

—原 著—

# 歯周炎罹患者の歯肉溝滲出液中のリンパ球サブセットにおける インターリュウキン2レセプターとHLA-DRの発現

武内 義晴 吉江 弘正 原 耕二

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(主任：原 耕二 教授)

Expression of Interleukin 2 receptor and HLA-DR  
on lymphocyte subsets of gingival crevicular fluid  
in patients with periodontitis

Yoshiharu TAKEUCHI, Hiromasa YOSHIE, Kohji HARA

*Department of Periodontology,  
Niigata University School of Dentistry  
(Chief: Prof. Kohji HARA)*

**Key Words** : 歯肉溝滲出液 ; リンパ球サブセット ; インターリュウキン2レセプター ; HLA-DR

## 要 旨

歯周炎罹患者の歯肉溝滲出液(GCF)、炎症歯肉(GT)、末梢血(PB)における、リンパ球サブセットの、インターリュウキン2レセプター(IL2R)とHLA-DRの発現率について、二重染色法によりフローサイトメトリーを用いて検索した。歯周炎罹患者15名よりGCFを crevicular washing 法で採取した。単核細胞をGT, PBから Ficoll-paque を用いて密度勾配遠心法により分離した。リンパ球サブセットは Leu12(CD19), Leu4(CD3), Leu3a (CD4), Leu2a (CD8)のモノクローナル抗体(mAbs)でそれぞれB細胞、T細胞、ヘルパー・インデューサーT細胞(Th)、サプレッサー・サイトトキシクT細胞(Ts)を調べた。抗IL2R(CD25)と抗HLA-DRをリンパ球活性化マーカーとして用いた。Th, Ts, Bリンパ球におけるIL2R

とHLA-DR陽性細胞率をそれぞれ算出した。ThのIL2R陽性細胞率(IL2R<sup>+</sup>Th)はGCF(34.0%)がGT(18.4%), PB(13.7%)より有意に高かった。GCFのBリンパ球におけるIL2R陽性細胞率(IL2R<sup>+</sup>B)は3群で最も高かった。(GCF: 23.9%, GT: 12.5%, PB: 6.3%)。Tsは検体の種類に関係なくIL2Rを発現しなかった。PBとGTに比べて、GCFはTh, Tsともに有意に高くHLA-DRを発現した(PB: 8.7%と27.1%; GT: 27.9%と50.3%; GCF44.7%と65.3%)。これらの結果からGCF中のリンパ球は極めて活性化した状態にあり、歯周炎における局所的な宿主の免疫応答と関連していることが示唆された。

## 緒 言

GCF中の成分は近年、歯周炎における臨床的な意義と、診断指標としての有用性から多数調べ

られている<sup>1)</sup>。GCF中の炎症細胞数は歯肉の炎症の程度が悪化するにつれて、増加することが報告されている。さらに、GCFは、歯周組織の炎症に関係した免疫細胞集団を含んでいる<sup>2)</sup>。その細胞成分の大半が多形核白血球(PMN)であり、リンパ球の割合は低い<sup>3)</sup>。

一方、炎症歯肉組織における、リンパ球の免疫組織化学的研究は多数なされている<sup>4-8)</sup>。Stoufiらは歯周炎罹患者の歯肉組織におけるCD4/CD8比(Th/Ts比)が末梢血における値に比べて低下していることを報告し、局所的な免疫反応の変化があることを示唆した<sup>4)</sup>。Reinhardt<sup>5)</sup>らは、メンテナンス期の歯周炎罹患者における歯肉中のリンパ球の活性を調べた。そして、Th TsともHLA-DRを発現しており、この2種類のサブセットとも歯周炎の免疫応答調節に関与していることを示唆した<sup>6)</sup>。一方、Seymourら<sup>6)</sup>は実験的歯肉炎の炎症歯肉におけるTリンパ球のIL2R発現率は低く、他の部位ですでに活性化したためであるとのべている。このように歯肉におけるTリン

パ球の活性化の状態はIL2R HLA-DRに対するmAbsを用いて検索されている。Tリンパ球の、IL2Rを考えると、細胞周期のG<sub>0</sub>期からG<sub>1</sub>期にかけて発現し<sup>9)</sup>、Bリンパ球はG<sub>1b</sub>期に発現する<sup>10)</sup>。HLA-DRは休止期、活性期のBリンパ球<sup>11)</sup>、S期以降のTリンパ球に発現される<sup>12)</sup>。このことから、IL2RとHLA-DRに対するmAbsを用いることでリンパ球の活性化の時期を知ることができる。

ところで、GCFは、細菌性プラーク、インターレウキンや他の宿主細胞由来の因子を多数含み<sup>1)</sup>、リンパ球活性化を引き起こしやすい環境にあると考えられる。しかし、GCF中のリンパ球活性については未だ不明確のことが多く、著者らはGCF中のリンパ球サブセット比について検索を行ってきた<sup>13)</sup>。本研究では、さらに、GCF, GT, PB中のTh, Ts, Bリンパ球の活性化について、抗Tac抗体、抗HLA-DR抗体を活性化の指標として用いて、二重染色法による、フローサイトメトリーでの検索を行った。

Table.1 Clinical assessment of sampling sites

gingival index	1.7	±	0.4	
probing depth	4.5	±	0.8	mm
loss of attachment	5.5	±	1.3	mm
bone loss	54.2	±	14.2	%

n = 15 :

Each value represents the mean and standard deviation for measurements of 15 subjects.

The measurable value of each subject was expressed in the mean of sextant sites (range : 2 to 6 contiguous teeth) per subject.

## 材料および方法

### 1. 対象

新潟大学歯学部附属病院保存科を受診した辺縁性歯周炎罹患患者15名のGCF, GT, PBを調べた。被検者は男性8名、女性7名で、その平均年齢は $45 \pm 7$ 歳であった。GCFとGTを採取した部位の臨床的な状態をTable 1にまとめた。臨床項目の検査はGCF, GTの採取前に行った。歯肉炎指数<sup>14)</sup>、プロービング時の歯周ポケットの深さ、付着の喪失量、歯槽骨吸収度(Scheiの方法の変法<sup>15)</sup>)はそれぞれ、 $1.7 \pm 0.4$ ,  $4.5 \pm 0.8$ mm,  $5.5 \pm 1.3$ mm,  $54.2 \pm 14.2\%$ であった。

### 2. GCFの採取と調製

GCFは連続した2～6歯の炎症歯肉から採取した。採取部位を簡易防湿後、歯肉溝より1時間かけて、crevicular washingをSkapski & Lehnerの方法<sup>16)</sup>に準じて行った。低速定流ポンプ(ペリスタバイオミニポンプ、Atto Co., 東京)により、一方の端からPBSを10ml/hの割合で歯肉溝に流した。一方の端から約10mlの試料を採取後、ナイロンメッシュに通してプラーク塊を除き、PBSで400 x g, 10分間、2回遠心洗浄し、2% FCS, 0.1% NaN<sub>3</sub>を添加したPBS (sPBS)に浮遊した。

