The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	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
Author(s)	伊藤, 博夫
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35341
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

T細胞による多クローン性B細胞活性化の修飾
ー特に、多クローン性IgG産生の増強についてー

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）

6

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

Hiro-o ITO

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

(Chairman: Prof. Hiroshi OKADA)

Using murine splenic B and T cell populations, it was investigated *in vitro* how T cells effects on T cell-independent polyclonal B cell activation(PBA) induced by sonic extract from *Actinomyces viscosus* T14V(Av. sup) and lipopolysaccharide(LPS) from *Escherichia coli*. 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 directly activated by polyclonal B cell activators.

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

要旨：Actinomyces viscosus T14V株の超音波破砕上液（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）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[11-17,63]。例えばEngelら[11]は、Actinomyces viscosusの

ガラスビーズ破砕上液（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[18]。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[3,4,18-20]、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[21-24]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[25-28]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様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[17]の方法に従った。すなわち、菌体をを超音波処理(20kc/sec, 4℃, 20min)し、5000xgで、4℃, 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し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[17]。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[29]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ペトリ皿に、3mlの細胞浮遊液($1x10^7$cells/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/inducerT細胞とsuppressor/cytotoxicT細胞に分画した。helper/inducerT細胞を認識するmoAbとして、抗L3T4moAb[30] (clone GK1.5, Dr. F. W. Fitch, University of Chicagoより恵与された)、suppressor/cytotoxicT細胞を認識するために抗Lyt-2.2moAb

(NEN, Boston, Mass.)を用いた。なお、suppressor/cytotoxicT細胞の分離に際しては、抗L3T4moAb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L3T4moAb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 Labolatories, Irving, Scotland)を10%, 2-mercaptoethanol(2ME)5×10^{-5} M, ペニシリン100U/ml, ストレプトマイシン100μg/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℃、湿度97%、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5x10⁴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=10μg/ml)を使用した。

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 immunoplateI, Nunc, Roskilde, Denmark)に、抗マウスIgG(4μg/well)または抗マウスIgM(3μg/well)を吸着(4℃, 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（1mg/mlの濃度になるように10% diethanolamine緩衝液，pH9.8に融解したparanitrophenylphosphate-2Na，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405nm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、これから培養上清中の各Ig量を算出した。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-1X(日本分光工業,八王子)を用いた。レーザー光源は、4Wアルゴンイオンレーザー(NEC,東京)を波長488nm,500mW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488nmで励起され、それぞれ、530nmと630nm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[31]。すなわち、575nmのshort-pass dichroic mirrorで緑色及び赤色の蛍光を分離後、更に530nmの狭帯域フィルターで緑色の蛍光を、又は600nm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する、いわゆるcompensationという操作を行った。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、compensation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

Zeile[32]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, CA)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、1well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は24 wellsのカルチャープレート(Corning)を用い、96wells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[33]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L3T4moAbを、2次抗体に、FITC標識抗ラットIgG抗体(TAGO Inc., Burlingame, CA)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(200μg/ml,Sigma; 4℃,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 34-5-3s, Litton Bionetics Inc., Charleston, SC)を、2次抗体にFITC標識抗マウスIgG抗体(Fc portion specific, Capel)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℃,30分間行った。更にPI(20μg/ml)で死細胞を染色して(4℃,5min)、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($1x10^5$/well)を、PBA物質(Av.sup=1/256, LPS=10μg/ml)あるいはCon A(2μg/ml)と共に3日間マイクロカルチャープレート(96wells, 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(^{3}H-TdR, NEN)0.5μCi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^{3}H-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5x10^{6} cells/mlに浮遊した細胞を、50 μg/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℃，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（2x10^{5}cells/well）を、MMCで処理したＢ細胞（2x10^{5}cells/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^{3}H-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℃で、もしくはPBAの非存在下にて4℃または37℃で、20時間培養を行った。

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[17,34,35]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（5×10^4cells/well）をT細胞の存在下（2.5～20×10^4cells/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（$P<0.05$）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産生を増強する様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、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）。

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細胞画分に分画した。この様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、この様な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、どの様なサブポピュレーションに属するのかを検索した。

精製T細胞を、材料と方法に示したように、helper/inducerT細胞とsuppressor/cytotoxicT細胞に分画して、PBA反応系に添加した。その結果（図4）、helper/inducerT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/cytotoxicT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出来なかった。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/inducerT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/inducerT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(2μg/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で刺激した場合には、L3T4抗原陰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。

