、細菌抗原接種局所にどのように反映してくるのかを調査した。竹内ら²⁶⁾はヒト成人性歯周炎患者の末梢血リンパ球の helper T cell/suppressor T cell 比の破綻が、その病態を stable T cell lesion かあるいは progressive B cell lesion に分かち要因に成り得ると予測したが、逆に、末梢血のリンパ球 subset の動態は病巣局所に反映されないという報告も

みられる^{74,75)}。筆者の研究では、菌種接種群においても、初回接種時に比べて booster 接種時に I-A⁺ cell が増加するという共通した傾向がみられたが、局所での helper T cell/suppressor T cell 比には、末梢血リンパ球でみられたような菌種間の差異は捉えることができなかった。しかし細菌抗原接種局所では、単に狭義の免疫担当細胞以外に多数の細胞が浸潤し交差反応を示すことや、病巣を菲薄な一平面でしか捉えられないことが的確な判断を下し得ないので、算定値の示すままに判断を下すことは現在の手法では極めて危険であることも判明した^{74~81)}。以上を小括すると、今回の実験的研究によってヒトの歯周病原性細菌として挙げられているものの中には、単にその産生物が歯周組織を直接的に障害するのみならず、反復せる侵襲によって、免疫調節系を著しい全身疾患の発症に至らない程度に攪乱させ、これが、歯周組織の免疫機能を低下させその発症や経過に関わるという示唆を得た。

結 論

歯周病原性細菌が免疫調節機構に与える影響について検討する目的で、数種の口腔内細菌の超音波破砕可溶性抗原を Balb/c マウスに接種し、*in vivo* での免疫調節機能の全身のおよび局所的な変化を末梢血リンパ球 subset の変動を中心に血中抗体価、接種局所の組織中リンパ球 subset の変動をも含めて検討したところ以下の結論を得た。

1. 一般的傾向として末梢血リンパ球 subset の変動は各細菌接種群ともに初回接種時に T cell の一過的低下が認められたものの、booster 時には著明な変化は認められなかった。免疫調節機能のパラメーターである helper T cell/suppressor T cell 比に注目すると、初回接種直後において正常値に対して高低の相反する解析値が得られ、菌種間の相違を認めたものの、その後経時的に正常値に近似した値に復した。

2. booster 時には持続性の変動が生じ、反復接種により免疫調節ネットワークに何らかの影響を及ぼしていることが推測された。

3. また細菌接種後の特異抗体価はすべて IgM から IgG へのスイッチがみられたが、リンパ球 subset 比に異常な変動を示した菌種接種群ではこの抗体価が低く、免疫機構の異常がそのまま抗体産生に影響していた。とくに *Haemophilus actinomycetemcomitans* の如き特定の菌種においてはこの傾向が強く現れた。

4. 接種局所のリンパ球 subset の解析の結果, 各細菌群間で明らかな差異は認められなかったものの booster 時の局所には B cell 系細胞を中心としたリンパ球浸潤像が強く認められ, 血中リンパ球 subset とは大きく異なることが明らかになった。

以上の成績より, ヒト歯周病原性細菌の中にはその抗原性物質が元来正常である生体の免疫機構に対して影響を及ぼし, その調節機能の攪乱を生ぜしめる可能性のあることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御懇篤な御指導と御校閲を賜りました歯周病学講座 岩山幸雄教授に深く感謝いたします。また研究の実施にあたり終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました口腔病理学講座 竹内 宏教授に心から感謝いたします。さらに貴重な細菌の分与ならびに御校閲を賜りました口腔細菌学講座 並河 勇教授, 細菌学的手法の御教示, 御指導を頂きました佐藤 勝博士に感謝致します。最後に本研究に対して種々御協力下さった口腔病理学講座の皆様および歯周病学講座の皆様に厚くお礼申し上げます。