### 3. 歯肉の採取と調製

歯肉は、GCFを採取した同一部位より採取後、直ちに4℃のRPMI 1640培地(10% FCS, Penicillin 100 u/ml, Streptomycin 100 μg/ml 添加)10mlに浮遊した。採取歯肉の湿重量は100mg～300mgであった。RPMI 1640培地でよく洗浄したのち、1～2 mm<sup>3</sup>に細片化し、0.1% コラゲナーゼ(Sigma, Type I)を含む、10mlのRPMI 1640培地(10% FCS, Penicillin 100 u/ml, Streptomycin 100 μg/ml 添加)中に浮遊し、37℃にセットした恒温槽中で1時間酵素処理した。ステンレスメッシュとナイロンメッシュを通して、均一な細胞浮遊液とした。その後Ficoll-Paqueを用いて、密度勾配遠心法により、単核細胞を分離した。PBSで400 x g, 10分間、2回遠心洗浄したのち、sPBSに浮遊した<sup>17)</sup>。

### 4. 末梢血の採取と調製

ヘパリン加末梢血を真空採血管で採取した。末梢血2 ccを等量の生理的食塩水と混合しFicoll-Paqueを用いて、密度勾配遠心法により、単核細胞を分離した。PBSで400 x g, 10分間、2回遠心洗浄したのち、sPBSに浮遊した。PB, GT, GCFの各細胞浮遊液は、アクリジンオレンジとエチジウムブロマイドで染色し、蛍光顕微鏡で細胞生存率を検討した。生存率はPB, GT, GCFでそれぞれ95%, 90%, 90%以上であった。またチェルク液で染色し血球算定盤にて細胞数を算定し、 $1 \times 10^6$ 個リンパ球/ml sPBSの濃度に調整した。15名のPB, GT, GCFのリンパ球はそれぞれ $1.6 \times 10^6$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $2.1 \times 10^5$ であった。

### 5. 細胞表面抗原の検索

Bリンパ球、Tリンパ球、Tリンパ球サブセットのmAbsはPhycoerythrin(PE)標識、HLA-DRとIL2Rに対するmAbsはFluorescein isothiocyanate(FITC)標識したものをを用いた。全てのmAbsはBecton Dickinson Immunocytometry Systems, Ca)の製品を用いた。各mAbの特性と二重染色の組み合わせは以下の通りである。

panT細胞: 抗CD3(Leu4)<sup>18)</sup>  
 panB細胞: CD19(Leu12)<sup>11)</sup>  
 suppressor/cytotoxic T細胞: anti CD8(Leu2a)<sup>19)</sup>  
 helper/inducer T細胞: anti CD4(Leu3a)<sup>19)</sup>  
 IL2R: anti CD25(anti Tac antigen)<sup>20,21)</sup>  
 HLA-DR: anti HLA-DR molecule<sup>22)</sup>  
 IL2R陽性Thの割合(IL2R<sup>+</sup> Th)  
 IL2R陽性Tsの割合(IL2R<sup>+</sup> Ts)  
 IL2R陽性Bリンパ球の割合(IL2R<sup>+</sup> B)  
 HLA-DR陽性Thの割合(HLA-DR<sup>+</sup> Th)  
 HLA-DR陽性Tsの割合(HLA-DR<sup>+</sup> Ts)

### フローサイトメトリー解析

$1 \times 10^6$ 個のリンパ球を含むsPBSをFITC, PE標識各mAbs20 μlと混合して、4℃の暗所にて30分間放置した。その後sPBSで2回洗浄し、浮遊させた。各mAbで染色されたサブセットの割合をFACScan(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Ca)で測定した。著者らが前に行った

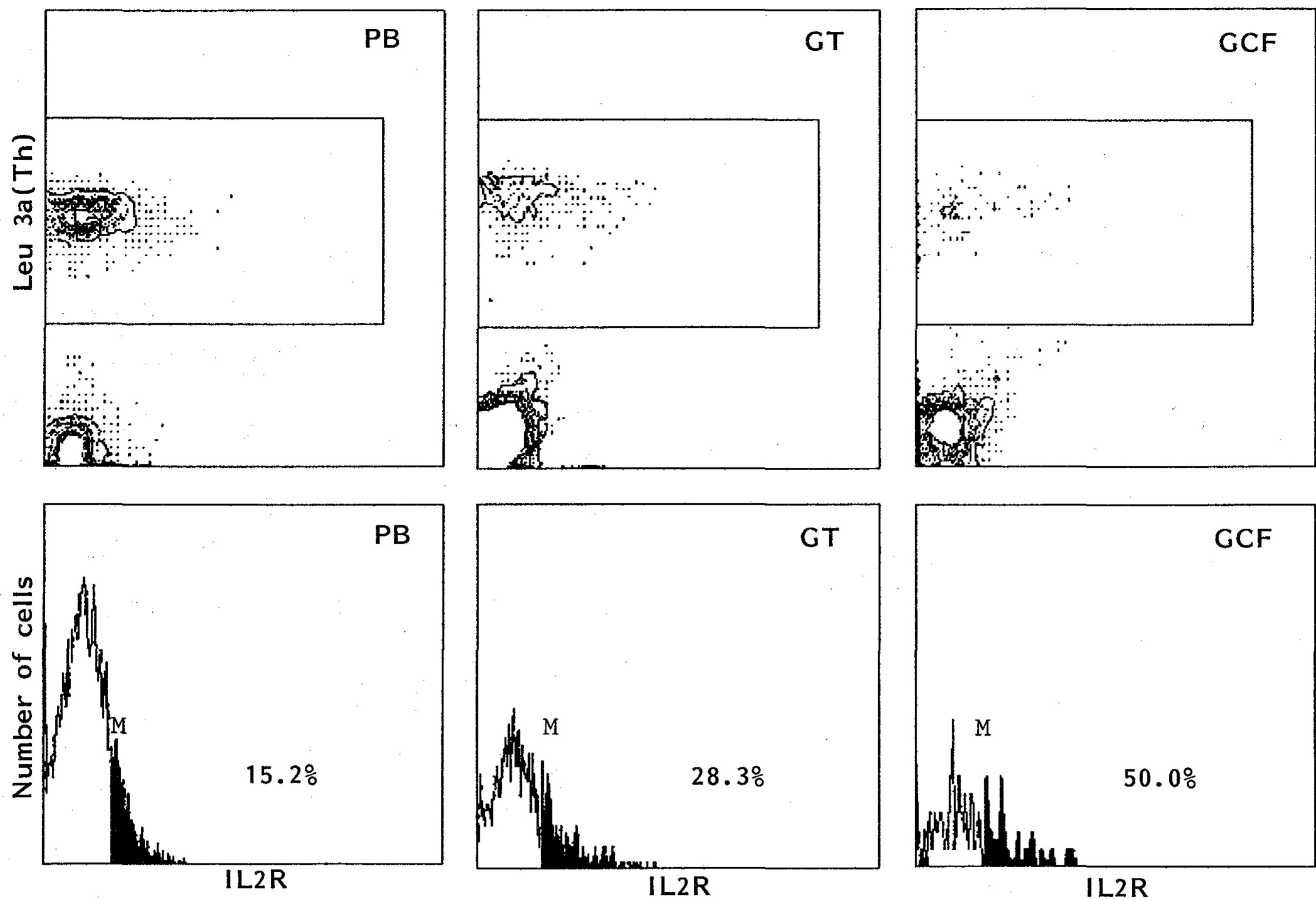


Fig. 1 Contour graphs of FITC vs. PE fluorescence and single histograms of FITC

Lymphocytes were stained with FITC-anti IL2R and PE-Leu 3a. PB (left panels), GT (middle panels) and GCF (right panels)