そこで次に、T細胞の活性化機構について、

検討を行った。

5．抗L3T4moAbによるT細胞機能の阻害

抗L3T4moAbを培養液中に添加（0.5μg/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事が必要で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抗原に応答する様な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の刺激下で培養（20時間、37℃）を行うことによって、表面Ia抗原量は、無刺激で同様に培養したもの、或は、4℃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[38]からであるが、本実験に使用したlotのFCSは、それのみで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抗原の総量がかなり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抗原量が増加することから、活性化B細胞は自己反応性T細胞をより強く活性化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℃，

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、より強いT細胞の増殖を誘導する事が明らかになった（表2）。

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[11,17]。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[17]、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、この様な記憶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$^+$やsIgA$^+$細胞が相当の割合で存在し[39]、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]。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、18]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い出している[18]。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[25-28]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産生を増強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の、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細胞を分画してこれ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[40]、しかもこれを単離し、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

ブ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[16]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活性におけるT細胞の関与について検討したが、彼らの結果はT細胞がIgG産生を調節する可能性については何の示唆も与えない。さらに彼らの言うように、ヒトリンパ球のPBA反応にはhelperT細胞の関与が必須であるならば、これと同じ表面マーカーを持つことが予想される、Igアイソタイプの発現を調節する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Escherichia coliのLPSで、他の一つは歯周病関連細菌であるActinomyces viscosus T14V株の超音波破砕上液(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に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/inducerT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、この抗原認識レセプターを抗L3T4moAb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L3T4moAbの0.5μg/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様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[41]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10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[36]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Leu3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[38,47-52]。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クラスのIg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産生が見ら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 cell[25]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陽性細胞に対して特異的に細胞融解を起こす事によるものであった[38]。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Claybergerらのクローンで示された様に、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Igs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/cyto-toxic 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suppressorT細胞が関与しない、helper/inducerT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、この様な事は、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[38]、自己反応性T細胞クローンの自己のIa抗原陽性細胞を融解する能力が、irradiation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（図8）事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）にも関わらず、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、suprressor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おり、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suprressor 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[38,54,55]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、刺激細胞に由来する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、どの様な機序でPBAを修

飾するものかも、大きな研究課題である。現在我々は、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[27]は、LPSによって刺激されたB細胞のIgG$_1$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の様に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、この様な活性の本体を、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様に、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[40]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fibroblastもT細胞由来のγ-インターフェロン(IFNγ)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の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、或は、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細胞を活性化する事によって産生されるB細胞活性化因子やIFNγによる、新たなB細胞の活性化やfibroblastのIa抗原の発現が考えられ、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様な、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の系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、試薬の調達等に際しまして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、並びに教室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。

(1). Mackler, 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）－蛍光抗原法（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 periodontium. 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 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). 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 T14V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，27：83-98，1985．

(18). Okada, H., Kassai, Y., Kida, T. : T lymphocyte subsets in the inflamed gingiva of human adult periodontitis. J. Periodont. Res. 19: 595-598, 1984.

(19). 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.

(20). 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.

(21). Goodman, M.G. and Weigle, W.O. : T cell regulation of polyclonal B cell responsiveness, 1. Helper effects of T cells. J. Immunol.,122: 2548-2553, 1979.

(22). 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.

(23). 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.

(24). 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.

(25). Rosenberg, Y.J. : Isotype-specific T cell regulation of Immunoglobulin expression. Immunological Rev., 67: 33-58, 1982.

(26). Martinez-Alonso, C. and Coutinho, A. : Immunoglobulin 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.

(27). 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.

(28). 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 wmaturation factors. Eur. J. Immunol., 13: 269-272, 1983.

(29). Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 2844-2848, 1978

(30). 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.

(31). 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.

(32). Zeile, G. : Intracytoplasmic Immunofluorescence in multiple myeloma. Cytometry, 1: 37-41, 1980.

(33). 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.

(34). 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.

(35). Scher, I. : CBA/N immune defective mice: evidence for the failure of a B cell subpopulation to be expressed. Immunol. Rev., 64: 117-136, 1982.

(36). Weksler, M.E., Moody, C.E., and Kozak, R.W. : The autologous mixed-lymphocyte reaction. Adv. Immunol., 31: 271-312, 1981.

