

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University



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 I g G 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)

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、 細 胞 に よ る I g G 産 生 の 増 強 機 構 に つ い て 検 討 した結果、helper/inducerサプポピュレーシ 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 I g C 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 I g G 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、ブ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ら-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、病変のごく一部のはいか過ぎないで。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、地出可能な全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までので力スの細胞を用いた PBAについての報告においては、CBMがIgGよりもに優位であり、IgG保有細胞の優位ない。

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1°°、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。

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 (P B A)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¹プの方法に従った。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ボ多糖(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

無菌的に脾細胞浮遊液を調製し マウスより 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りた 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 I g s 抗 体 (a n t i -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 した。方法を簡単に示すと、抗体をあ め吸着させた細菌培養用ペトリ皿に、 胞 浮 遊 液 (1x10⁷cells/ml)を 入 れ 、 室 温 で 1 間インキュベートし、非付着性であるT細 り出したのちペトリ皿をCa2+,Mg2+を含 取 な い リ ン 酸 緩 衝 生 理 食 塩 水 (P B S (-)) で よ く 洗 い 、 P B S (-) 中 で 強 く ピ ペ ッ テ ィ ン グ を 行 て付着性のB細胞を取り出した。更に、 分については、同一操作を繰り返すこと 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 鬼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細胞サブボビュレーションの分画 精製されたT細胞は、moAbと家庭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L3T4moAb³®′(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、sup-pressor/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(Cappei)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)5x10-5 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C02 を含む空気中で行った。

6、 I gs産 生 量 の 測 定

B細胞 5×104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(96wells, round bottom, Corning GlassWorks, 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ブレート (96
wells, flat bottom, Nunc immunoplate I,
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Tween20と0.02% NaNs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ブル(精製マウス IgG,
Zymet Lab. Inc., South San Francisco,

Calif.) または IgM(Miles Scientific, IL)を 各 wellに 入 れ 室 温 2 時 間 イ Naperville, ン キュ ベ ー ト し 、 PBS-Tで 3 回 洗 浄 後 、 リフォスファターゼ標識抗マウス IgGま 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 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 paranitrophenylphosphate-2Na, 和 光 純 薬 工 業 ,)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 ト 光 度 計 (コ ロ ナ MTP-12 Auto, コ ロ ナ 電 気 、 田)を 用 い て 各 wellの 405nmに お け る 吸 光 度 測 定 し た 。 プ レ ー ト 毎 に 置 い た 標 準 サ ン プ の測定結果より、X軸に濃度を対数で、 に そ の 吸 光 度 を そ れ ぞ れ と り 、 最 小 自 乗 法 っ て 標 準 直 線 を 作 成 し 、 こ れ か ら 培 養 中 の 各 I g 量 を 算 出 し た 。 な お 、 相 関 係 数 は 、 0.998以上であった。

培 養 及 び ELISAは 、 す ベ 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。 僅かに、緑色蛍光が赤色側に漏洩する の時 同じサンプルをFITCのみ 向がみられるので、 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 I g G の 解 析)で は 、 赤 色 側 の 検 出 器 の 回 路 を 閉 じ 、 compensationを 行 わ ず に 解析に際しては、1サンプルにつ 解析した。 き 少 な く と も 5000個 以 上 の 細 胞 を 測 定 し た。 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 I g G の 染 色 と 解 析

Zeile²2)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 P B A 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 I g G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 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は 24 wellsのカルチャープレート (Corning)を用 い、 9 6 w e l 1 s の プ レ ー ト を 使 用 し た 場 合 の 1 0 倍 のスケールで行った。

9 、 L 3 T 4 抗 原 と D N A 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/m1,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。

1 O、B細胞表面 Ta抗原の染色と解析
1次抗体に抗 I-Ad 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。

1 1 、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 (1x10⁵/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(3H-TdR, NEN)0.5μ 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
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。

1 2 、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 x 1 0 ⁶ cells/mlに浮遊した細胞を、 5 0 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。

1 3 、自己リンパ球混合培養反応(自己MLR) 精製されたT細胞(2x10⁵cells/well)を、 MMCで処理したB細胞(2x10⁵cells/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℃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