Upper row: Th were determined and gated in a rectangular frame as those having a PE fluorescence value greater than the distribution of control sample. Lower row: Note the marker set on the appropriate control histogram. Proportions of IL2R Th were 15.2% in PB, 28.3% in GT and 50.0% in GCF.

方法により<sup>13)</sup>、FACScanを設定し、リンパ球のデータを取り出した。Fig. 1, 2はThにおけるIL2RとHLA-DRの発現状態を示したものである。PB(左)、GT(中央)、GCF(右)の各リンパ球をFITC標識抗IL2RまたはHLA-DRとPE標識Leu3aで染色した。等高線表示図上でLeu3a陽性画分にゲート(矩型に囲まれた部分)<sup>23,24)</sup>をかけ、Th画分のデータを取り出した。コントロールとして、サブクラスが一致したFITC標識IgGを使用し、コントロールのシングルヒストグラム上で、細胞数の0.1%がマーカー(M)の右にくるように設定し、

マーカーよりFITC蛍光強度が強い細胞の割合を算出した。Fig. 1に示すとおりIL2R<sup>+</sup>Thは15.2%、28.3%、50.0%、Fig. 2ではHLA-DR<sup>+</sup>Thは6.9%、20.2%、39.4%であった。

## 6. 統計処理

すべての統計学的解析はWilcoxon signed-rank testにより行った。危険率5%未満をもって有意差ありとした。

## 結 果

各検体のT/BとTh/Tsの平均値±標準偏差を

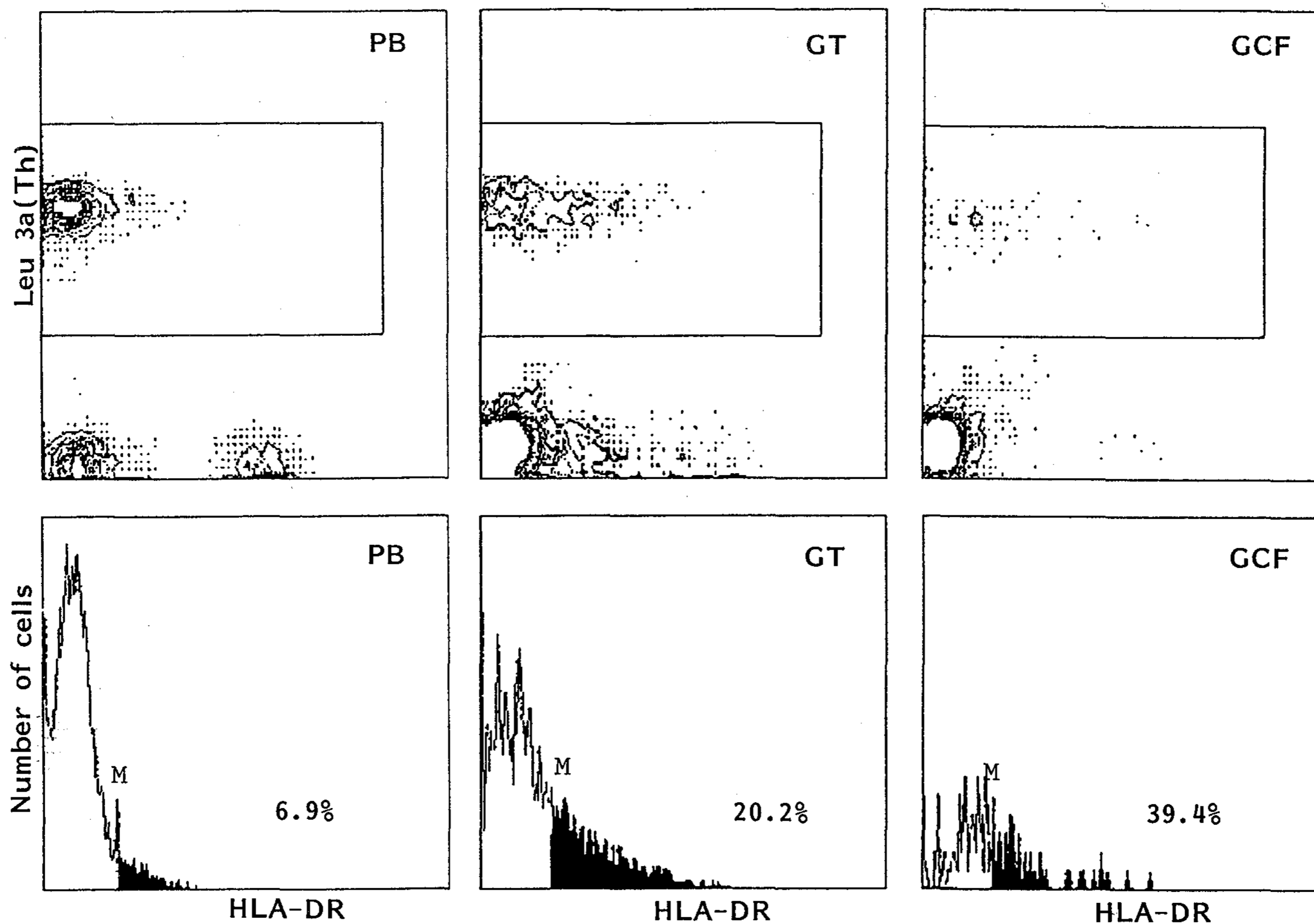


Fig.2 Contour graphs of FITC vs. PE fluorescence and single histograms of FITC

Lymphocytes were stained with FITC-anti HLA-DR and PE-Leu 3 a. The cells were analyzed as described in Fig.1 legend. Proportions of HLA-DR<sup>+</sup> Th were 6.9% in PB, 20.2% in GT and 39.4% in GCF.