本研究の一部は昭和 61 年度宮田研究奨励金の補助により行われたことを付記する。

文 献

- Genco, R.J. and Mergenhausen, S.E., 浜田茂幸 : 歯周病の科学, 医歯薬出版, 東京, 1984, 119-144.
- Daly, C.G., Seymour, G.J. and Kieser, J.B. : Bacterial endotoxin; a role in chronic inflammatory periodontal disease? J. Oral Pathol., 9 : 1-15, 1980.
- 竹内 宏, 堀 泰典, 金久純也, 谷 明, 橋本政明, 佐川寛典 : 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究, 第 5 報, その (4), *Actinomyces* 抽出物接種による歯周組織の障害性. 歯基礎誌, 25 : 31-36, 1983.
- 于世鳳, 堀 泰典, 金久純也, 竹内 宏, 佐藤勝, 並河 勇 : 辺縁性歯周炎と細菌酵素, 第 1 報, Bacterial chondroitinase ABC の歯周組織におよぼす影響. 歯基礎誌, 26 : 1984, 326-331, 1984.
- 浜田茂幸 : 歯周病原性細菌の内毒素と宿主の相互作用 (上). 歯界展望, 70(5) : 1029-1042, 1987.
- 浜田茂幸 : 歯周病原性細菌の内毒素と宿主の相互作用 (下). 歯界展望, 70(6) : 1313-1330, 1987.
- Newman, M.G. : Current concepts of the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodontol., 56 : 734-739, 1985.
- Taubman, M.A. : 歯周疾患と宿主の免疫応答. 歯界展望, 70(2) : 351-358, 1987.
- William, E.P. : 多田富雄 : 基礎免疫学 (上), 東京大学出版社, 東京, 1986, 157-260.
- Clegett, J.A., Engel, D. and Chi, E. : *In vitro* expression of immunoglobulin M and G subclass by murin B lymphocytes in response to a polyclonal activator from *Actinomyces*. Infect. Immun., 29 : 234-243, 1980.
- 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.
- 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-negative bacteria frequently isolated from periodontally diseased sites. J. periodont. Res., 17 : 569-575, 1982.
- Mangan, D.F. and Lopatin, D.E. : *In vitro* stimulation of immunoglobulin production from human peripheral blood lymphocytes by soluble preparation of *Actinomyces viscosus*. Infect. Immun., 31 : 236-244, 1981.
- Mangan, D.F. and Lopatin, D.E. : Polyclonal activation of human peripheral blood B lymphocytes by *Fusobacterium nucleatum*. Infect. Immun., 40 : 1104-1111, 1983.
- Kimura, S., Harada, 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: murin B-cell responses to a purified cell wall moiety of *Actinomyces*. Scand. J. Immunol., 17 : 313-322, 1983.
- 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.
- 17) 原田 泰 : *Actinomyces viscosus* T 14 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.
 - 18) 伊藤博夫 : 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—. 日歯周誌, 29 : 22-36, 1987.
 - 19) 木本雅夫 : リンパ球混合培養反応, 大沢利昭, 永井克孝, 免疫生化学研究法, 東京化学同人, 東京, 1986, 199-206.
 - 20) Hellman, B.D. and Stobo, J.D. : The autologous mixed lymphocyte reaction. Gastroenterology, 83 : 140-141, 1982.
 - 21) Suzuki, J.B., Park, S.K. and Falkler, W.A. : Immunologic profile of juvenile periodontitis. I lymphocyte blastogenesis and the autologous mixed lymphocyte response. J. periodontol. 5 : 453-460, 1984.