(37). Monroe, J.G. and Cambier, J.C. : Level of mIa expression on mitogen-stimulated murine B lymphocytes is dependent on position in cell cycle. J. Immunol., 130: 626-631, 1983.

(38). Clayberger C, Dekruyff RH, 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.

(39). 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.

(40). 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.

(41). Katz, D.H., Hamaoka, T. and Benacerraf, B. : Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. J. Exp. Med., 137: 1405-1418, 1973.

(42). Hausman, P.B. and Stobo, J.D. : Specificity and function of a human autilogous 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., 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. VII. 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.

63) Kimura, S., Hamada, S., Torii, M. et al. 1983. 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.

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 cells/well)をA) Av. sup (1/256), B) LPS (10μg/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には —△—: 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)

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 cells/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^{3}H-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。

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(5×10^{-4} cells/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。

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)，全脾細胞とConA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Ab、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。

図6　L3T4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)Ab.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(X軸)と相対的細胞数(Y軸)

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 cells / well）をT細胞と共にA) Av、sopまたはB) LPSで刺激し、この時培養液中に最終濃度0.5 μg/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。

図8　MMC処理がT細胞のタクローン性IgG産生増強能に及ぼす影響

B細胞（5×10^4 cells / 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）

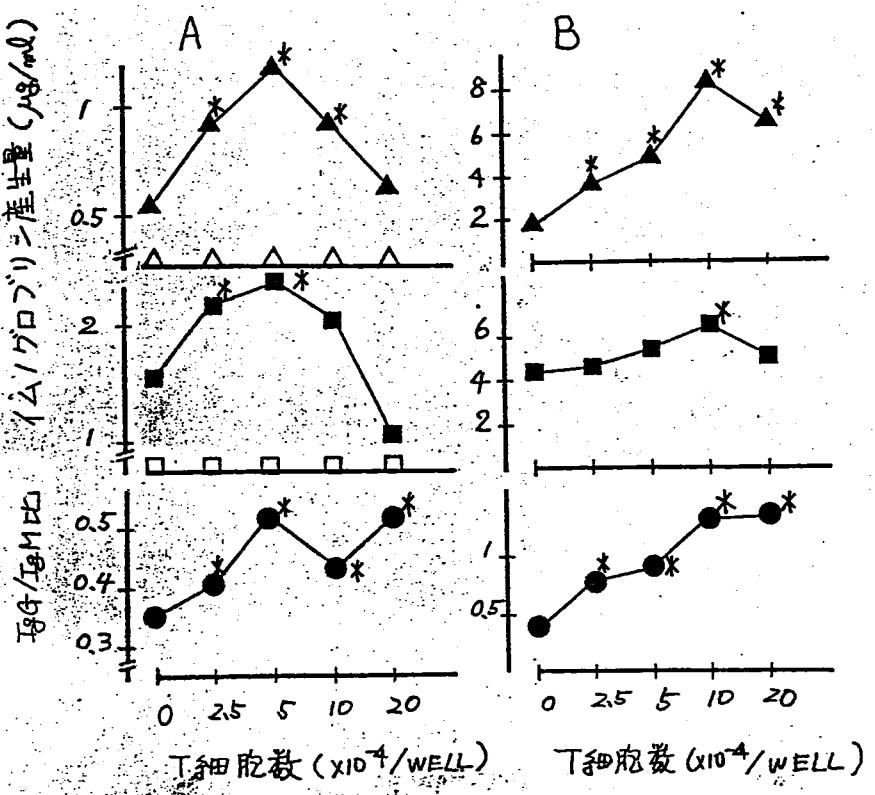
A
B
イムノグロブリン産生量 (μg/ml)
IgG/IgM比
T細胞数 (x10⁻⁴/WELL)
T細胞数 (x10⁻⁴/WELL)
0
2.5
5
10
20

図1. (以下別紙に記載)

