T細胞除去マウス歯肉への *Escherichia coli* 内毒素注入により 起こる歯槽骨吸収に関する病理組織学的研究

鵜飼 孝 原 宜興 吉村 篤利
珠 玖 洋* 加藤 伊 八

長崎大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任：加藤伊八教授)

*長崎大学医学部腫瘍医学教室

(主任：珠玖 洋教授)

(平成7年6月2日受付)

Histopathological Study of Alveolar Bone Resorption Induced with Injections of *Escherichia coli* Endotoxin into Gingiva of T Cell-depleted Mice

Takashi UKAI, Yoshitaka HARA, Atsutoshi YOSHIMURA,
Hiroshi SHIKU* and Ihachi KATO

Department of Periodontology, School of Dentistry,

(Chief : Prof. Ihachi KATO)

*Department of Oncology, School of Medicine,

(Chief : Prof. Hiroshi SHIKU)

Nagasaki University

1-7-1, Sakamoto, Nagasaki 852, Japan

Alveolar bone resorption induced by repeated injections of *Escherichia coli* (*E. coli*) endotoxin into T cell-depleted murine gingiva was examined histometrically to clarify the influences of T cells on bone resorption. The mice were divided into the following four groups ; normal BALB/c mice treated with PBS (PBS group) and CD 4 and/or CD 8 T cell subset-depleted BALB/c mice treated with anti-CD 4 and/or anti-CD 8 monoclonal antibody (anti-CD 4, anti-CD 8, anti-CD 4+anti-CD 8 group). *E. coli* endotoxin was injected into the gingiva on alternate days. The bone surfaces in contact with osteoclasts were defined as the site of active resorption and bone resorption was evaluated by the ratio

of active resorption. After the seventh injection of endotoxin, the ratios of alveolar bone resorption in the PBS and anti-CD 8 groups were higher than those of anti-CD 4 and anti-CD 4+anti-CD 8 groups. After the thirteenth injection, anti-CD 4 and anti-CD 8 groups showed lower and, conversely, the anti-CD 4+anti-CD 8 group showed a higher ratio than the PBS group. These findings suggest that T cells play an important role in alveolar bone resorption caused by endotoxin and that the effects of T cells, especially CD 4 T cells, on alveolar bone resorption are variable, being either accelerative or suppressive during the course of endotoxin treatment.

Key words : Alveolar bone resorption, Tartrate resistant acid phosphatase, T cell subset, Endotoxin

要旨 : 内毒素による歯槽骨吸収へのT細胞サブセットの影響を明らかにする目的で、歯肉に *Escherichia coli* 内毒素を頻回注入して起こる歯槽骨の吸収状態を病理組織学的に検討した。マウスはモノクローナル抗体投与によりT細胞各サブセットを除去した抗CD4抗体投与群、抗CD8抗体投与群、抗CD4+抗CD8抗体投与群、

本論文の要旨は、第36回秋季日本歯周病学会学術大会（1993年10月16日、東京）、第15回日本炎症学会総会（1994年7月14日、東京）において発表した。

さらにT細胞を除去していないPBS投与群に分けた。そして内毒素7回注入後と13回注入後に、歯槽骨の吸収状態を各群間で比較した。その結果、内毒素7回注入後では抗CD4+抗CD8抗体または抗CD4抗体投与群よりも、抗CD8抗体投与群ならびにPBS投与群の方が骨吸収が強かった。一方13回注入後では、抗CD4+抗CD8抗体投与群よりも抗CD4抗体または抗CD8抗体投与群における骨吸収は弱く、PBS投与群はやや弱い骨吸収が観察された。この結果より、骨吸収におけるCD4⁺およびCD8⁺T細胞の役割は、時期により異なっていると考えられた。

索引用語: 歯槽骨吸収, 酒石酸耐性酸ホスファターゼ, T細胞サブセット, 内毒素

緒 言

歯周病は種々の細菌感染により誘発される。この細菌感染に対して局所に遊走する各種免疫系細胞は、生体防御に働いているばかりでなく、分泌するサイトカインの中に組織破壊に関連するものもある^{1,2)}とされている。実際に破骨細胞の形成や活性化に各種サイトカインが関与しているといわれており^{3~5)}、主たる分泌細胞はマクロファージであると考えられている。しかしIFN- γ を分泌することでマクロファージを活性化するT細胞⁶⁾も、骨吸収に関与し得るのではないかと考えられる。事実HLA-DR抗原を表出したT細胞が歯周疾患罹患歯肉に存在してサイトカインを産生したり⁷⁾、あるいは病態の進行によってCD4⁺およびCD8⁺T細胞の比が変化している⁸⁾点など、歯周疾患の進行にT細胞が関与していると考えられる多くの報告がある。