 - 22) Tew, J.G., Burmeister, J.A., Palcanis, K.G. and Ranney, R.R. : Spontaneous lymphocyte proliferation and the periodontal status of young adults. J. Periodont. Res., 18 : 534-540, 1983.
 - 23) Ranney, R.R., Devski, B.F. and Tew, J.G. : Pathogenesis of gingivitis and periodontal diseases in children and young adults. Pediatr. Dent., 3 : 89-100, 1981.
 - 24) Seymour, G.J., Boyatzis, S. and Powell, R.N. : The autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR) as a possible indicator of immunoregulation in chronic inflammatory periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 13 : 639-645, 1986.
 - 25) Cole, K.L., Seymour, G.J., Powell, R.N. : Phenotypic and Functional analysis of T-cell extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. J. Periodontol., 58 : 569-573, 1987.
 - 26) 竹内 宏, 田島一範, 渋谷俊昭, 勝谷芳文, 岩山幸雄, 佐藤 勝, 上田雅俊 : 辺縁性歯周炎と免疫機構, 第1報, 歯周炎患者の免疫機構, 成人性歯周炎患者と健康人の末梢血リンパ球の解析. 日歯周誌, 28 : 1054-1062, 1986.
 - 27) 竹内 宏, 山中武志, 土居誠司, 田島一範, 金久純也, 渋谷俊昭, 岩山幸雄, 上田雅俊 : 辺縁性歯周炎と免疫機構, 第2報, 歯周炎患者の免疫機構, 重度進行性歯周炎における末梢血リンパ球の解析. 日歯周誌, 30 : 133-141, 1988.
 - 28) 北川正保 : マウスよりの採血法, 免疫実験操作法 (A), 日本免疫学会, 東京, 1971, 32-33.
 - 29) 木下喜博 : リンパ球の分離比重法, 免疫実験操作法 (A), 日本免疫学会, 東京, 1971, 432-442.
 - 30) Ledbetter, J.A. and Herzenberg, L.A. : Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. Immunol. Rev., 47 : 63-73, 1979.
 - 31) Ledbetter, J.A., Rouse, R.V., Mickleman, H.S. and Herzenberg, L.A. : T cell subsets defined by expression of Lyt-1, 2, 3 and Thy-1 antigens. J. Exp. Med., 152 : 280-290, 1980.
 - 32) Ledbetter, J.A., Evans, R.L., Lipinski, M., Cunningham-Rundles, C., Good, P.A. and Herzenberg, L.A. : Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. J. Exp. Med., 153 : 310-323, 1981.
 - 33) Ledbetter, J.A., Seaman, W.E., Tsu, T.T. and Herzenberg, L.A. : Lyt-2 and Lyt 3 antigens are on different polypeptide subunits linked by disulfide bonds : Relationship of subunits to T cell cytolytic activity. J. Exp. Med., 153 : 1503-16, 1981.
 - 34) Dialynas, D.P., Quan, Z.S., Wall, K.A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M.R., Pierres, M. and Fitch, F.W. : Characterization of the murin T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK 1.5 : Similarity of L3T4 to the human Leu3/T4 molecule. J. Immunol., 131 : 2445-2451, 1983.
 - 35) Dialynas, D.P., Wide, 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 murin antigenic determinant, designated L3T4 a, recognized by monoclonal antibody GK 1.5 : Expression of L3T4 a by functional T cell clones appears to correlate primarily with