,也是这个人的,他们是这个人的人,他们也是一个人的人们的人,他们也是一个人的人,他们也是一个一个人的人,也是一个一个人的人,也是一个人的人,他们也是一个人的人的

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(5x104cells/well)をT細胞の存在下(2.5~20x104cells/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IgC産生の増強が、IgC産生細胞数の増加に基づくものか、それとも、IgC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、IgC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 LgG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)。

胞を、 Sephadex G-10カラムを通過させ 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 分は、抗原提示細胞を含んでいる。従っ 細胞 画分は Con Aに強く反応して増殖し しかしながら、この様なT細胞は 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 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 ヨ 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/inducer T 細胞と suppressor/cyto-toxic 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 I g G 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、 I g G 産生を増強することがあることも出来なかった。すなわち、多りローン性 I g G 産生増強能を有する T 細胞もし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 I g G 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
ま面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/m1)で3日間刺激し

リンパ球画分を PBAで刺激した場合には、 L3 T 4 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

た 全 脾 細 胞 (図 5-B, 図 6-A)を 解 析 し た。

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

すなわち、T細胞非依存性の PBAの糸においても、L3 T 4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。

抗 L3T4moAbに よる T 細 胞 機 能 の 阻害 5. 抗 L 3 T 4 m o A b を 培 養 液 中 に 添 加 (0.5 μ g/ ml)することによって、T細胞による l g G 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 P B A の 系 に お け る | g G 産 生 を 増 強 す る 為 に は 、 な ん ら か の 認識して活性化される事が必 を 唆している。そしてこのよ を 示 こと 表面上に表現されて 原は、B細胞 う な 抗 自己la抗原である事が考えられる。 る しかも、PBA物質によって活性化されたB 、表面|a抗原の量が増加し、こ では 自己のla抗原に応答する 果 活性化 己 反 応 性 T 細胞) が 強 く (自 胞

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 la抗原量の増加

精製B細胞を、PBAの刺激下で培養(2 0時間、37℃)を行うことによって、表面 1 a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10tのFCSは、それのみで1a抗原 量を増加させる事はなかった。

また、B細胞中の la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 la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
la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 MM C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、I8G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、 細胞系の細胞浸潤を示す疾患であり、 多数のB 歯周病局所におけるこれらのB 形 質 細 胞 が 保 有 す る 免 疫 グ ロ ブ リ ン (Igs)の (アイソタイプ) は、大部分が I g G であ IgMは 極 僅 か で あ る 事 が 、 免 疫 組 織 学 的 な 析により明らかになっている1-4)。そして、 うな病理組織像をもたらす原因の一つ このよ 垢中の細菌に由来する P B A 物質の関与が 考えられている 1 1 , 1 7)。 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 り、歯周病の病理像の形成機序を が優位であ 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細胞が局所へ没潤し、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、 0 k a d a ら 3、4、1 8) は、歯周病巣においても、 T 細胞が少なからず存在しかする なった が活性化されている事を示、 唆っ でる 果を見いせる 1 8)。また一方、ですウストを 基礎免疫学的研究では、 T 細胞の 関与が必のの関チがある。 を 報告 25-28) がある。 で がった 報 巣 に 存在する T 細胞がならかの形で Ig G産生を増強している 可能性が考え

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⁴゚゚゚、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

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 l gG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 helper T 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 ブの発現を調節する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 lgG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 賀 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 La抗 原 を 認 識 す る 事 に よ 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、 L 3 T 4 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、 I g G 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 0.5 μ g/mlと い う 濃 度 は 、 自 己 M L R 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、 P B A による B 細胞表面 I a 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 (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 I g G 産生 増強がもたらされるという仮説を強く支持 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 、 F C M に よ る L 3 T 4 抗 原 と D N A 量 の 同 時 解析においては、PBA物質の非存在下では、 L3 T 4 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、 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 4 1) 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 I a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 外来性抗原の関与なく、 自己Ia る。さらに、 抗原のみの刺激によってT細胞が活性化さ る と い う 、 自 己 M L R の 存 在 3 6) が 、 広 く 認 め ら 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 、 I g G 産 生 を 増 強 す る T 細 胞は 、 helper/inducerサ プ ポ ビ 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 細胞の表面マーカー、或は機能につい れるT 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サプポピュレーシ ョンに属するT細胞が、自己のIa抗原によ て活性化される事によって反応が開始す いうのは一致した見解である。更に、 近年の 養技術の目ざましい進歩により正常 T のクローン化が可能になったことで、 細胞の機能についてもクローンレベル T での解析が進んでいる38.47-52)。そして、こ 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ISを生を特異的に誘導、或は増強する、いわゆるisotype-specific Tcellとしての機能を有するとの報告が多く見