教室の井村ら⁹⁾はT細胞の欠損したヌードマウスを、岩崎ら¹⁰⁾はTおよびB細胞の欠損したSCIDマウスを用いて、歯肉に*Escherichia coli* (*E. coli*) 内毒素を経時的に頻回注入すると、それらのマウスでは正常マウスに比較して骨吸収の開始が遅延していたと報告した。しかしこれらは先天的にT細胞が欠如しているマウスを用いているため、得られた結果はT細胞欠損に起因するのか、あるいはマクロファージ、ナチュラルキラー細胞等の機能も変化している¹¹⁾ためなのかは明らかでない。またT細胞は主にヘルパー/インデューサーT細胞とされるCD4陽性細胞、キラー/

サプレッサーT細胞とされるCD8陽性細胞の各サブセットに分けられる。これら細胞は異なる機能を持ち、分泌するサイトカインにより相互に調整合っている。そこで歯槽骨吸収に対する各T細胞サブセットの関与を明らかにする目的で、正常マウスにCD4, CD8に対するモノクローナル抗体(mAb)を投与して各T細胞サブセットを除去し、歯肉に内毒素を注入して起こる歯槽骨の吸収状態を病理組織学的に比較検討した。

材料および方法

1. 実験動物

実験にはSPF (specific pathogen free) 環境下で飼育した8週齢の雄性BALB/cマウスを55匹用いた。

2. モノクローナル抗体ならびにT細胞サブセットの除去

T細胞の各サブセットの除去にはラット抗マウスL3T4 (CD4) モノクローナル抗体 (GK1.5)¹²⁾、マウス抗マウスLyt-2.2 (CD8) モノクローナル抗体 (19/178)¹³⁾を用いた。これらは長崎大学医学部腫瘍医学教室より供与を得た。抗体はEagle MEMにて8倍に希釈し、エーテル麻酔下で眼窩下静脈より一匹あたり200 μ l ずつ1, 3, 15, 22日目の合計4回投与し、CD4⁺, CD8⁺各T細胞を除去した(図1)。除去状態は第2回抗体投与翌日、第3回ならびに第4回抗体投与前日、さらに内毒素7回または13回注入後の屠殺時にYOSHIMURAら¹⁴⁾の報告に従い、脾

図1 実験スケジュール

内毒素を48時間ごとに注入し、7回、13回注入後に各群5匹ずつ屠殺した。

細胞を用いた FACSscan 解析により確認した。また実験期間中、各群マウスの体重変動に違いは認められなかった (結果不掲載)。

3. FACSscan 解析

摘出した脾臓を細胞単位に分離後遠心操作により赤血球を除去し、細胞を 2% FCS 添加 PBS に浮遊させた。細胞は 5 倍希釈の PE 標識抗 L3T4 抗体 (GK1.5, Becton Dickinson), FITC 標識抗 Lyt-2 抗体 (53-6.7, Becton Dickinson) を用いて、それぞれ 4°C にて 30 分間二重染色した後 PBS で洗浄して、PBS に再浮遊させた。解析は FACSscan (Becton Dickinson) およびコンソート 30 ソフトウェアにより contour graph にて解析を行った。ゲートにより解析細胞はリンパ球分画のものとし、解析には 10000 個の細胞を用いた。

4. 試料作製

マウスを抗 CD4 または抗 CD8 モノクローナル抗体、あるいはその両方を投与して T 細胞の各サブセットを除去した群 (抗 CD4 抗体投与群, 抗 CD8 抗体投与群, 抗 CD4+抗 CD8 抗体投与群) と、抗体の代わりに PBS を投与した群 (PBS 投与群) の 4 群に分けた。