- class II MHC antigen-reactivity. Immunol. Rev., 74 : 29-39, 1983.
- 36) Kappler, J., Skidmore, B., White, J. and Marrack, P. : Antigen-inducible, H-2 restricted interleukin-2 producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. J. Exp. Med., 153 : 1198-1208, 1981.
 - 37) Berzofsky, J. and Richman, L. : Genetic control of the immune response to myogloblins. IV. Inhibition of determinant-specific Ir gene-controlled antigen presentation and induction of suppression by pretreatment of presenting cell with anti-Ia antibodies. J. Immunol., 126 : 1898-1908, 1981.
 - 38) Möller, G., ed. : Hybrid myeloma monoclonal antibodies against MHC products. Transplant. Rev., 47 : 10-20, 1979.
 - 39) 佐々木功典 : 免疫学的研究のための染色, 天神美夫, 高橋 学, 野村和弘, フローサイトメトリーハンドブック, サイエンスフォーラム, 東京, 1984, 175-178.
 - 40) 高瀬浩造 : Flow Cytometry を用いた蛍光標識モクローナル抗体染色陽性細胞率の算定方法. 最新医学, 40 (1) : 45-49, 1985.
 - 41) 保井孝太郎 : 単クローン抗体, ハイブリドーマとELISA, 講談社, 東京, 1985, 144-183.
 - 42) 渡辺慶一, 中根一穂 : 酵素抗体法, 学際企画, 東京, 1985, 9-20.
 - 43) Chalet, L. and Wolf, F.S. : The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*. Arch. Biochem. Biophys., 106 : 1-5, 1964.
 - 44) Woods, G.S. and Warnke, R. : Suppression of endogeneous avidin-binding activity in tissue and its relevance to biotin-avidin detection system. J. Histochem. cytochem., 29 : 1196-1204, 1981.
 - 45) Hsu, S.M. and Raine, L. : The use of avidin-biotin-peroxydase complex (ABC) in diagnostic and reseach pathology, In : Advances in Immunohistochemistry, R.A. DeLellis, ed., Mason Publishing USA, Inc., New York, 1984, 31-42.
 - 46) Warnke, R. and Levy, R. : Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: A biotin-avidin-horseradish peroxidase method. J. Histochem. Cytochem., 28 : 771-776, 1980.
 - 47) Theilade, E. : The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 13 : 905-911, 1986.
 - 48) Shenker, B.J. : Immunologic dysfunction in the pathogenesis of periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 14 : 489-498, 1987.
 - 49) Moor, W.E.C. : Microbiology of periodontal disease. J. Periodont. Res., 22 : 335-341, 1987.
 - 50) Slots, J. : Bacterial specificity in adult periodontitis -A summary of work. J. Clin. Periodontol., 13 : 912-917, 1986.
 - 51) Mouton, C., Hamond, P.G., Slots, J. and Genco, R.J. : Serum antibodies to oral *Bacteroides asaccharolyticus* (*Bacteroides gingivalis*) : relationship to age and periodontal disease. Infect. Immun., 31 : 182-192, 1981.
 - 52) Mansheim, B.J., Stenstrom, M.L., Low, S.B. and Clark, W.B. : Measurement of serum and salivary antibody to the oral pathogen *Bacteroides asaccharolyticus* in human subjects. Archs. Oral Biol., 25 : 553-557, 1980.
 - 53) Naito, Y., Okuda, K. and Takazoe, I. : Immunoglobulin G response to subgingival gram-negative bacteria in human subjects. Infect. Immun., 45 : 47-51, 1984.
 - 54) Listgarten, M.A. *et al.* : Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. J. Clin. Periodontol., 8 : 155-164, 1981.
 - 55) Ebersole, J.L. *et al.* : Human immune response to oral micro-organism. I. Association of localized juvenile periodontitis (LJP) with serum antibody responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Clin. Exp. Immunol., 47 : 43-52, 1981.
 - 56) Tai, C.C., McArthur, W.P., Baeni, P.C., Evian, C., Genco, R.J. and Taichman, N.S. : Serum neutralizing activity against *Actinobacillus ac-*