られる47.48,58)。 Claybergerら48)は、 B 細 胞を外来抗原と、この抗原に特異的なhelper 胞が産生した抗原特異的因子で活性化し た 場 合 に は 、 I g M 産 生 の み が 誘 導 さ れ た が 、 こ 自己反応性T細胞クローン由来の因子 を 添 加 す る と 、 I g G 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 、 I g G 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 5 0 7 の ヒ ト の 自 己 反 応 性 T 細 胞 ク ロ ー ン は 、 I g E 産 生 を 誘 導 し た 。 こ れ ら の 報 告 は 、 かって多クローンのT細胞を用いて得られた 成績からその存在が示された、isotypespecific T cell25)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

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Iss産生が抑制される傾向を示し(図1)、更に、抗Lyt-2.2moAb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 M M C で 処 理 す る こ と で 、 傾 向 が 見 ら れ な く な っ た (図 8) が 、 こ の 様 な 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 I a 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 I g G 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 I g G 産 生 を 増 強 す る に は 、 B 細 胞 に 対 し て る程度の数が必要であり、これが、工a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

Tg G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を移動したるのが、を見りの細胞をは、LPS刺激のそれに比倒的にの変出、LPS刺激のそれに比倒的には観察出、LPS刺わらず、抑制傾向は、ないの増、は、Tg G産生の増、ない、ないの増、ないの増、ないの増、ないのでもないでもない。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有在し、自己反応性T細胞は自己のTa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

細胞が、 suprressor細胞群を誘導する Т 1つの免疫ネットワークを形成し、 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 5 4 , 5 5) で あ る 。 す な わ ち 、 生 体 内 に 正 常 な レ ベ ル で 存 在 す る I a 抗 原 量 で は 、 自 己 M L R 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、 Ta抗原陽性細胞の異常な増殖や、 Ta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 M L R に よ る suprressor inducer細 胞の誘導44-46)や、活動期の自己免疫疾患に 自 己 M L R の 低 下 と 言 っ た 事 実 5 6 - 6 8) 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 5 1) 、 或 は 、 自 己 反 応 性 T 細 胞 の 活 性 化 が 、 Ta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 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 増殖によって自己反応性T 細 増殖が誘導される可能性が考え られる。 活性化B細胞による、自己反応性 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 I L - 1 等 の Cytokineの 関 与 も あ る の か も し れ な い 。 す な わ ち 、 I a 抗 原 の 増 加 そ の も の が 、 増 殖 を 高 め る の で は な く 、 正 常 量 の Ia抗 原 T細胞の活性化を、 P B A 物質で刺激され よる 細胞が産生するようになった Il-1 ことでB が増強するという可能性である。事実、 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 ^{6 1)} が あ る の で 、 B 細 胞 が A v . s u p で 刺 激 さ れ る 事 で 、 I L - 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 々 は 、 P B A 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の様にIgM産生を運命付けられた B 細 胞 の I g G 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 I g G 産 生 を 運 命 付 け ら れ た 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 細胞の存在意義について考察する。 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 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 Seymourら 40) は B も十分に推定出来るが、 胞 活 性 化 マ ー カ ー に 対 す る mo A b を 用 い て こ を証明している。従って、これらのB 細 胞 自己反応性T細胞の強力な刺激となり得る のと考えられる。また、マクロファージ等も 刺激源となり得る。更にfibroblast 同様に、 胞由来のァーインターフェロン(IFNァ) って刺激されることで、Ia抗原を表現す 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エa抗原の 総量は非常に大きい事が推測される。すなわ 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

という に は で 性 T 細胞による PBAの を 節、 或 は 、 自 己 な 他 の T 細胞 で を 性 T 細胞 で な が 他 の T 細胞 で な は な な B 細胞 の 活性化子 で よ る 、 新 た な B 細胞 の 活性化 や fibroblastの Ia 抗 原 の 発 現 が 考 え 細 ト で で が 悪 循 環 応 性 ア の 免 が に 関 ら れ る い で の 焼 構 が 正 で の 成 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
 TgG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 サブボビ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 I g G 産 生 を 増 強 す る T 細 胞 は、 自 己 の I a 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 細胞に