井村らの方法⁹⁾を参考に、各群のマウスの左側下顎第一臼歯近心歯肉に、*E. coli* 内毒素 (Difco) 5 μ g (5 μ g/3 μ l, PBS) を 30 G 針のマイクロシリンジを用いて注入した。注入は 2 回目の各サブセットに対するモノクローナル抗体投与の翌日から 48 時間おきに行った。そして正常マウスに対する内毒素連続注入によって破骨細胞の出現が始まる 7 回注入、ならびに吸収程度の強かった 13 回注入 24 時間後に各群 5 匹ずつ屠殺し、左側下顎を摘出した (図 1)。摘出した組織は 4% パラホルムアルデヒド固定液で 4°C にて 6 時間固定後、10% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 脱灰溶液で 4°C にて約 1 週間脱灰し、AMeX 法¹⁵⁾によりパラフィン包埋を行った。このブロックから可及的に下顎第一臼歯の近遠心的縦断面と、近心部歯槽骨が観察できるような 4 μ m の連続切片を作製した。各群の対照としては、歯肉に PBS のみを注入したマウスを用いた。またモノクローナル抗体投与も、内毒素注入も行っていない無処置群を作製し、正常状態での歯槽骨の状態も観察した。

5. 組織化学的染色

薄切した切片は、破骨細胞を同定するために 5 枚おきに井村らの方法⁹⁾を参考にして酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TrAP) 染色を行った。すなわち naphthol AS-BI phosphate (Sigma) 100 mg と N, N-Dimethylformamide (WAKO) 10 ml より調整し

図 2 骨面の組織学的計測方法

図は TrAP 陽性多核細胞と骨面を表している。吸収の有無に関わらず、TrAP 陽性多核細胞が接した骨面を活性吸収面とした。

●: 活性吸収面, ○: その他の面

た基質液 4 ml に、0.1 mol/l 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 71.2 ml ならびに hexazotized pararosanilin 液 4.8 ml を加えた後、100 mM の L (+)-tartaric acid を加えた。そして NaOH にて pH 5.1 に調整して反応液を作製した。この反応液を用いて 37°C で 45 分間反応させた後水洗し、メチルグリーンにて核染した。またその他の切片については、骨表面の状態を観察するためにヘマトキシリン、エオジン (H.E.) 染色を行った。

6. 骨吸収の組織学的計測

H.E., TrAP 染色標本を用いて、多核で TrAP 活性を持った細胞を破骨細胞として、骨吸収の状態を顕微鏡観察した。骨吸収の測定部位は、内毒素注入部位である左側下顎第一臼歯近心歯槽骨前縁とし、骨面の状態を TrAP 陽性多核細胞の接した骨面 (活性吸収面¹⁶⁾) とその他の骨面に分類した。そして顕微鏡拡大視野内で、接眼レンズ内に入れた 25 μ m 間隔のマイクロメーターと骨表面とが交差する全交点に占める活性吸収面の割合¹⁷⁾を計測した (図 2)。全交点数は各群すべて約 1,000 以上、1,200 以下であった。

7. 統計処理

Bartlett test で有意水準 0.05 で分散の均一性が確認されたので、活性吸収面の計測結果は Bonferroni/Dunn の多重比較検定を行った。検定は 7 回、13 回各投与群内で行い、有意水準は 0.05 とした。

結 果

1. FACSscan 解析の結果

解析に用いた 10,000 個の細胞中に占める各サブセットの存在率を調べたところ内毒素 7 回注入後では

図3 内毒素7回注入PBS投与群
骨面に接した多数の多核細胞が認められる。
(H.E. 染色 ×560)

図4 内毒素7回注入抗CD4抗体投与群
線維性の骨膜は喪失しているものの骨面は滑らかで破骨細胞は認められない。(H.E. 染色 ×560)

PBS投与群 (CD4, CD8) = $(18.31 \pm 1.5, 9.09 \pm 1.1)$, 抗CD4抗体投与群 = $(0.24 \pm 0.09, 11.04 \pm 2.9)$, 抗CD8抗体投与群 = $(19.04 \pm 0.2, 0.19 \pm 0.05)$, 抗CD4+抗CD8抗体投与群 = $(0.25 \pm 0.09, 0.18 \pm 0.05)$ となっていた。また第2回抗体投与翌日, 第3回ならびに第4回抗体投与前日, さらに内毒素13回注入後でも同様の結果であった。これより本実験期間中各T細胞サブセットが除去されていたことが確認された。

2. 組織所見

無処置マウスの歯槽骨表面には破骨細胞は存在せず, 骨面は滑らかで線維性の骨膜を認めた。また対照として歯肉にPBSのみを注入した群ではわずかな炎

図5 内毒素13回注入PBS投与群
所々に深い吸収窩の存在する強い骨面の不整が見られ, 多数の多核細胞が存在している。(H.E. 染色 ×560)