Table 2に、そのプロットをFig.3に示す。GCFでのT/Bは $1.97 \pm 0.94$ でGTの $4.19 \pm 1.98$ , PBの $5.51 \pm 1.84$ に比べて有意に低かった。Th/TsはGCFが $1.41 \pm 0.72$ , GTが $1.22 \pm 0.48$ とPBの $1.94 \pm 0.81$ に対して有意に低かった。

各検体のIL2R陽性細胞がリンパ球サブセットに占める割合をFig.4とTable2に示す。GCF, GT, PB中のIL2R<sup>+</sup> Thはそれぞれ、 $34.0 \pm 18.0\%$ ,  $18.4 \pm 4.4\%$ ,  $13.7 \pm 7.3\%$ であった。GCF中のIL2R<sup>+</sup> Bは $23.9 \pm 10.3\%$ で、GT $12.5 \pm 4.6\%$ , PB $6.3 \pm 4.4\%$ の3群で最も高かった。PB, GT, GCFのIL2R<sup>+</sup> Tsはともにきわめて低い値を示した。

各検体のHLA-DR陽性細胞がリンパ球サブセットに占める割合をFig.5とTable2に示す。HLA-DR<sup>+</sup> Thは、GCFで $44.7 \pm 19.0\%$ と、GT $27.9 \pm 1.1\%$ , PB $8.7 \pm 4.1\%$ より有意に高かった。またGCF中のHLA-DR<sup>+</sup> Tsは $65.3 \pm 18.4\%$ で、GTの $50.3 \pm 16.0\%$ , PBの $27.1 \pm 14.1\%$ より割合が有意に増加した。

## 考 察

フローサイトメトリーとモノクローナル抗体を用いることは、GCF中の免疫細胞の表面抗原の検索のための、適切で再現性のある方法である。この方法は、顕微鏡による検索と比べて客観的な結果が得られること、ゲートをかけることにより、

Table.2 Lymphocyte subset ratios and proportions of IL2R or HLA-DR positive fraction of each subset

	PB	GT	GCF
T/B	5.51 ± 1.84	4.19 ± 1.98	1.97 ± 0.94
	———— *	———— **	————
Th/Ts	1.94 ± 0.81	1.22 ± 0.48	1.41 ± 0.72
	———— *	———— **	———— NS
IL2R <sup>+</sup> Th	13.7 ± 7.3	18.4 ± 4.4	34.0 ± 18.0
(%)	———— *	———— **	————
IL2R <sup>+</sup> Ts	2.2 ± 2.2	3.1 ± 2.8	3.3 ± 2.4
(%)	———— NS	———— NS	————
IL2R <sup>+</sup> B	6.3 ± 4.4	12.5 ± 4.6	23.9 ± 10.3
(%)	———— **	———— **	————
HLA-DR <sup>+</sup> Th	8.7 ± 4.1	27.9 ± 11.1	44.7 ± 19.0
(%)	———— **	———— *	————
HLA-DR <sup>+</sup> Ts	27.1 ± 14.1	50.3 ± 16.0	65.3 ± 18.4
(%)	———— **	———— *	————

n=15: Each value represents the mean ± standard deviation for measurements of 15 subjects

PB : peripheral blood; GT: inflamed gingival tissue

GCF : gingival crevicular fluid

T/B : T lymphocyte to B lymphocyte ratio

Th/Ts : T helper/inducer to T suppressor/cytotoxic ratio

IL2R<sup>+</sup>Th : percentage of IL2R positive cells in T helper/inducer lymphocytes

IL2R<sup>+</sup>Ts : percentage of IL2R positive cells in T suppressor/cytotoxic lymphocytes

IL2R<sup>+</sup>B : percentage of IL2R positive cells in B lymphocytes

HLA-DR<sup>+</sup>Th : percentage of HLA-DR positive cells in T helper/inducer lymphocytes

HLA-DR<sup>+</sup>Ts : percentage of HLA-DR positive cells in T suppressor/cytotoxic lymphocytes