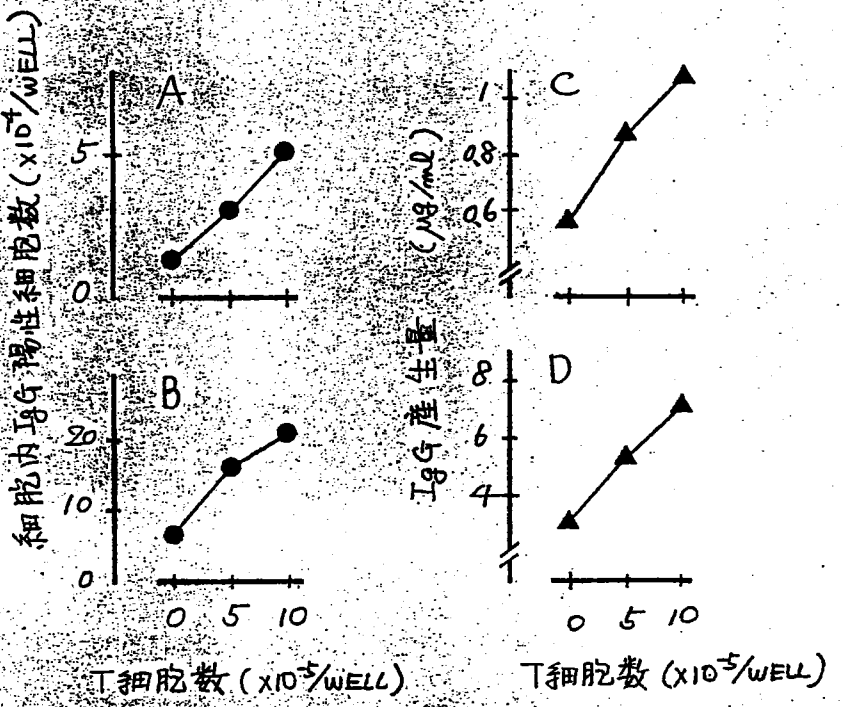
A
B
C
D
細胞内IgG陽性細胞数 (x10⁴/WELL)
IgG産生量 (μg/ml)
T細胞数 (x10⁵/WELL)
T細胞数 (x10⁵/WELL)
0
5
10
20
1
0.8
0.6
8
6
4

図2 (以下 別紙)

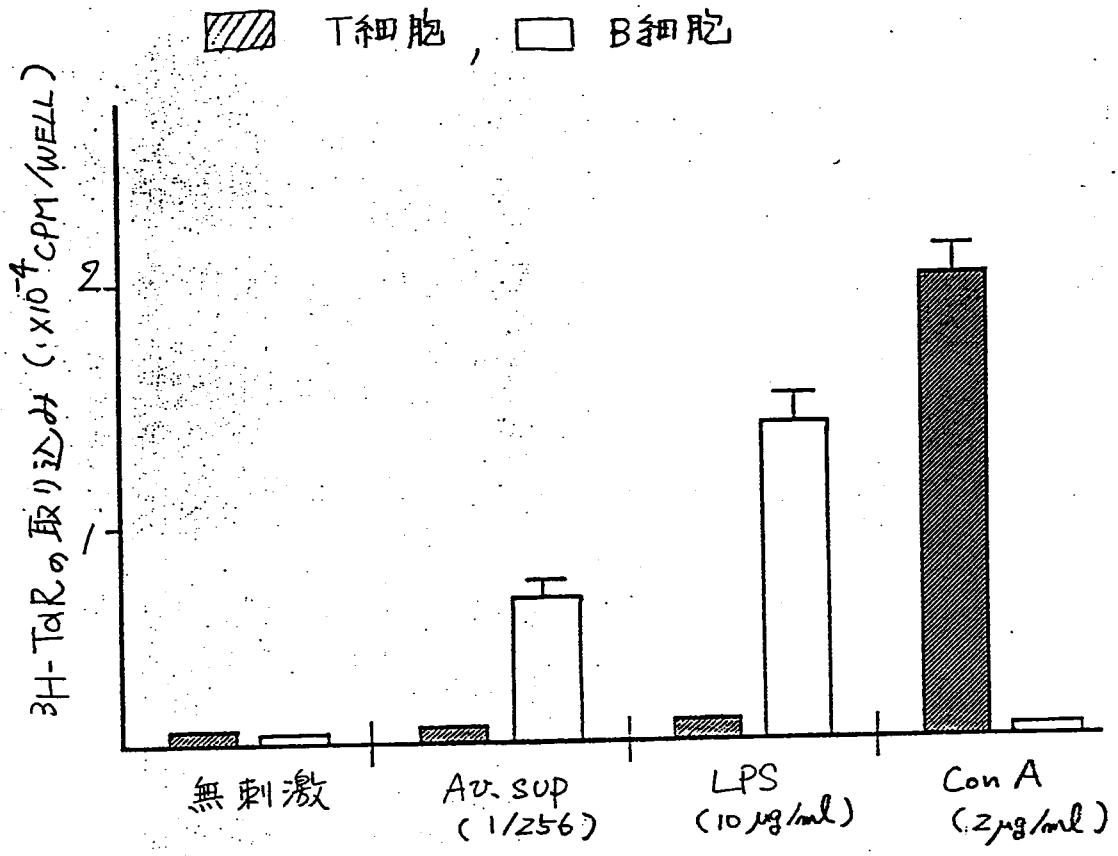
T細胞
B細胞
3H-TdRの取り込み (1×10⁻⁴CPM/WELL)
2
1
無刺激
Av. sup
(1/256)
LPS
(10μg/ml)
Con A
(2μg/ml)