症性細胞浸潤を認めるのみで, 骨吸収は観察されなかった。

1) 内毒素7回注入後

PBS投与群では, 骨膜は不明瞭で骨面は不整になっており, 骨面に接して多数のTrAP陽性多核細胞が存在していた(図3)。また, 抗CD8抗体投与群における骨吸収の状態もこれとほぼ同様であった。

抗CD4抗体投与群でも骨膜は不明瞭で骨面の一部に不整を認めたが, PBS投与群に比べその割合はごく小さく, かつTrAP陽性多核細胞はほとんど存在していなかった(図4)。また抗CD4+抗CD8抗体投与群でも, ほぼ同様の所見が得られた。

2) 内毒素13回注入後

PBS投与群では, 7回注入時に比べて骨面の不整はさらに強く, 多数の深い吸収窩とTrAP陽性多核細胞を認めた(図5)。

抗CD4抗体投与群では, わずかにTrAP陽性多核細胞が存在するものの7回注入時同様比較的滑らかな骨面が観察された。

抗CD8抗体投与群において見られる骨面は不整であったが, その範囲はPBS投与群に比較して狭いようであった。また骨面には少数のTrAP陽性多核細胞が存在し, 破骨細胞の存在しない吸収窩が多数観察された(図6)。

抗CD4+抗CD8抗体投与群では, 7回注入時に比べると骨面の不整はかなり強かった。またその範囲は13回注入時のPBS投与群と同程度であったが, 吸収窩は浅く, より多数の破骨細胞が存在していた(図7)。

図 6 内毒素 13 回注入抗 CD 8 抗体投与群
浅い吸収窩が観察されるが、少数の多核細胞が存在するのみである。(H.E. 染色 ×560)

図 7 内毒素 13 回注入抗 CD 4 + 抗 CD 8 抗体投与群
骨面は不整になっており、骨面に接した多数の多核細胞が存在している。(H.E. 染色 ×560)

3. 組織計測所見

全計測面に対する活性吸収面の占める割合の平均値をグラフに示す。

7 回注入後では、PBS 投与群で 4.59% であるのに対して抗 CD 4 抗体投与群で 0.97%、抗 CD 8 抗体投与群で PBS 投与群とほぼ同程度の 4.71%、抗 CD 4 + 抗 CD 8 抗体投与群で 1.7% であった (図 8)。抗 CD 4 + 抗 CD 8 抗体投与群と他の群との間に統計学的有意差は認められなかったが、データ上からも観察標本上からも PBS 投与群ならびに抗 CD 8 抗体投与群の方が活性吸収面の割合が高い傾向が認められた。また 13 回注入後では、PBS 投与群で 3.23% であったが、抗 CD 4 抗体投与群では 0.76%、また抗

図 8 内毒素 7 回注入後の活性吸収面の割合
グラフは活性吸収面の割合の平均値を示している。PBS 投与群、抗 CD 8 抗体投与群の割合は、抗 CD 4 抗体投与群、抗 CD 4 + 抗 CD 8 抗体投与群の割合よりも高くなっていた。

* $p < 0.05$

図 9 内毒素 13 回注入後の活性吸収面の割合
グラフは活性吸収面の割合の平均値を示している。抗 CD 4、CD 8 抗体投与群の割合は PBS 投与群よりも低く、反対に抗 CD 4 + 抗 CD 8 抗体投与群の割合は PBS 投与群よりも高くなっていた。

** $p < 0.05$

CD 8 抗体投与群では 1.61% と低く、逆に抗 CD 4 + 抗 CD 8 抗体投与群では 4.96% と高かった (図 9)。抗 CD 4 + 抗 CD 8 抗体投与群と抗 CD 4 抗体および抗 CD 8 抗体投与群の間に統計学的有意差が認められた。

考 察

辺縁性歯周炎においてみられる歯槽骨吸収には免疫系の細胞も関与するといわれるが、その機序について

は明らかではない。そこで今回は、各種サイトカインを分泌することで免疫系を調節するT細胞の歯槽骨吸収への関与を検討するため、T細胞の各サブセットを除去して、内毒素を歯肉に注入した際に起こる歯槽骨吸収の状態を病理組織学的に観察した。