\*\* : significant at p<0.01

\* : significant at p<0.05

NS : not significant at p>0.05

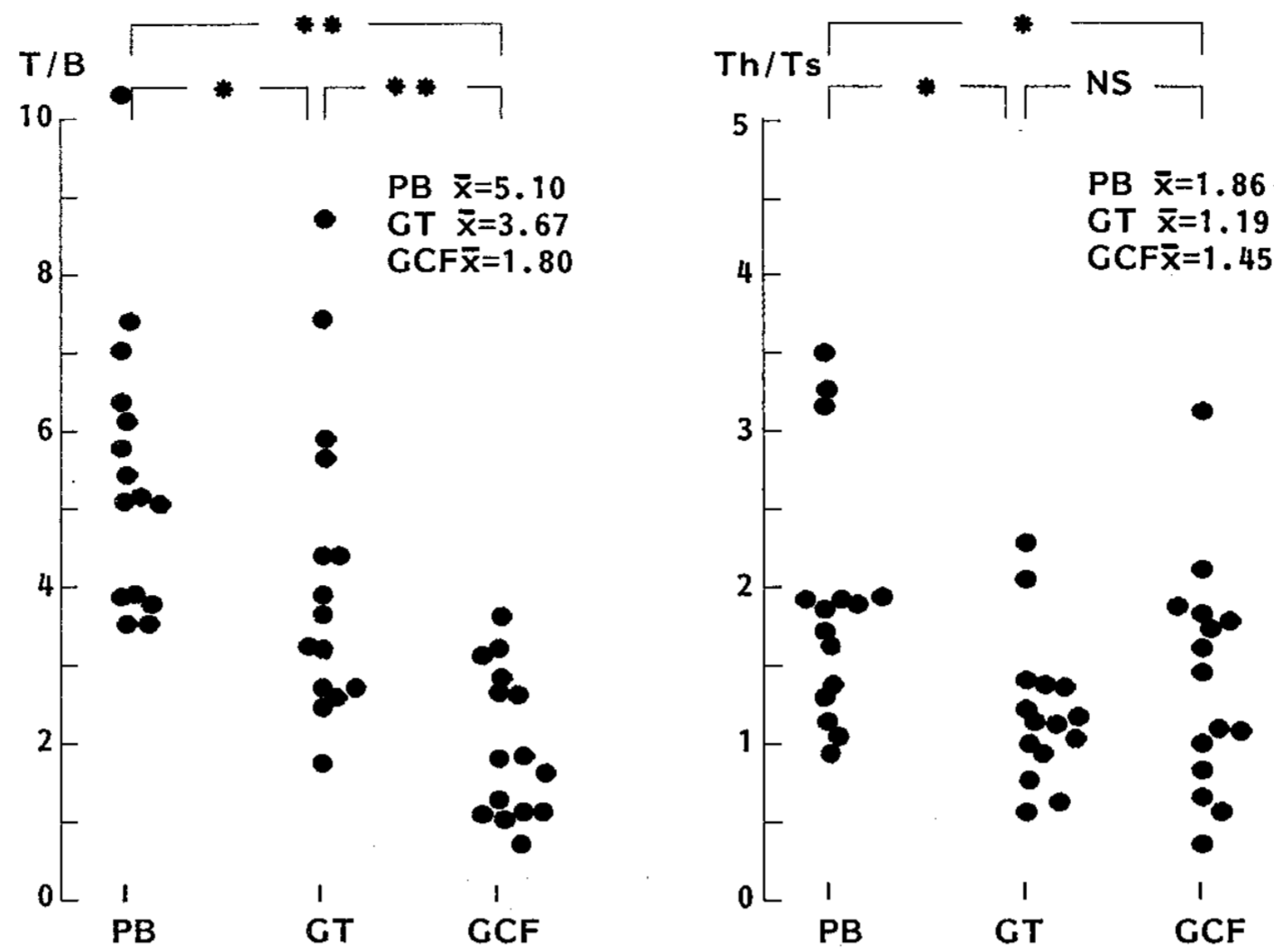


Fig.3 T/B and Th/Ts ratios in PB,GT and GCF

n=15 : Each point represents measurable value per patient.  
 $\bar{x}$  : median value of the sum of all cases in three groups  
 \*\* : significant at  $p < 0.01$ , \* : significant at  $p < 0.05$   
 NS : not significant at  $p > 0.05$

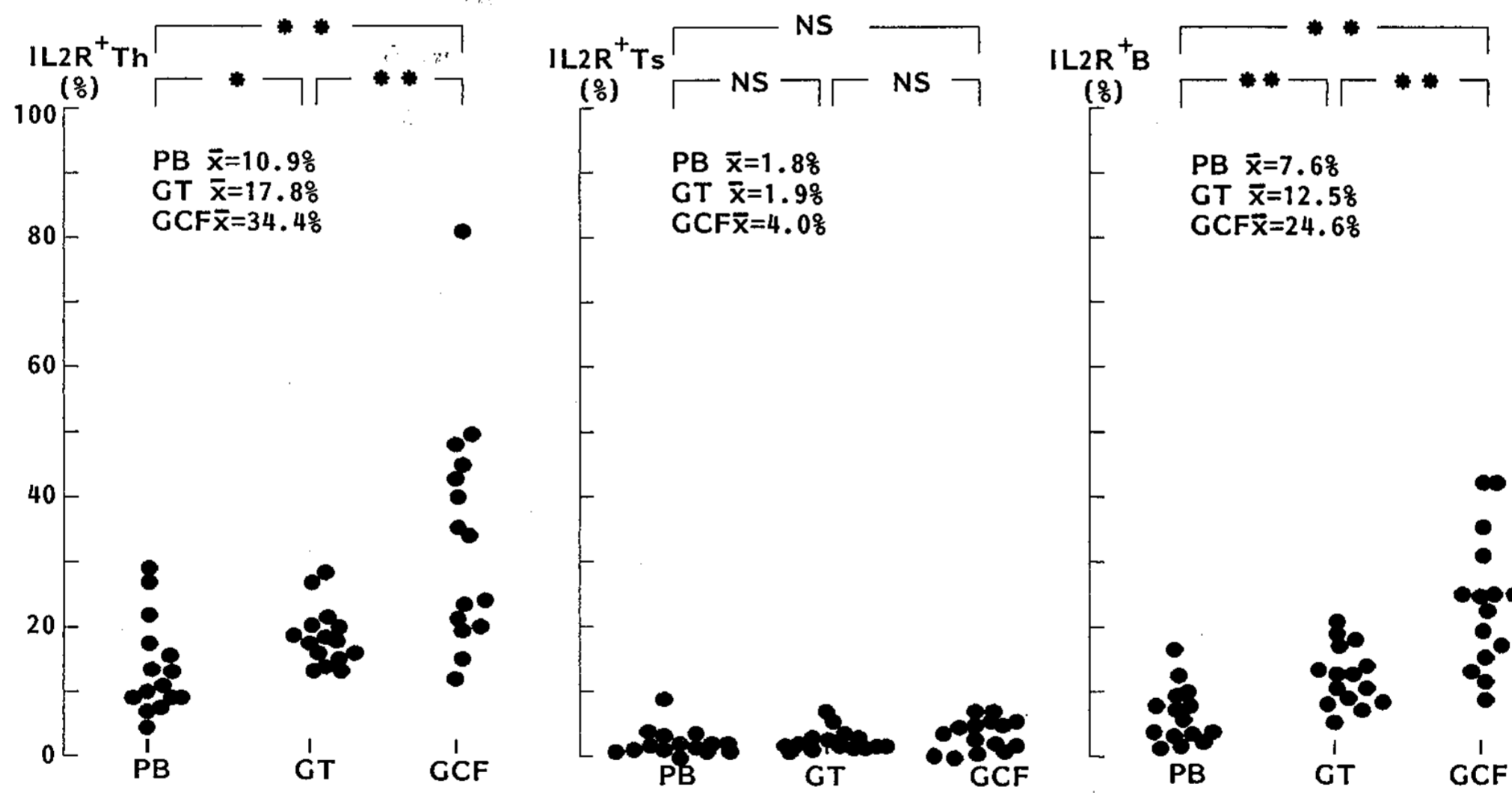


Fig.4 IL2R<sup>+</sup> Th, IL2R<sup>+</sup> Ts and IL2R<sup>+</sup> B percentages in PB,GT and GCF

n=15 : Each point represents measurable value per patient.  
 $\bar{x}$  : median value of the sum of all cases in three groups  
 \*\* : significant at  $p < 0.01$   
 \* : significant at  $p < 0.05$   
 NS : not significant at  $p > 0.05$