図3 (以下別紙)

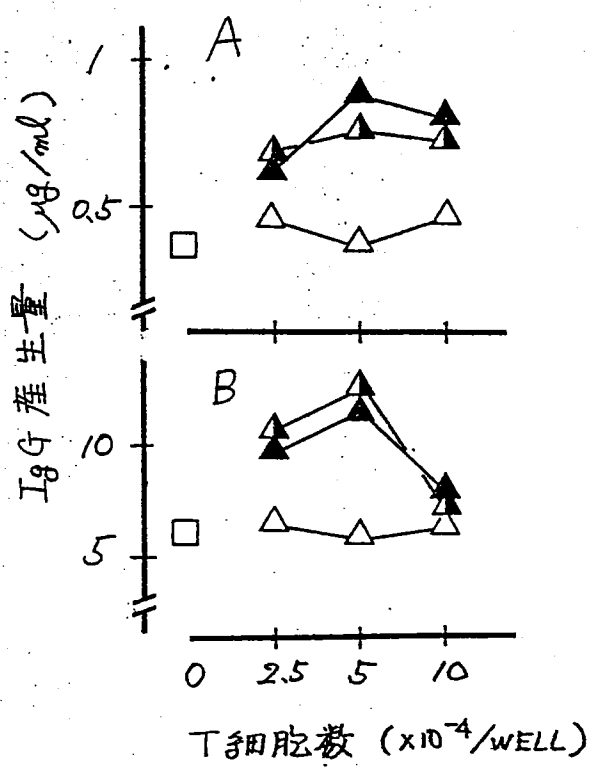

図4. (以下 別紙)