今回の実験で用いたTrAP染色とグリッドを併用する方法は、単に破骨細胞の数を計測することに比べて骨吸収の状態をより客観的に評価することができる。ただし過去に起こっている骨吸収の総和を組織学的に評価することは困難なので、標本作製時点での骨吸収活性を示す¹⁸⁾活性吸収面の割合をもって評価することにした。またT細胞の存在しない状態(抗CD4+抗CD8抗体投与群)で起こる骨吸収を基準とし、いずれかのサブセットが存在した場合(抗CD4抗体投与群または抗CD8抗体投与群)、あるいは両者が存在した場合(PBS投与群)の骨吸収と比較し、T細胞あるいはそのサブセットの骨吸収における役割を考察した。

内毒素7回注入後を見ると、CD8⁺T細胞のみが存在する場合には(抗CD4抗体投与群)、活性吸収面の割合がT細胞の存在しない場合(抗CD4+抗CD8抗体投与群)と大差なかった。このことは、CD8⁺T細胞がこの時期にはあまり骨吸収に関連していないことを表しているものと考えた。しかしこれとは対照的に、CD4⁺T細胞のみが存在すると(抗CD8抗体投与群)、活性吸収面の割合はT細胞の存在しない場合よりも高く、CD4⁺T細胞は骨吸収に対して促進的に働いていると考えられた。そしてT細胞が存在すると(PBS投与群)、活性吸収面の割合がT細胞の存在しない場合(抗CD4+抗CD8抗体投与群)よりも高かったのは、CD4⁺T細胞の影響の大きさをあらわしているのであろうと考えた。実際LPS投与により活性化されたマクロファージはIL-1などのT細胞活性化作用を持つサイトカインを分泌する。マクロファージによる抗原提示ならびに、これらサイトカインによりT細胞は活性化されIL-2、IL-4その他多くのサイトカインを分泌する。CD4⁺T細胞に関しては、IL-3¹⁹⁾、リンホトキシン²⁰⁾、IFN- γ ⁶⁾など破骨細胞やマクロファージを活性化するサイトカインを産生する。そして活性化されたマクロファージはIL-1、TNF- α を分泌して破骨細胞を活性化する²¹⁾といわれており、本実験系において起こる骨吸収の初期には、これらのサイトカインが重要なかもしれない。またこの結果は、我々が過去に報告しているヌードマウス⁹⁾あるいはSCIDマウス¹⁰⁾においてみられた所見と共通しているように思われる。

次に内毒素13回注入後では、いずれか一方のサブ

セットが存在すれば(抗CD4抗体投与群または抗CD8抗体投与群)、T細胞の存在しない群(抗CD4+抗CD8抗体投与群)よりも活性吸収面の割合は低くなっていた。これはCD4⁺およびCD8⁺の両者共にT細胞が関与せずに起こる骨吸収(抗CD4+抗CD8抗体投与群で起こる骨吸収)に対して抑制的に働くことを表していると思われる。ここでCD4⁺T細胞の骨吸収への抑制効果という点、前述した7回注入後の促進効果と矛盾するように思われるかもしれない。しかしCD4⁺T細胞をTh-1またはTh-2 T細胞とに分けて考え、各々の産生するサイトカインの機能から考察すれば、説明が不可能というわけではない。すなわち破骨細胞やマクロファージ活性化に対して促進的に働くこととされるIL-3¹⁹⁾、IFN- γ ⁶⁾はTh-1 T細胞が産生する²²⁾といわれており、破骨細胞やマクロファージ活性化に対し抑制的に働くこととされるIL-4²³⁾、IL-10²⁴⁾はTh-2 T細胞が産生する²²⁾といわれている。また炎症の初期にはTh-1 T細胞が優勢で徐々にTh-2 T細胞に移行するという報告²⁵⁾を参考にすると、骨吸収の初期ではTh-1 T細胞がIL-3、IFN- γ を産生して骨吸収に促進的に、そしてある程度の期間の経過とともにTh-2 T細胞がIL-4、IL-10を産生して抑制的に働くのではないだろうか。一方CD8⁺T細胞の機能は本来抑制的であるとされており、破骨細胞あるいはマクロファージに対して抑制的に働く^{23,26)}ことで骨吸収を調整している可能性が高い。最後にT細胞が存在すると(PBS投与群)、T細胞が存在しない場合(抗CD4+抗CD8抗体投与群)よりは低いものの、いずれか一方のサブセットが存在する場合(抗CD4抗体投与群または抗CD8抗体投与群)よりも活性吸収面の割合が高かった。これは、CD8⁺T細胞の抑制効果がCD4⁺T細胞にまで及んだ²⁷⁾ため、CD4⁺T細胞の抑制効果が減弱したためではないかと考えた。Yoshieら²⁸⁾は、ヌードラットで4カ月以上の長期観察を行うと正常ラットよりも骨吸収が強かったと述べている。これは本実験の13回注入群において、T細胞が存在しない方が(抗CD4+抗CD8抗体投与群)、正常(PBS投与群)よりも吸収が強かったことと類似の現象のように思える。