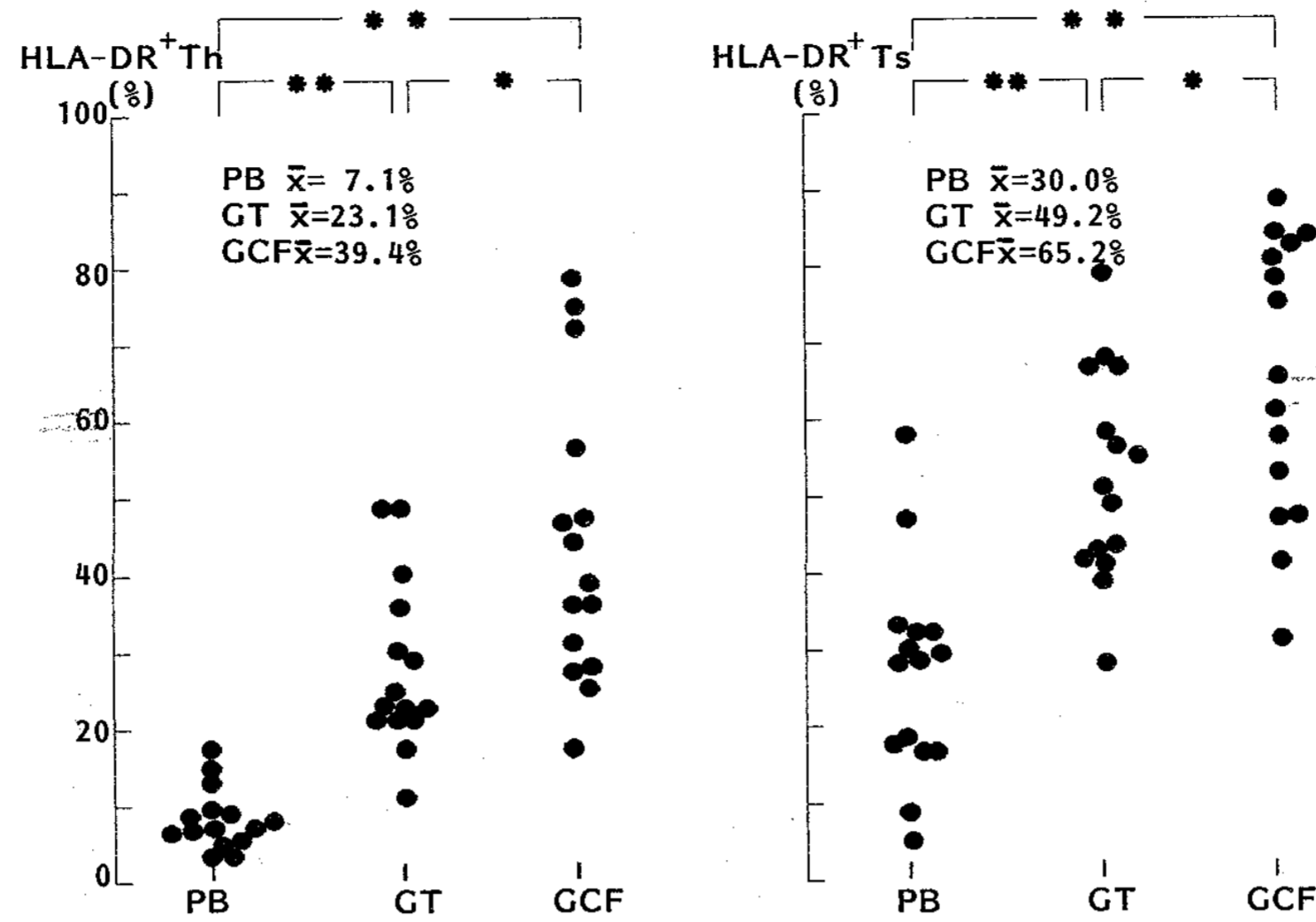


Fig.5 HLA-DR<sup>+</sup> Th and HLA-DR<sup>+</sup> Ts percentages in PB, GT and GCF

n=15: Each point represents measurable value per patient.  
 $\bar{x}$ : median value of the sum of all cases in three groups  
 \*\*: significant at p<0.01, \*: significant at p<0.05

データに及ぼす死細胞や他の物質による影響は最小限ですむ等の利点がある。今回の研究では、GCFと他の2群との間に、IL2R<sup>+</sup> Th, HLA-DR<sup>+</sup> Tリンパ球サブセットにおいて有意な差がみられた。T細胞は歯周炎歯肉における表皮中のランゲルハンス細胞によって、抗原提示され、活性化し得る<sup>25,26)</sup>。また、慢性炎症歯肉から分離したリンパ球は、未刺激でIL-2を産生することが知られている<sup>27)</sup>。一方、Hönig<sup>28)</sup>らは、歯周炎患者の歯肉中に、IL-1βが存在することを、さらにMasada<sup>29)</sup>らは未治療の高度の歯周炎患者の歯肉中に、IL-1のメッセンジャーRNAが存在することを見いだした。また、炎症歯肉の単核細胞の培養上清中には、IL-6が存在する<sup>30)</sup>。IL-2, IL-1, IL-6によりTリンパ球上のIL2Rの発現量が増加することから、GTでのIL2R<sup>+</sup> Thが高かったことが考えられる。

歯肉上皮細胞は、IL-1を産生する可能性が示唆されている<sup>29)</sup>。さらに、IL-1はT細胞とB細胞に対し、特にB細胞に対して走化性活性を有する<sup>33)</sup>。従って、T細胞やB細胞が、走化性因子としてのIL-1によって病変部に集まることが考えられる。他方、歯肉溝の接合上皮部では、intercellular

adhesion molecule-1(ICAM-1)が発現され<sup>34)</sup>、白血球の上皮通過に関与するといわれている。幼若化Tリンパ球の上皮への接着は、ICAM-1によって調節されていると考えられており<sup>35)</sup>、活性化した幼若化T細胞は接合上皮部に遊走するのであろう。以上のことから、歯周炎におけるリンパ球の活性化の過程は以下のように説明できる。Tリンパ球、Bリンパ球は抗原、マイトーゲン、インターリュウキンにより、血管から炎症歯肉組織を通過して歯周ポケットの上皮に至るまでに、徐々に活性化され、さらにIL-1やICAM-1の様な分子によって歯周ポケット部に集まる。

GCFはリンパ球刺激を起こし得るような細菌プラーク由来の因子や、マイトーゲンを含んでいる<sup>10,36)</sup>。Wilkinson<sup>37)</sup>らは、マイトーゲンで活性化したリンパ球が、細菌の内毒素や変性タンパク質に対して遊走することを示唆しており、活性化したリンパ球は走化性によって歯周ポケットに浸潤するのであろう。

IL2R<sup>+</sup> ThとHLA-DR<sup>+</sup> Thの値がGCF中で高かった。活性化したThによりBリンパ球が増殖することから、GCF中で、IL2R<sup>+</sup> Bが高かったことと関連していると考えられる。このように



GCFはリンパ球が活性化しやすい場を与え、今回、IL2RとHLA-DR陽性細胞の割合が高かった結果からもわかるように、歯周ポケット中には活性化したリンパ球が含まれていると思われる。

HLA-DR<sup>+</sup> Thは歯肉溝側1/3の炎症歯肉中に高頻度に発現し<sup>5)</sup>、今回の研究でも、GTにおけるHLA-DR<sup>+</sup> Th, HLA-DR<sup>+</sup> Ts, IL2R<sup>+</sup> Thが高頻度に発現することが観察されたように、GT中のリンパ球はGCF中と同様、活性化していることが考えられる。Seymourらは実験的歯肉炎の炎症歯肉でTリンパ球のIL2R発現率が低いのは、IL2Rが活性化の初期に発現され、すでに歯肉中では発現時期が過ぎているためだろうと述べている<sup>6)</sup>。一方、今回の著者らの結果では、GT中のIL2R<sup>+</sup> ThがPBより有意に高かったが、この違いは歯肉炎と歯周炎の違いによるものと思われる。