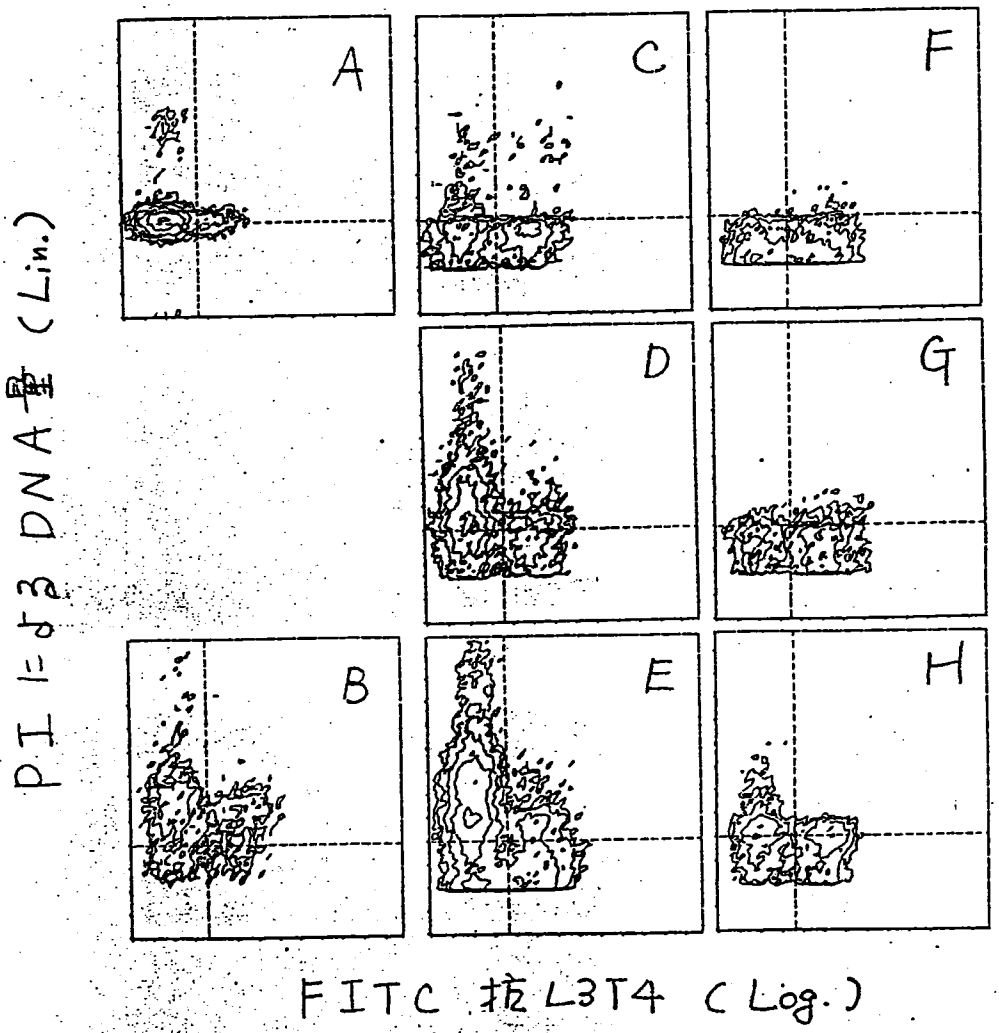

図5 (以下別紙)