よる P B A の 修 飾 、 I g G 産 生 の 増 強 と い う 機 構 が 推 測 さ れ る。

铭 態

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り す。また、実験の実施にあたり直接御指達を 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では、ました大阪大学医療技術短期大学部渡辺にの助力を影がまた、武薬の調達等に際りませて御助力を賜りまた大学医学部附属語の指した。

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レセブ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 <u>Bacteroides gingivalis</u> 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.: <u>In vitro</u> expression of immunoglobulin M and G subclasses by murine B lymphocytes in response to a polyclonal activator from <u>Actinomyces</u>. 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 <u>Actinomyces viscosus</u>. Infect. Immun., 31: 236-244, 1981.
- (15). Mangan, D.F. and Lopatin, D.E.: Polyclonal activation of human peripheral blood B lymphocytes by <u>Fusobacterium nucleatum</u>. 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.: <u>In situ</u> 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. TL. 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). Coutinno, A., Pettersson, S., Ruuth, E. and Forni, L.: Immunoglobulin C gene expression. W. 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 TL MHC antigenreactivity. 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.: <u>In vitro</u> 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-https://linear.no.nd/ arole for self Iarreactive 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.
- 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 <u>Actinomyces</u>. <u>Scand</u>. <u>J. Immunol</u>., 17: 313.

			,					·	,										
図	1	• •		T	和	桕	非	依	存	性	ΡE	3 A	1=	Б	ヷ	3	T	和	12
				の	影	雤		:				:	:						
	В	和	胞)	Aι	٠. (sup	
				,					·			· · · ·						激	
		·														· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	T		
								·,	,	·									
	-		.,			·		·	·				·		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			/I	
	比	n	亥	10	Θ	PB	Α	物	質	Ü	刺	敝	し	4	^	盱	12	14	
	-4	_ :	Į	9 G	, -	┅	•	Ιg٢	11	٧١	ず	h	. ŧ	檢	出	で	₹	な	か
·		:	o	ī	·														
									٧,,	7.	占	音	15	嵫	ЬП	ر .	D (0.	05:
i	1 \•		·				ī				/ H	<i>[V</i>]	1	/ 1/			I		
		5-	tud	len	15	<u></u>	<u> </u>	اود	> 1)		<u> </u>	<u> </u>	, , ,;			<u> </u>	<u> </u>	
				<u>.</u>				<u>:</u>				<u> </u>	<u> </u>		<u> </u>		<u></u>	<u> </u>	
W	2			T	細	胞	1=	4	3	77	7	ם	_	ン	性	工	g G	產	生
				和	胞	の	增	加											
	В	和					,				.11)	٤		Ατ	ر ار	OF	(A	رے
				-,							.		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			·		の	:
						·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				:	7					:		
										~		·	.,					胞	
	(-	• -)	お	1	び	百	_	培	表	上	清	1=	產	生	2	ih	ン た	I	9 G
	量	(-	A -)) n	变	12	ه ا			!	<u> </u>			:	<u> </u>		<u> </u>		
		:	:				!										:	i :	

図	3		7	ら	7	睥	臌	`T.	細	胞		\$	E	は	В	和	胞	(各
		細	胎	画	H	は	7	ク	ם	7	7		=)"	ξ	含	む)	٤	
		各	マ	1	Ļ	ジ	I	ン	7"	刺	悬	し	た	榯	<u>න</u>	D/	VΑ	合	成。
		3	且	間	ŋ	掊	養	1=	お	け	3	琣	養	終	J	削	20	時	間
		め	3 ₊	I -T	a R	. 0)	取	1)	込	H	z"	評	価	し	T=	0	グ	う	2
		0)	錐	飨	Id	標	準	偏	差	ع	示	す	9						
四 -	4		99	7	D		<u></u>	性	Ie	f G	產	生	بح	增	強	Ŧ	3	T	細
							·								••••				
		В		· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	- <i>-</i>								Aυ.	S	JР.	ŧ
											·		· · · · · · · ·				·····		胞,
														• - • • • · · · · •					
																7			培
													· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			場			*********
					-									-					

									······································										
						•									·········				:
*********			·····		·· •••••		-					-		······		*******			
						······································					*********								
	 	<u>-</u> -	· · · ·										···						