しかしながら、なぜIL2R<sup>+</sup> TsがGT, GCF中できわめて低いのかという疑問が出てくる。ひとつの考え方としてはHLA-DR<sup>+</sup>, IL2R<sup>+</sup> Th, Tsは歯周炎における炎症歯肉で、特異的な役割を果たしているためである。これに関連して、Tリンパ球でのIL2RとHLA-DRの発現は、細胞周期が進むためのスイッチの役割を果たしているのではないか、といういくつかの報告もある<sup>39-41)</sup>。Tリンパ球はIL2RをG<sub>0</sub>からG<sub>1</sub>期に発現するが<sup>9)</sup>、HLA-DRはS期以降に発現される<sup>11)</sup>ことから、TsでHLA-DRが高く、IL2Rが低いのは、Tsの大部分がS期にあるためとも考えられる。これはTh/Tsが低いことの説明にもつながる。

他の理由として今回p55(α鎖、低親和性レセプター)に特異的な、抗Tac抗体を用いた<sup>42)</sup>ことが考えられる。Yagitaら<sup>43)</sup>は、CD8陽性細胞では、p55がみられず、p75(β鎖、中親和性レセプター)がほとんどであるとも述べている。p75は、末梢血のTsでの、IL2系の直接的な活性化を担っている<sup>44)</sup>。よって今回の研究で抗Tac抗体を用いたことが、IL2R<sup>+</sup> Tsが低くなった原因であるとも考えられる。これらの仮説は、今後、3重染色法<sup>45)</sup>によって明らかになるであろう。

著者らはCD4とCD8における活性化マーカーを

調べたが、CD4は現在さらに細かく分けることができる。例えば、CD45R<sup>+</sup> サプレッサー・インデューサーT細胞とCD29<sup>+</sup> ヘルパー・インデューサーT細胞等はその例である<sup>46)</sup>。従って今後これらの細かいサブセットに対してIL2RやHLA-DRの発現率や、Bリンパ球の活性化との関係を調べるのが、炎症歯肉、特に歯周ポケット付近で生じている局所免疫応答を知る上で、良い手がかりになると考えられる。

## 結 論

歯周炎罹患患者15名からGCF, 炎症歯肉、末梢血を採取し、リンパ球サブセットにおけるインターリュウキン2レセプターとHLA-DRの発現率を検索して、以下の結果を得た。

1. GCFにおけるT/B比は炎症歯肉と末梢血における値より有意に低かった。
2. ThにおけるIL2R, HLA-DRの発現率、TsにおけるHLA-DRの発現率、Bリンパ球におけるIL2Rの発現率は、GCFにおいて、炎症歯肉や末梢血における値より高かった。
3. GCFに特徴的な所見というのは、炎症歯肉、末梢血に比べて、活性化したリンパ球の割合が多いことであった。
4. 歯肉から歯周ポケットへリンパ球が通過する際に、選択的な現象がおこっており、このことは歯周炎における局所の免疫応答を反映しているものと思われる。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたって、本研究の遂行に当たり、親切丁寧な御教示並びに御助言を賜りました本学歯科保存学第2教室の山崎和久講師、山下薫講師、鈴木卓研究生、大藤泰人大学院生、並びに新潟大学医学部腎研究施設の山本格助教授に謹んで感謝の意を表するとともに、第2保存学教室員の皆様のご協力に感謝申し上げます。

本研究の一部は、昭和63年度科学研究費補助金(一般研究A)課題番号(62440074)の補助を受けて行われたことを付記する。

## 参 考 文 献

- 1) Curtis, M. A., Gillett, I. R., Griffiths, G. S., Maiden, M. F. J., Sterne, J. A. C., Wilson, D. T., Wilton, J. M. A., Johnson, N. W.: Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases laboratory markers from analysis of gingival crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, **16**: 1-11, 1989.
- 2) Thurre, C., Robert, M., Cimasoni, G., Baehni, P.: Gingival sulcular leukocytes in periodontitis and in experimental gingivitis in humans. *J. Periodont. Res.*, **19**: 457-468, 1984.
- 3) Attström, R.: Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. *J. Periodont. Res.*, **5**: 42-47, 1970.
- 4) Stoufi, E. D., Taubman, M. A., Ebersole, J. L., Smith, D. J., Stashenko, P. P.: Phenotypic analysis of mononuclear cells recovered from healthy and diseased human periodontal tissues. *J. Clin. Immunol.*, **7**: 235-245, 1987.
- 5) Reinhardt, R. A., McDonald, T. L., Bolton, R. W., Dubois, L. M., Feely, D. E., Kaldahl, W. B.: In situ activated T lymphocytes in active versus stable periodontal lesions. *J. Periodont. Res.*, **23**: 295-302, 1988.
- 6) Seymour, G. J., Gemmell, E., Walsh, L. J., Powell, R. N.: Immunohistological analysis of experimental gingivitis in humans. *Clin. Exp. Immunol.*, **71**: 132-137, 1988.
- 7) Celenligil, H., Kansu, E., Ruacan, S., Eratalay, K., Caglayan, G.: Immunohistological analysis of gingival lymphocytes in adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, **17**: 542-548, 1990.
- 8) Gillett, R., Cruchley, A., Johnson, N. W.: The nature of the inflammatory infiltrates in childhood gingivitis, juvenile periodontitis and adult periodontitis: immunohistochemical studies using a monoclonal antibody to HLA Dr. *J. Clin. Periodontol.*, **13**: 281-288, 1986.
- 9) Smith, K. A.: Interleukin-2: inception impact and implications. *Science*, **240**: 1169-1176, 1988.
- 10) Tew, J. G., Engel, D., Mangan, D.: Polyclonal B-cell activation in periodontitis. *J. Periodont. Res.*, **24**: 225-241, 1989.
- 11) Locken, M. R., Shah, V. O., Dattilio, K. L., Civin, C. I.: Flow cytometric analysis of human bone marrow II. Normal B lymphocyte development. *Blood*, **70**: 1316-1324, 1987.
- 12) Neckers, L. M., Cossman, J.: Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division is regulated by interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 3494-3498, 1983.
- 13) 武内義晴, 吉江弘正, 原耕二: 歯周炎罹患者の歯肉溝滲出液におけるリンパ球サブセットの動向. *日歯周誌*, **32**: 984-991, 1990.
- 14) Loe, H.: The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.*, **38**: 610-616, 1967.
- 15) Schei, O., Waerhaug, J., Lovdal, A., Arno, A.: Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J. Periodontol.*, **30**: 7-16, 1959.
- 16) Skapski, H. and Lehner, T.: A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J. Periodont. Res.*, **11**: 19-24, 1976.
- 17) Yamashita, K., Ohfuji, Y., Yoshie, H. and Hara, K.: Blastogenic response and immunoglobulin production by inflamed gingival lymphocytes from dogs. *J. Periodont. Res.*, **23**: 322-327, 1988.
- 18) Kan, E. A. R., Wang, C. Y., Wang, L. C., Evans, R. L.: Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with anti-Leu-4 antibody. *J. Immunol.*, **131**: 536-539, 1983.
- 19) Ledbetter, J. A., Evans, R. L., Lipinski, M., Cunningham-Rundles, C., Good, R. A., Herzenberg, L. A.: Evolutionary conservation