- tynomycetemcomitans* leucotoxin in juvenile periodontitis. J. Clin. Periodontol., 8 : 338-348, 1981.
- 57) Williams, B.L., Ebersole, J.L., Speker, M.D. and Page, R.C. : Assessment of serum antibody patterns and analysis of subgingival microflora of members of a family with a high prevalence or early-onset periodontitis. Infect. Immun., 49 : 742-750, 1985.
 - 58) Zambon, J.J., Christersson, L.A. and Slots, J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J. periodontol., 54 : 707-711, 1983.
 - 59) Okuda, K., Naito, Y., Fukumoto, Y., Kimura, Y., Ishikawa, I., Kinoshita, S. and Takazoe, I. : Bacteriological study of periodontal lesions in two sisters with juvenile periodontitis and their mother. Infect. Immun., 45 : 118-121, 1984.
 - 60) Doty, S.L., Lopatin, D.E., Syed, S.A., Smith, F.N. : Humoral immune response to oral microorganisms in periodontitis. Infect. Immun., 37 : 499-505, 1982.
 - 61) 石川 烈 : 「歯周疾患の診断」 ELISA 法の臨床応用. 日本歯科医師会雑誌, 40 (7) : 785-798, 1987.
 - 62) 岡村和則, 永井 淳, 熊沢 寛, 杉山雅昭, 水島ゆみ, 光田由可, 高芝正悟, 栗原英見, 野村慶雄, 村山洋二 : 歯周病関連細菌に対する血清 IgG 抗体 第2報 歯周病治療に伴う血清 IgG 抗体の変動. 日歯周誌, 29 : 146-100, 1987.
 - 63) 永井 淳, 岡村和則, 小林充治, 横山雅之, 熊沢寛, 杉山雅昭, 栗原英見, 野村慶雄, 村山洋二 : 歯周病関連細菌に対する血清 IgG 抗体 第1報 歯周病の病状と IgG 抗体との相関. 日歯周誌, 29 : 132-145, 1987.
 - 64) 岡田 宏 : 若年性歯周炎をめぐる. 日本歯科医師会雑誌, 40 : 467-473, 1987.
 - 65) Bragd, L., Dahlén, G., Wikström, M. and Slots, J. : The capable of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. J. Clin. Periodontol., 14 : 95-99, 1987.
 - 66) 松岡 直, 中村 弘, 杉浦 勉, 北川常広, 石川栄治, 渡辺 武 : 抗体の調整, 大沢利昭, 永井克孝, 免疫生化学研究法, 東京化学同人, 東京, 1986, 1-10.
 - 67) 松元康治, 大久保慶二, 横山三男 : フローサイトメトリーを用いたヒト末梢血リンパ球膜抗原の分析—正常人の抗原分布について—. 臨床免疫, 16 : 862-872, 1984.
 - 68) 坂戸信夫 : 調節系としての免疫ネットワーク, 臨床免疫 hand book, 日本臨床社, 1984, 14-21.
 - 69) William, E.P. : 多田富雄 : 基礎免疫学 (下), 東京大学出版社, 東京, 1986, 543-671.
 - 70) 小安重夫 : 増殖因子 (インターロイキン) とリンパ球増殖, 今日の免疫学, 南江堂, 東京, 1985, 117-119.
 - 71) 多田富雄, 浜岡利之 : 免疫応答の調節, 岩波書店, 東京, 1984, 15-306.
 - 72) 桃井宏直 : 免疫産生過程とその調節機構, 臨床免疫 hand book. 1984, 162-174.
 - 73) Jeffrey, L. : The immune system in AIDS. 別冊サイエンス, 92-104, 1986.
 - 74) Okada, H., Kassei, Y., Kida, T. : T lymphocyte subsets in the inflamed gingiva of human adult periodontitis. J. Periodont. Res., 19 : 595-598, 194.
 - 75) Seymour, G.J., Powell, R.N. and Davis, W.I. R. : Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease : an hypothesis. J. Clin. Periodontol., 6 : 267-277, 1979.
 - 76) Macker, B.F., Frosted, K.B., Robertson, P.B. and Levy, B.M. : Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cell in human periodontal disease. J. Periodont. Res., 12 : 37-45, 1977.
 - 77) 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.
 - 78) 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, 1983.
 - 79) Okada, H., Kida, T. and Yamagami, H. : Iden-

- tification and distribution of immunocompetent cell in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect. Immun.*, 41 : 365-374, 1983.
- 80) Seymour, G.J., Crouch, M.S., Powell, R.N., Beckman, I., Zole, H., Bradley, J. and Bruns, G.F. : The identification of lymphoid cell subpopulations in sections of human lymphoid tissue and gingivitis in children using monoclonal antibodies. *J. Periodont. Res.*, 17 : 247-256, 1982.
- 81) Cohen, R.L., Alves, M.E.A.F., Ostrega, M.S., Belcaster, G. and Chamber, D.A. : Topographic distribution of Thy-1 positive cell in epithelial tissues of balb/c mice. *Archs. Oral Biol.*, 32 : 11-15, 1987.
-