図 5	フローサイトメトリーによる L3 T4症	原、
	と DNA 量の 同時解析 (2次元等高線表:	亢)
	培養前リンパ球画分(A), 全脾細胞& Con	
- ······	で3日間刺激後(B), リンパ球画分(C,D)	
	または丁細胞画分(F,G,H) E Av. sup(F) /
	G)またはLPS(E,H)の刺激下、あるいは、	畉
	到激下(C,F) で6日間培養後。	
		······································
四6	L3T4陽性細胞の1次元 DNA ヒストグ	ラ
	4	
	A)陰性対照 (一) 及び陽性対照 (一·一)	
	B)リンパ球画分、培養 6 日後	
	C) Av. sop またはD) LPSの刺激下にお	ウ
	3各細胞画分培養も日後の DNA量(X車	∌).
	と相対的細胞数 (Y 軸)	
		······································
29		

図	7		拖	<u>L</u> -3	3 T4	- MO	Ab	1=	t	3	Τ	细	#2	<u>a</u>	Ιg	G	産	生	垍
			強	能	<u> </u>	阻	止							<u>.</u>		·····		. -	
	В	和	胞	(!	5 X II	040	ء الح	. /	we	ااد)	٤	Τ	争	胎	لح	失	1=	•••••
	<i>A</i>)	A	υ.	20	2 P	ŧ	た	は	В)	14	۶.	۲''	刺	惫	b		-	9
												5)	* * * * * * *						
													··				••••		抓
			- · - · · · · · ·			. 						- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·							敷
3		た																	
						•						••							
図	8		MI	4C	红	. 理	₽'n	Τ	錮	胞	Ø	为	7	口	·	~	性	Ιε	9
			產	. 生	増	強	能	. 1=	及	目	· \$	影	褶	<u>-</u>				 .	
	В											影			ZD	理	:さ	h	<i>t</i> =
		細	- 胜	((5 X I	o f	cel	ls	/	ωe	211)	ع (MI	10					
	7	細細	胎胞	! (! . E	XI · 共	of 1:	cel A	ls) /	/ Iv.	sw Sw	211) UP) E ま	Mi F	1C IJ	В)	LP	S	۲"
	てヌ	細細日	胎胞間	!(! と 刺	XI	0f 1: { L	cel A t	ls) /	/ v. ∆	gw sv	(1) (P) 未) E ま 江	Mi た理	1C IJ T	B 新田) 胜	LP . [-	S	۲"
	Tヌ最	細細日七	胎胞間高	!(!	XI	04 1= { L g G	cel A た 産	lls) / 。 生	ノび人婚	we si it 強	川)中未勉) E ま	がた理を	1C は 丁 示	B 細 す) 胜	LP .I=	S	z" 3
	Tヌ最	細 田 七 B	脫問高細	と刺い	XIX無以	of に (し g G	cel A た 産	ls) / 生 比	ノびる増べ	we si it 強	川)中未勉	とまな果	がた理を	1C は 丁 示	B 細 す) 胜	LP .I=	S	z" 3
	Tヌ最	細 田 七 B	脫問高細	と刺い	XIX無以	of に (し g G	cel A た産 に	ls) / 生 比	ノびる増べ	we si it 強	川)中未勉	とまな果	がた理を	1C は 丁 示	B 細 す) 胜	LP .I=	S	z" 3
	Tヌ最	細 田 七 B	脫問高細	と刺い	XIX無以	of に (し g G	cel A た産 に	ls) / 生 比	ノびる増べ	we si it 強	川)中未勉	とまな果	がた理を	1C は 丁 示	B 細 す) 胜	LP .I=	S	z" 3
	Tヌ最	細 田 七 B	脫問高細	と刺い	XIX無以	of に (し g G	cel A た産 に	ls) / 生 比	ノびる増べ	we si it 強	川)中未勉	とまな果	がた理を	1C は 丁 示	B 細 す) 胜	LP .I=	S	z" 3

四1, (以下.到纸后記載)

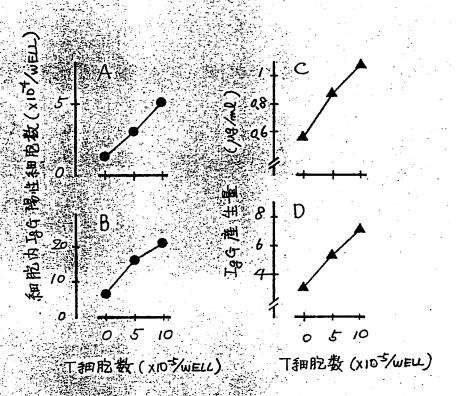


图2 (以下别级)