- of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J. Exp. Med.*, **153**: 310-323, 1981.
- 20) Uchiyama, T., Broder, S., Waldmann, T.: A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac(+) cells. *J. Immunol.*, **126**: 1393-1397, 1981.
- 21) Uchiyama, T., Nelson, D.L., Fleisher, T.A., Waldmann, T.A.: A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells II. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells, and on one of two types of helper T cells. *J. Immunol.*, **126**: 1398-1403, 1981.
- 22) Zier, K.S.: Expression of class II antigens by subsets of activated T cells. *Cell. Immunol.*, **100**: 525-531, 1986.
- 23) Ohashi, Y., Takeshita, T., Nagata, K., Mori, S., Sugamura, K.: Differential expression of the IL-2 receptor subunits, p55 and p75 on various populations of primary peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.*, **143**: 3548-3555, 1989.
- 24) Lanier, L.L., Le, A.M., Phillips, J.H., Warner, N.L., Babcock, G.F.: Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J. Immunol.*, **131**: 1789-1796, 1983.
- 25) Newcomb, G.M., Powell, R.N.: Human gingival Langerhans cells as accessory cells in mitogen induced T cell responses. *J. Periodontol.*, **59**: 811-815, 1988.
- 26) Walsh, L.J., Seymour, G.J., Powell, R.N.: Human gingival Langerhans cells stimulate allogeneic lymphocytes: requirement for MHC class II antigens. *J. Periodontol.*, **61**: 328-333, 1990.
- 27) Seymour, G.J., Cole, K.L., Powell, R.N., Lewins, E., Cripps, A.W., Clancy, R.L.: Interleukin-2 production and bone resorption activity in vitro by unstimulated lymphocytes extracted from chronically-inflamed human periodontal tissues. *Archs. Oral Biol.*, **30**: 481-484, 1985.
- 28) Hönig, J., Rordorf-Adam, C., Siegmund, C., Wiedemann, W., Erard, F.: Increased interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J. Periodont. Res.*, **24**: 362-367, 1989.
- 29) Masada, M.P., Persson, R., Kenney, J.S., Lee, S.W., Page, R.C., Allison, A.C.: Measurement of interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, **25**: 156-163, 1990.
- 30) Kiyono, H., Kono, Y., Ogawa, T., Hamada, H., McGhee, J.R.: Interleukin and immunoglobulin secreting cells in adult periodontitis lesions. *J. Dent. Res.*, **69**(Special issue): 158, 1990.
- 31) Jankovic, D.L., Gibert, M., Baran, D., Ohara, J., Paul, W.E., Theze, J.: Activation by IL-2, but not IL-4, up-regulates the expression of the p55 subunit of the IL-2 receptor on IL-2 and IL-4 dependent T cell lines. *J. Immunol.*, **142**: 3113-3120, 1989.
- 32) Tosato, G., Miller, J., Marti, G., Pike, S.E.: Accessory function of Interleukin-1 and Interleukin-6: Preferential costimulation of T4 positive lymphocytes. *Blood*, **75**: 922-930, 1990.
- 33) Miossec, P., Yu, C.-L., Ziff, M.: Lymphocyte chemotactic activity of human interleukin-1. *J. Immunol.*, **133**: 2007-2011, 1984.
- 34) Crawford, J.M., Hopp, B.: Junctional epithelium expresses the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *J. Periodont. Res.*, **25**: 254-256, 1990.
- 35) Dustin, M.L., Singer, K.H., Tuck, D.T., Springer, T.A.: Adhesion of T lymphoblasts

- to epidermal keratinocytes is regulated by interferon and is mediated by intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1). *J.Exp.Med.*, **167**: 1323-1340,1988.
- 36) Donaldson, S.L., Ranney, R.R., Tew, J.G.: B-lymphocyte blastogenesis in response to periodontitis-associated bacteria. Kinetics and proportion of total response. *J.Periodontol.*, **55**: 359-363,1984.
- 37) Wilkinson, P.C., Roberts, J.A., Russell, R.J., and McLoughlin, M.: Chemotaxis of mitogen-activated human lymphocytes and the effects of membrane-active enzymes. *Clin. Exp. Immunol.*, **25**: 280-287,1976.
- 38) Reinherz, E.L., Morimoto, C., Penta, A.C., Schlossman, S.F.: Subpopulations of the T4 inducer T cell subset in man: evidence for an amplifire population preferentially expressing Ia antigen upon activation. *J.Immunol.*, **126**: 67-70, .1981.
- 39) Gansbacher, B., Zier, K.S. : Regulation of HLA-DR, DP and DQ expression in activated T cells. *Cell.Immunol.*, **117**: 22-34,1988.
- 40) Tsudo, M., Uchiyama, T., Takatsuki, K., Uchino, H., Yodoi, J.: Modulation of Tac antigen on activated human T cells by anti-Tac monoclonal antibody. *J.Immunol.*, **129**: 592-595,1982.
- 41) Moretta, A., Accolla, R.S., Cerottini, J-C.: IL-2-mediated T cell proliferation in humans is blocked by a monoclonal antibody directed against monomorphic determinants of HLA-DR antigens. *J.Exp.Med.*, **155**: 599-604,1982.
- 42) Robb, R.J., Rusk, C.M., Yodoi, J., Greene, W.C.: Interleukin 2 binding molecule distinct from the Tac protein: Analysis of its role in formation of high-affinity receptors. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA.*, **84**: 2002-2006,1987.
- 43) Yagita, H., Nakata, M., Azuma, A., Nitta, T., Takeshita, T., Sugamura, K. et al.: Activation of peripheral blood T cells via the p75 interleukin 2 receptor. *J.Exp.Med.*, **170**: 1445-1450,1989.
- 44) Sharon, M., Siegel, J.P., Tosato, G., Yodoi, J., Gerrard, T.L., Leonard, W.J.: The human Interleukin 2-receptor  $\beta$  chain (p70) direct identification, partial purification, and patterns of expression of peripheral blood mononuclear cells. *J.Exp.Med.*, **167**: 1265-1270,1988.
- 45) Lanier, L.L., Locken, M.R.: Human lymphocyte subpopulations identified by using three-color immunofluorescence and flow cytometry analysis: correlation of Leu-2, Leu-3, Leu-7, Leu-8 and Leu-11 cell surface antigen expression. *J.Immunol.*, **132**: 151-156,1984.
- 46) Salmon, M., Kitas, G.D., Gaston, J.S.H., Bacon, P.A.: Interleukin-2 production and response by helper T-cell subsets in man. *Immunology*, **65**: 81-85,1988.