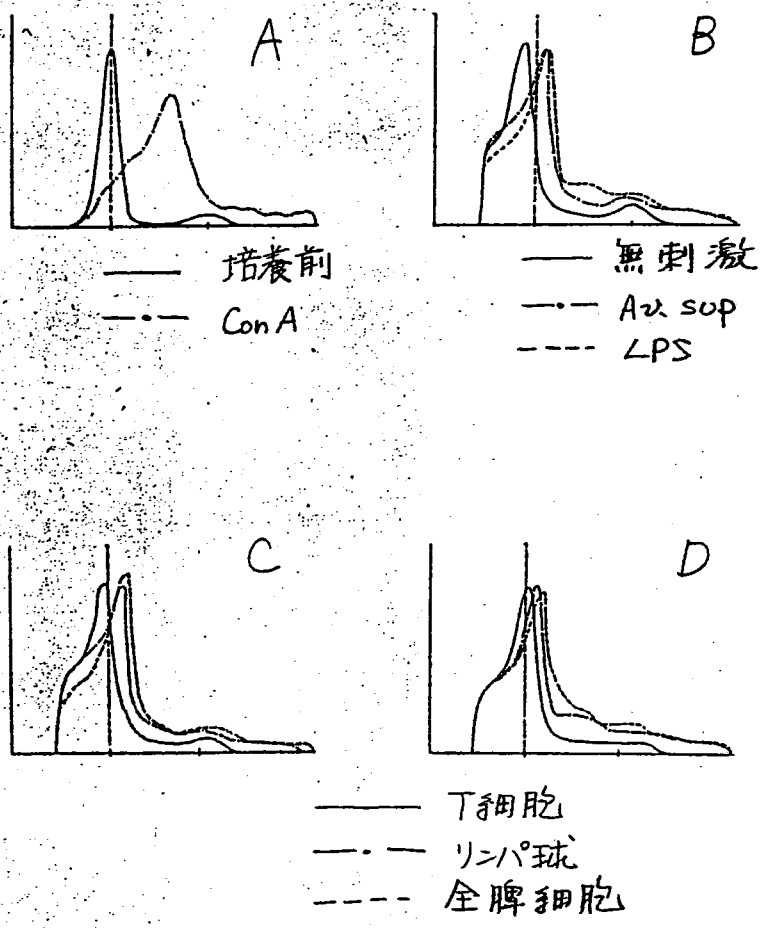

図6（以下別紙）

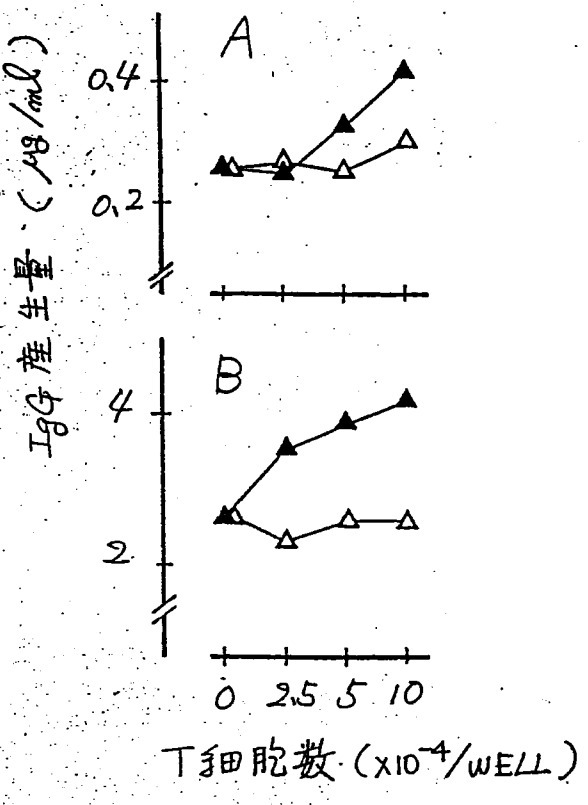

図7（以下別紙）

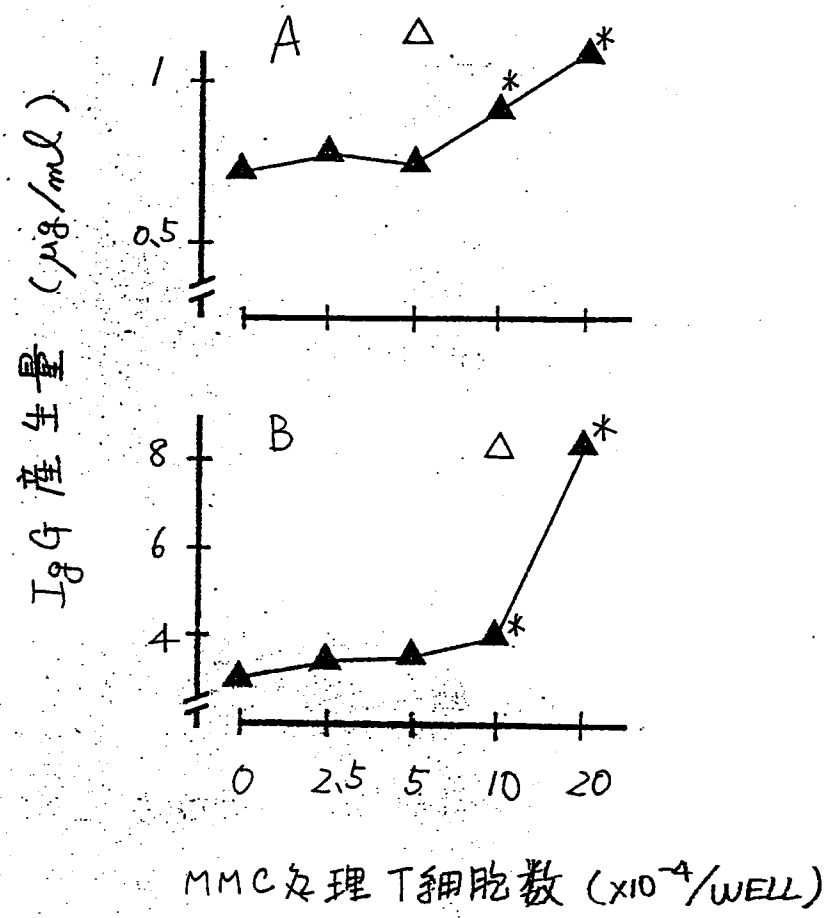

図8 (以下別紙)

表１．Ｂ細胞表面Ia抗原量のPBAによる変化

	無刺激		Av.sup (x256)	LPS (10μg/ml)
	4℃	37℃	37℃	37℃
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℃,37℃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 (x256)	LPS (10μg/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($2x10^5$cells)とMMC処理B細胞($2x10^5$cells)を共に7日間培養を行い、培養終了前20時間の^{3}H-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)