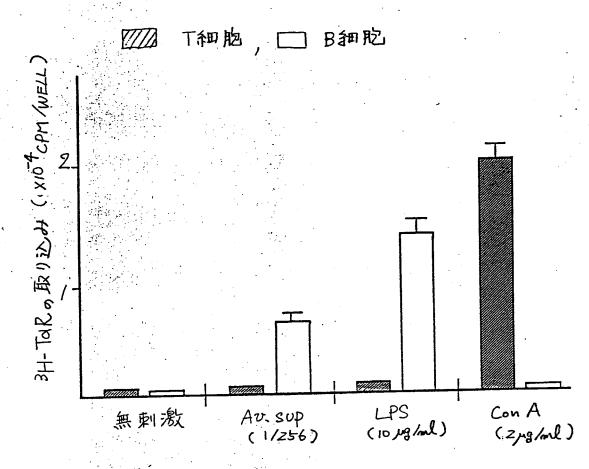


图3 (以下别敌)

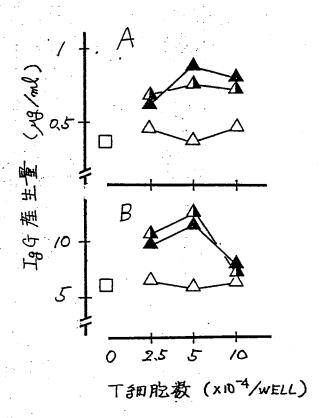
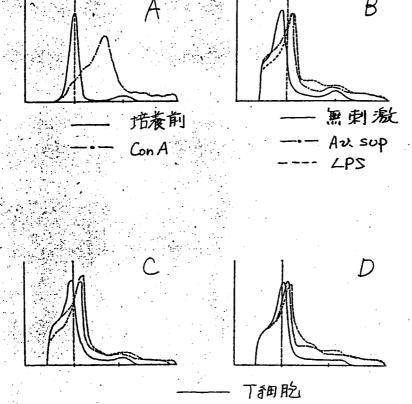


图4. (以下别納)

C C C D B B H

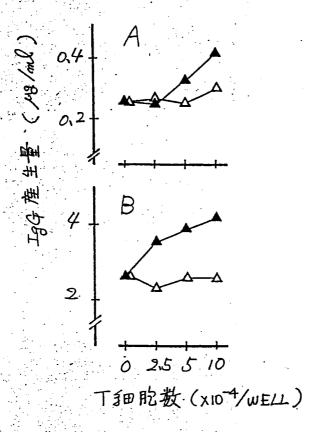
FITC 拉L3T4 (Log.)

四与(以下别敌)

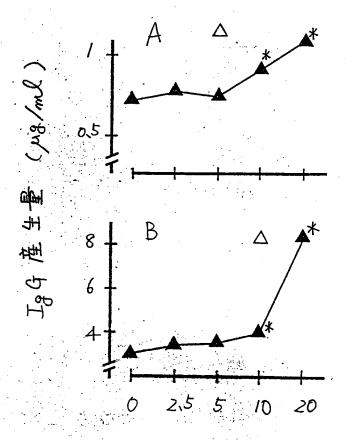


リンパ球

图6(以下引統)



四不 (以下别敌)



MMC及理 T細胞数 (XIO 4/WELL)

图8(以下列的)

表1. B細胞表面 la抗原量のPBAによる変化

			無刺激	Av.sup LPS
		4℃	Ж ЖУБХ	(x256) (10 μg/m1) 37℃ 37℃ 37℃
. •	a抗原陽性細胞率(%)	72.1±1.	3ª 70	0.1±1.6 78.9±1.5 76.2±1.2
	平均蛍光強度(Channel)) 113.9±0.	92 114	4.5±0.68 124.6±1.4 132.5±1.6

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®						
	無刺激	Av. sup (x256)	LPS (10 µ g/ml)	単独				
自己MLRb	8,420±652°	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(2x10⁵cells)とMMC処理B細胞(2x10⁵cells)を共に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。

[°] 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 <u>t</u>-test)