以上よりCD4⁺T細胞は*E. coli*内毒素による骨吸収の開始時期には吸収に対して促進的に働き、その後抑制的作用が大きくなると考えられた。一方、CD8⁺T細胞はCD4⁺T細胞やその他の細胞の調節に関与していると考えられた。今後骨吸収の程度と、吸収に関係するサイトカインの分泌ならびにその産生細胞の動態との関係を明らかにし、これら現象の詳細な機構

を検討していく予定である。

結 論

E. coli 内毒素注入による歯槽骨吸収におけるT細胞の関与を検討するため、モノクローナル抗体投与によりCD4⁺、CD8⁺T細胞を除去したマウスの歯肉に内毒素を7回または13回注入し、歯槽骨吸収状態を病理組織学的に観察した。その結果以下の結論を得た。

1. 内毒素7回注入後では、CD4⁺T細胞が存在することで骨吸収は促進されていたが、CD8⁺T細胞の骨吸収への影響は小さかった。

2. 内毒素13回注入後では、CD4⁺、CD8⁺T細胞存在による歯槽骨吸収の状態は7回注入後と異なっていた。すなわちどちらか一方のみ存在する場合は、各サブセットは骨吸収に抑制的に働いており、両サブセットとも存在する場合の骨吸収は単一サブセットのみが存在する場合よりやや強くなっていた。

謝 辞

本実験において動物の飼育をしていただいた長崎大学医学部附属動物実験施設職員の皆様に感謝の意を表します。

なお、本研究の一部は、平成5、6年度文部省科学研究費補助金一般研究(B)(課題番号05454519)の援助によって行われたことを付記する。

文 献

- 1) Smith, D.D., Gowen, M. and Mundy, G.R. : Effects of interferon- γ and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone cultures. *Endocrinol.*, 120 : 2494-2499, 1987.
- 2) Kurihara, N., Bertolini, D., Suda, T., Akiyama, Y. and Roodman, G.D. : IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J. Immunol.*, 144 : 4226-4230, 1990.
- 3) Feldner, B.D., Reinhardt, R.A., Garbin, C.P., Seymour, G.J. and Casey, J.H. : Histological evaluation of interleukin-1 β and collagen in gingival tissue from untreated adult periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 29 : 54-61, 1994.
- 4) Matsuki, Y., Yamamoto, T. and Hara, K. : Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA) -expressing cells in human inflamed gingiva by combined *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*, 76 : 42-47, 1992.
- 5) Jandinski, J.J., Stashenko, P., Feder, L.S., Leung, C.C., Peros, W.J., Rynar, J.E. and Deasy, M.J. : Localization of interleukin-1 β in human periodontal tissue. *J. Periodontol.*, 62 : 36-43, 1991.
- 6) Kelso, A. and Glasebrook, A.L. : Secretion of interleukin 2, macrophage-activating factor, interferon, and colony-stimulating factor by alloreactive T lymphocyte clones. *J. Immunol.*, 132 : 2924-2931, 1984.
- 7) Reinhardt, R.A., McDonald, T.L., Bolton, R.W., DuBois, L.M., Feely, D.E. and Kaldahl, W.B. : *In situ* activated T lymphocytes in active versus stable periodontal lesions. *J. Periodont. Res.* 23 : 295-302, 1988.
- 8) Meng, H.X. and Zheng, L.F. : T cells and T-cell subsets in periodontal diseases. *J. Periodont. Res.* 24 : 121-126, 1989.
- 9) 井村憲二, 原 宜興, 加藤伊八 : 内毒素による歯肉の炎症と破骨細胞形成への免疫系の関与についての病理組織学的研究. *日歯周誌*, 35 : 625-637, 1993.
- 10) 岩崎由佳, 原 宜興, 加藤伊八 : 歯槽骨吸収における免疫系の関与についての病理組織学的研究—SCID マウス歯肉への内毒素投与による変化—. *日歯周誌*, 36 : 571-577, 1994.
- 11) Su, H.C., Ishikawa, R. and Biron, C.A. : Transforming growth factor- β expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude, and SCID mice. *J. Immunol.*, 151 : 4874-4890, 1993.
- 12) 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 murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5 : similarity of L3T4 to the human leu-3/T4 molecule. *J. Immunol.*, 131 : 2445-2451, 1983.
- 13) Nakayama, E. and Uenaka, A. : Effect of *in vivo* administration of Lyt antibodies. Lyt phenotype of T cells in lymphoid tissues and blocking of tumor rejection. *J. Exp. Med.*, 161 : 345-355, 1985.
- 14) Yoshimura, A., Shiku, H. and Nakayama, E. : Rejection of an IA⁺ variant line of FBL-3 leukemia by cytotoxic T lymphocytes with CD4⁺ and CD4⁻CD8⁻ T cell receptor- $\alpha\beta$ phenotypes generated in CD8-depleted C57BL/6 mice. *J. Immunol.*, 150 : 4900-4910, 1993.
- 15) Sato, Y., Mukai, K., Watanabe, S., Goto, M. and Shimozato, Y. : The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am. J. pathol.*, 125 : 431-435, 1986.

- 16) Baroukh, B. and Saffar, J.L. : Identification of osteoclasts and their mononuclear precursors. A comparative histological and histochemical study in hamster periodontitis. J. Periodont. Res. 26 : 161-166 1991.
- 17) 池田康男, 原 宜興, 加藤伊八 : *Porphyromonas gingivalis* 由来のリポ多糖が誘発するマウス歯肉ならびに歯槽骨吸収に関する病理組織学的研究. 日歯周誌, 36 : 519-530, 1994.
- 18) McMillan, P.J., Dewri, R.A., Joseph, E.E., Schultz, R.L. and Deftos, L.J. : Rapid changes of light microscopic indices of osteoclast-bone relationships correlated with electron microscopy. Calcif. Tissue. Int. 44 : 399-405, 1989.
- 19) Barton, B.E. and Mayer, R. : IL-3 induces differentiation of bone marrow precursor cells to osteoclast-like cells. J. Immunol., 143 : 3211-3216, 1989.
- 20) Thomson, B.M., Mundy, G.R. and Chambers, T. J. : Tumor necrosis factors α and β induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. J. Immunol., 138 : 775-779, 1987.
- 21) Stashenko, P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L. and Ago, J.M. : Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. J. Immunol., 138 : 1464-1468, 1987.
- 22) Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. : Th-1 and Th-2 cells : Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann. Rev. Immunol., 7 : 145-173, 1989.
- 23) Watanabe, K., Tanaka, Y., Morimoto, I., Yahata K., Zeki, K., Fujihira, T., Yamashita, U. and Eto, S. : Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. Biochem. Biophys. Res. commun., 172 : 1035-1041, 1990.
- 24) Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosman T.R., Howard, M. and O'garra, A. : IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immunol., 147 : 3815-3822, 1991.
- 25) Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L. and Locksley, R.M. : Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J. Exp. Med., 169 : 59-72, 1989.
- 26) Seder, R.A., Boulay, J.L., Finkelman, F., Barbier, S., Ben-sasson, S.Z., Gros, G.L. and Paul, W.E. : CD 8⁺ T cells can be primed *in vitro* to produce IL-4. J. Immunol., 148 : 1652-1656, 1992.
- 27) Kemeny, D.M., Noble, A., Holmes, B.J. and Diaz-Sanchez, D. : Immune regulation : A new role for the CD 8⁺ T cell. Immunol. Today, 15 : 107-110, 1994.
- 28) Yoshie, H., Taubman, M.A., Ebersole, J.L., Smith, D.J. and Olson, C.L. : Periodontal bone loss and immune characteristics of congenitally athymic and thymus cell-reconstituted athymic rats. Infect. Immun., 50 : 403-408, 1985.

連絡先 :

長崎大学歯学部歯科保存学第二講座

〒 852 長崎市坂本 1 丁目 7 番 1 号